

**Biotransformationen natürlicher und unnatürlicher
Substrate zur Bildung von Terpenoiden mit
olfaktorischen Eigenschaften**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Vanessa Harms, M. Sc.

2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 12.05.2021

für meine Großeltern
Maria und Klaus Gottschalk

Kurzzusammenfassung

Vanessa Harms

Biotransformationen natürlicher und unnatürlicher Substrate zur Bildung von Terpenoiden mit olfaktorischen Eigenschaften

Schlagwörter: Biokatalyse, Terpensynthesen, Lipase, Lipoxygenase, Terpene, etherische Öle

Die Terpene bilden mit mehr als 80000 bekannten Verbindungen die größte Klasse sekundärer Naturstoffe. Terpene sind strukturell komplexe Verbindungen, die definierte Stereozentren aufweisen und in allen Bereichen des Lebens vorkommen. Die Terpene werden dabei ausgehend von azyklischen Prenyldiphosphaten durch Terpensynthesen gebildet. Infolge ihrer vielfältigen Eigenschaften und strukturellen Besonderheiten werden sie als Pharmazeutika und Bausteine vor allem für die „ex-chiral-pool“ Synthese neuer Verbindungen verwendet. Das größte Einsatzgebiet haben Terpene allerdings in der Duft- und Aromaindustrie, wo sie aufgrund ihrer ansprechenden Olfaktorik sowohl in Form von Reinstoffen als auch etherischen Ölen Anwendung finden. Durch ihre besonderen pharmazeutischen und olfaktorischen Eigenschaften erfahren die Terpene eine steigende kommerzielle Aufmerksamkeit, weshalb insbesondere die Suche nach neuen Terpenoiden und die Funktionalisierung vorhandener Terpene in den Blickpunkt gerückt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden zwei verschiedene biotechnologische Ansätze für die Bildung neuer Terpenoide gewählt. Zum einen wurden unnatürliche Farnesyldiphosphate mit heterolog exprimierten Sesquiterpensynthesen zu neuen komplexen Terpenoiden umgesetzt. Die unnatürlichen Derivate wurden zunächst auf die Substratazeptanz überprüft und entstehende Produkte anschließend durch die Anwendung der präparativen Gaschromatographie isoliert und die Struktur aufgeklärt. Ferner wurden die Biotransformationsprodukte einer olfaktorischen Analyse unterzogen, um potentielle Terpenoide für den Einsatz als Duftstoffe zu identifizieren. Anschließend wurden Biosynthesewege für die gebildeten Produkte postuliert und diskutiert. Ein biotransformiertes Terpenoid wurde zudem durch Semisynthese weiter verändert und funktionalisiert, um den Strukturraum der Terpenoide zu erweitern. Des Weiteren wurden mehrere Mutanten einer Sesquiterpensynthase hergestellt und deren Einfluss auf die carbokationische Reaktionskaskade beurteilt.

Zum anderen wurden Terpene und etherische Öle durch enzymatische Katalyse oxyfunktionalisiert, wobei kommerziell verfügbare Enzyme genutzt wurden. Im Fokus steht hierbei die Bildung von duftstoffrelevanten Verbindungen sowie die Erweiterung des Einsatzgebietes der etherischen Öle. Dazu wurden zunächst reproduzierbare Enzymtests entwickelt und optimiert. Anschließend wurde die Substratazeptanz der eingesetzten Terpene überprüft und die entstehenden Produkte massenspektrometrisch analysiert. Unbekannte Produkte wurden ebenfalls isoliert, strukturell aufgeklärt und Reaktionsmechanismen zur Bildung der Produkte postuliert und diskutiert.

Abstract

Vanessa Harms

Biotransformations of natural und non-natural substrates for the formation of terpenoids with olfactory properties

Keywords: biocatalysis, terpene synthases, lipase, lipoxygenase, terpenes, essential oils

With more than 80,000 known compounds, the terpenes form the largest class of secondary natural products. Terpenes are structurally complex compounds that have defined stereocenters and occur in all areas of life. Terpenes are formed from acyclic prenyl diphosphates by terpene synthases. As a result of their diverse properties and structural peculiarities, they are used as pharmaceuticals and building blocks, especially for the "ex-chiral-pool" synthesis of new compounds. However, terpenes have their greatest field of application in the fragrance and flavor industry, where they are used in the form of both pure substances and essential oils due to their appealing olfactory properties. Due to their special pharmaceutical and olfactory properties, terpenes are receiving increasing commercial attention, which is why the search for new terpenoids and the functionalization of existing terpenes in particular have come into focus.

In the present PhD thesis, two different biotechnological approaches were chosen for the formation of new terpenoids. First, unnatural farnesyl diphosphates were converted to new complex terpenoids using heterologously expressed sesquiterpene synthases. The unnatural derivatives were first screened for substrate acceptance. Then, the resulting products were subsequently isolated by preparative gaschromatography and structure elucidated. Furthermore, the biotransformation products were olfactorially analyzed to identify potential terpenoids for use as fragrances. Subsequently, biosynthetic pathways for the formed products were postulated and discussed. A biotransformed terpenoid was also further modified and functionalized by semi-synthesis to increase the structural space of terpenoid diversity. Furthermore, several mutants of a sesquiterpene synthase were prepared and their influence on the carbocationic reaction cascade was assessed.

Second, terpenes and essential oils were oxyfunctionalized by enzymatic catalysis using commercially available enzymes. The focus is based on the formation of compounds relevant to fragrances as well as the expansion of the field of application of essential oils. Therefore, reproducible enzyme tests were first developed and optimized. Subsequently, the substrate acceptance of the terpenes used was verified and the resulting products were analyzed by mass spectrometry. Unknown products were also isolated, the compounds were elucidated structurally and reaction mechanisms for the formation of the products were postulated and discussed.

Vorbemerkungen

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden zwei voneinander unabhängige Teilprojekte bearbeitet. Da sich die Projekte sowohl hinsichtlich der verwendeten Biokatalysatoren als auch der eingesetzten Substrate unterscheiden, wurde die Dissertation in zwei Themenabschnitte gegliedert. Beide Teilprojekte werden daher separat eingeführt und diskutiert. Jeder Abschnitt umfasst zudem eigenständige Zielsetzungen, Zusammenfassungen und Ausblicke. Zur besseren Übersicht wurden die experimentellen Teile ebenfalls unterteilt. Das erste Projekt befasst sich mit Biotransformationen von unnatürlichen Farnesyldiphosphaten durch Sesquiterpensynthasen. Das zweite Teilprojekt erfolgte in Kooperation mit der Symrise AG (Holzminden) und behandelt die enzymatische Katalyse von natürlichen Terpenen und etherischen Ölen mit kommerziell verfügbaren Enzymen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

V. Harms, V. Ravkina, A. Kirschning, *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 3162-3166.

V. Harms, B. Schröder, C. Oberhauser, C. D. Tran, S. Winkler, G. Dräger, A. Kirschning, *Org. Lett.*, **2020**, *22*, 4360-4365.

V. Harms, A. Kirschning, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.*, **2020**, *37*, 1080-1097.

C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 11802-11806; *Angew. Chem.*, **2018**, *130*, 11976-11980.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	II
Abstract	III
Vorbemerkungen.....	IV
Anmerkungen	VIII
Buchstabencodes der Aminosäuren.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung – Thema I	1
1.1 Enzyme als Biokatalysatoren.....	1
1.2 Terpene	4
1.3 Terpensynthesen	6
1.4 Einfluss von Aminosäuren der aktiven Tasche	13
1.5 Unnatürliche Farnesyldiphosphatanaloga	14
2 Zielsetzung – Thema I.....	19
3 Ergebnisse und Diskussion – Thema I.....	21
3.1 Herstellung der Sesquiterpensynthesen BcBOT2 und PenA	21
3.2 Auswahl und Validierung der Analyseverfahren	25
3.3 Aktivitätsbestimmung der Terpenzyklen BcBOT2 und PenA.....	28
3.4 Optimierung der Biotransformationen der STCs BcBOT2 und PenA mit FPP (12).....	30
3.5 Semi-präparative Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (12).....	47
3.6 Semi-präparative Biotransformation von PenA mit FPP (12).....	52
3.7 Analytische <i>in vitro</i> Enzymtests mit unnatürlichen Substraten	57
3.8 Vorarbeiten für semi-präparative Umsetzungen mit unnatürlichen Substraten.....	64
3.9 Semi-präparativer Ansatz der STCs BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat 78.....	68
3.10 Semi-präparativer Ansatz der STCs BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat 109.....	76
3.11 Semi-präparativer Ansatz der STCs BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat 110.....	78
3.12 Semi-präparativer Ansatz der STCs BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat 111.....	84
3.13 Semi-präparativer Ansatz der STCs PenA mit dem unnatürlichen Substrat 78	92
3.14 Chemische Derivatisierung des biotransformierten Produkts 112	104
3.15 Ortsspezifische Mutagenesestudien von BcBOT2.....	110
4 Zusammenfassung und Ausblick – Thema I.....	132

5	Einleitung – Thema II.....	135
5.1	Lipasen	135
5.2	Lipoxygenasen.....	138
5.3	Etherische Öle	145
5.4	Seitenströme Anomadien, Cyclademol und Isolinalool	148
6	Zielsetzung – Thema II	149
7	Ergebnisse und Diskussion – Thema II	151
7.1	Lipase <i>Candida rugosa</i>	151
7.2	Studien zur absoluten Stereochemie des Cyclademol (209)	160
7.3	Enzymatische Umsetzungen mit der Lipoxygenase	163
7.4	Cooxidationen ausgewählter etherischer Öle im analytischen Maßstab	184
7.5	Cooxidation von (+)-Valencen (3) im semi-präparativen Maßstab.....	198
7.6	Semi-präparative Cooxidation von Fixateur Bois.....	205
8	Zusammenfassung und Ausblick – Thema II	210
9	Allgemeiner experimenteller Teil	213
9.1	Allgemeine Hinweise zu Chemikalien und Verbrauchsmaterial	213
9.2	Analysemethoden	215
10	Experimenteller Teil – Thema I	226
10.1	Proteinbiochemische Methoden	226
10.2	Mikrobiologische Methoden.....	230
10.3	Molekularbiologische Methoden.....	231
10.4	Methodenvalidierung	236
10.5	Analytische Enzymtests.....	236
10.6	Semi-präparative Biotransformationen mit FPP.....	245
10.7	Semi-präparative Biotransformationen mit unnatürlichen Substraten	248
10.8	Semi-synthetische Arbeiten	261
10.9	Mutagenesestudien	267
11	Experimenteller Teil – Thema II	274
11.1	Lipase <i>Candida rugosa</i> Typ VII.....	274
11.2	Lipoxygenase.....	278
12	Literaturverzeichnis	297

13	Anhang.....	311
13.1	Gen- und Proteinsequenzen.....	311
13.2	Chromatogramme	313
13.3	Massenspektren	322
13.4	IR-Spektren	337
13.5	NMR-Spektren	338
	Danksagung	371
	Lebenslauf	373

Anmerkungen

Die nachfolgenden Anmerkungen werden auf beide Teilprojekte angewendet:

- Die Begriffe „Terpen“ und „Terpenoid“ werden als Synonyme verwendet. Sie umfassen in der vorliegenden Arbeit neben den isoprenoiden Kohlenwasserstoffen auch deren oxyfunktionalisierte Verbindungen sowie die durch Biosynthese oder unnatürliche Prenylvorläufer erzeugten Verbindungen, die ein von der Isopren-Regel abweichendes Kohlenstoffgrundgerüst aufweisen.
- Semi-quantitative Ausbeutebestimmungen wurden unter Verwendung eines internen Standards durchgeführt.
- Prozentuale Flächenanteile wurden durch automatische Integration der relevanten Peakflächen bestimmt.
- Biotransformationen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einer Dreifachbestimmung.
- In graphischen Darstellungen dienen die Verbindungslinien zwischen den einzelnen Messpunkten lediglich zur Veranschaulichung und stellen keineswegs den tatsächlichen Verlauf der Ausbeute dar.
- Die Ermittlung der Reinheit von Verbindungen aus semi-präparativen Umsetzungen erfolgte durch Integration aller im Chromatogramm ersichtlichen Peaks mit Ausnahme der Lösemittelsignale.
- Für den Begriff „Stereoselektivität“ wird die chemische Bezeichnung zugrunde gelegt.
- Die Nummerierung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome in NMR-Spektren folgt nicht den IUPAC-Regeln.

Buchstabencodes der Aminosäuren

Zur Beschreibung von Aminosäuren wird neben der Namensbezeichnung auch der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet. Es sei hierbei anzumerken, dass die Abkürzungen „H“ und „C“ bei NMR-Spektren zur Beschreibung von Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen verwendet wird und nicht den Einbuchstabencode für die Aminosäuren Histidin und Cystein darstellen. Hinsichtlich der Nummerierung beschreibt die Bezeichnung F138 ein Phenylalanin (F) an der Position 138, wobei die Position 1 der ersten N-terminalen Aminosäure der Proteinsequenz entspricht. Bei Mutagenesestudien beschreibt F138V einen Austausch von Phenylalanin (F) an der Position 138 gegen die Aminosäure Valin (V).

Ein (X)- und Dreibuchstabencode (XXX) von Aminosäuren. F138 beschreibt Phenylalanin (F) an der Position 138, wobei Position 1 der ersten N-terminalen Aminosäure der Proteinsequenz entspricht. Bei Mutagenesestudien beschreibt F138V einen Austausch von Phenylalanin (F) an der Position 138 gegen die Aminosäure Valin (V).

Aminosäure	XXX	X	Aminosäure	XXX	X
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
#	Zyklenanzahl
%	Prozent
[¹ O ₂]	Singulett-Sauerstoff
[³ O ₂]	Triplett-Sauerstoff
®	registrierte Warenmarke
°C	Grad Celsius
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
6x His	Hexahistidin
A [%]	Flächenprozent
Ac	Acetyl-
ACN	Acetonitril
APS	Amoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent
AS	Aminosäure
ax	axial
BcBOT2	Presilphiperfolan-8β-ol Synthase
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C ₆ D ₆	deutერიertes Benzol
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CoA	Coenzym A
COSY	Korrelationspektroskopie (engl. <i>correlation spectroscopy</i>)
CrL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
CY	Zyklisierung
d	Schichtdicke
DBÄ	Doppelbindungsäquivalent
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMAPP	Dimetyllallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

Abkürzung	Bedeutung
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
EPS	Einphasensystem
eq	äquatorial
ESP	einstufiger Prozess
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	engl. Fast Protein Liquid Chromatographie
FPP	(<i>E,E</i>)-Farnesyldiphosphat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
H [~]	Hydridshift
H ^{+~}	Protonenshift
H•	Wasserstoffradikal
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HO•	Hydroxyl-Radikal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPOD	Hydroperoxide
HR	Hochauflösung
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPPI	Isopentenylidiphosphat Isomerase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LA	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
M	Molar/ Marker (Gelelektrophorese)
m	Masse

Abkürzung	Bedeutung
mbar	Millibar
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me [~]	Methylshift
MeOH	Methanol
MEP	Methylerythritol-Phosphatweg
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPLC	Mitteldruckhochleistungsflüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MSD	massenselektiver Detektor
MtBE	Methyl-tert-butylether
MTPA-Cl	α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl-chlorid
MVA	Mevalonatweg
NaCl	Natriumchlorid
negK	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	Kern-Overhauser Effekt (engl. <i>nuclear Overhauser effect</i>)
NOESY	engl. <i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PenA	Pentalenen Synthase aus <i>Streptomyces exfoliatus</i>
pGC	präparative Gaschromatographie
pHPLC	präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
pl	Isoelektrischer Punkt
PPase	Pyrophosphatase
ppm	engl. <i>parts per million</i> , 1 ppm = $1 \cdot 10^{-6}$
Prot K	Proteinase K
PSP	Presilphiperfolan-8 β -ol
quant.	quantitativ
RI	Retentionsindex
ROESY	engl. <i>rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy</i>

Abkürzung	Bedeutung
ROO•	Peroxyradikal
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SFE	überkritische Fluidextraktion
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolic repression</i>
STC(n)	Sesquiterpencyclasen
<i>t</i> BuOOH	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
TC(n)	Terpencyclasen
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
™	unregistrierte Warenmarke
Toluol- <i>d</i> ₈	deutერიertes Toluol
<i>t</i> _R	Retentionszeit [min]
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
U·min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
UPLC	engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt/ Volumen
VIS	sichtbares Licht
WFR	Wiederfindungsrate
WM	WAGNER-MEERWEIN Umlagerung
WT	Wildtyp
<i>xg</i>	<i>x</i> -fache Gravitationskraft
<i>z</i>	Ladung
<i>z.b</i>	zum Beispiel
ZPS	Zweiphasensystem
ZSP	zweistufiger Prozess
β	Massenkonzentration
δ	chemische Verschiebung (NMR)
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromol
<i>v</i>	Reaktionsgeschwindigkeit

1 Einleitung – Thema I

1.1 Enzyme als Biokatalysatoren

Die Biotransformation ist als eine selektive enzymatische Umwandlung von chemisch synthetisierten oder natürlichen Substraten zu definierten Produkten unter Verwendung eines Biokatalysators definiert.^[1] Solche Katalysatoren sind biologische Moleküle mit katalytischen Eigenschaften zu denen isolierte oder rekombinante Enzyme, aber auch ruhende Ganzzellsysteme und Mikroorganismen zählen. Die Biokatalysatoren werden hierbei aus natürlichen Quellen isoliert oder durch genetisch optimierte Wirte heterolog exprimiert.^[2] Biotransformationen stellen eine umweltfreundliche Alternative zur herkömmlichen Metall- und Organokatalyse da, sind diesen in ihren Eigenschaften in vielerlei Hinsicht überlegen und zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und katalytische Reaktivität aus.^[1,3]

Enzyme¹ sind katalytisch aktive Proteine, die über die Proteinbiosynthese produziert werden. Anders als Ribosome, steuern die Proteinenzyme hochspezifisch wichtige Funktionen im Stoffwechsel aller Lebewesen.^[4] Durch die Ausbildung eines aktivierten Übergangskomplexes können Enzyme die Aktivierungsenergie einer Reaktion senken, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird, aber gleichzeitig das chemische Gleichgewicht nicht verschoben wird. Die Katalyse erfolgt dabei reversibel im aktiven Zentrum des Enzyms, während das restliche Protein als Gerüst agiert. Da Enzyme Proteinmoleküle sind, die sich evolutionär entwickelt haben, sind sie allerdings auf die physiologischen Bedingungen in Zellen ausgelegt.^[5]

Die Biokatalyse zeichnet sich durch milde Reaktionsbedingungen aus. So zeigen die meisten Enzyme ein Aktivitätsmaximum bei Normaldruck, einem neutralen pH-Wert (pH 5-8) und Temperaturen zwischen 20-40°C.^[1] Dadurch können unerwünschte Nebenreaktionen, wie sie bei der chemischen Katalyse auftreten, unterbunden werden.^[6] Reaktionen außerhalb der physiologischen Bedingungen können hingegen leicht Einfluss auf die thermodynamische und kinetische Stabilität nehmen und mit dem Verlust der Tertiärstruktur einhergehen. Die Folge ist eine höhere Anfälligkeit für die Proteolyse oder eine irreversible Inaktivierung des Enzyms.^[5] Zur Steigerung der Langzeitstabilität, werden Enzyme daher für industrielle Zwecke oftmals auf Trägermaterialien immobilisiert. Dadurch kann zudem eine leichte Abtrennung des Katalysators und eine Wiederverwertung erzielt werden.^[7] Die Umsatzrate bei dem Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren ist um den Faktor 10^8 - 10^{17} größer als bei den nichtkatalysierten Reaktionen.^[6] Auch im Hinblick auf chemische Katalysatoren, verfügen enzymatische Katalysatoren über eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit, sodass die notwendige Menge an Katalysator reduziert werden kann. Gleichzeitig sind Biokatalysatoren biologisch abbaubar. Weiterhin können Enzyme ein breites Spektrum an Reaktionen katalysieren und ermöglichen auch Reaktionen an vermeintlich nicht-aktivierten Positionen im Molekül.^[8] Des Weiteren verfügen Enzyme über eine hohe Chemo- und Regioselektivität. Aufgrund ihrer komplexen Tertiärstruktur sind sie in der Lage enantiotop

¹ Da sich die vorliegende Arbeit mit isolierten rekombinanten bzw. mit kommerziell erhältlichen Enzymen befasst, werden die Enzyme als Biokatalysatoren näher betrachtet.

Protonen an prochiralen Kohlenwasserstoffen zu unterscheiden, weshalb sie auch über eine Enantioselektivität verfügen.^[6] Da Enzyme ausschließlich aus *L*-Aminosäuren aufgebaut sind, sind sie homochiral, was jedoch den Nachteil birgt, dass die Enantioselektivität eines Enzyms nicht umkehrbar ist^[9]. Zudem hängt die Aktivität vieler Enzyme von Cofaktoren, wie Metallionen oder Coenzymen ab. Letztere fungieren als intermediäre Träger von Elektronen (NAD/NADP/FMN) oder als Überträger funktioneller Gruppen (Coenzym A). Coenzyme stammen von den stabileren Vitaminen ab und sind meist instabil und vor allem teuer, sodass sie zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von biotechnologischen Prozessen regeneriert werden müssen.^[10,5] Durch Substrat- und Produktinhibierungen wird die Aktivität der Enzyme reduziert. Während die Substratinhibierung durch eine kontinuierliche Substratzugabe reguliert werden kann, werden Produktinhibierungen durch *tandem in situ* Ansätze in Form von gekoppelten enzymatischen Prozessen unterdrückt.^[8]

Neben dem Einsatz in der Lebensmittelchemie, der Landwirtschaft, der Waschmittelindustrie wie auch im Gerbereigewerbe, werden Biokatalysatoren auch abseits von industriellen Prozessen aufgrund ihrer hohen Spezifität und Empfindlichkeit in der klinischen und chemischen Analyse sowie als Biosensoren eingesetzt.^[5] Auch finden Biokatalysatoren für die Produktion von Biokraftstoffen Anwendung und bieten somit eine nachhaltige und zukunftsorientierte Alternative im Vergleich zu chemischen Prozessen.^[11] Die Nachfrage nach enantiomerenreinen Verbindungen, bei Nutzungen der kinetischen Racematspaltung und für die spezifische Funktionalisierung von Zielmolekülen haben das Anwendungsspektrum der Biokatalyse für auf die Pharma- und Feinchemikalienindustrie wesentlich erweitert.

1.1.1 Enzympromiskuität

Promiskuität beschreibt die Eigenschaft von Enzymen, sekundäre Reaktionswege zu katalysieren und andere Substrate, als jene für die sie evolutiv entwickelt und physiologisch spezialisiert worden sind, zu akzeptieren.^[12] Ursächlich ist die Häufung von katalytisch aktiv eingreifenden Resten innerhalb der aktiven Tasche, sodass Promiskuität ein weit verbreitetes Merkmal von Enzymen ist und eine Schlüsselfunktion in der Evolution neuer Enzymfunktionen einnimmt.^[13] Es ist weitgehend akzeptiert, dass sich die heutigen Enzyme durch Genduplikation, zufällige Punktmutationen und natürliche Selektion aus einigen wenigen Ur-Enzymen entwickelt haben, die über eine breite Selektivität und Spezifität verfügten. Durch divergente Evolution wurden Enzyme mit spezifischen katalytischen Eigenschaften geschaffen, wobei die promiskuitiven Merkmale als sekundäre Funktionen in einigen Enzymen erhalten blieben.^[14,15]

Die Promiskuität kann in vier Kategorien unterteilt werden, wobei Enzyme oftmals über eine Kombination verschiedener Promiskuitäten verfügen, sodass eine klare Abgrenzung erschwert wird. Enzyme, die unter Reaktionsbedingungen aktiv sind, die außerhalb ihrer natürlichen physiologischen Bedingungen liegen, werden als *konditionspromisk* beschrieben. Akzeptiert das Enzym hingegen strukturell unterschiedliche Substrate, katalysiert jedoch weiterhin die gleiche Reaktion, so liegt eine *Substrat Promiskuität* vor. Wird hingegen nur ein Substrat akzeptiert,

welches zu verschiedenen Produkten umgesetzt wird, bei dem das Enzym vergleichbare Reaktionswege nutzt, handelt es sich um eine *Produkt Promiskuität*. Die *katalytische Promiskuität* ist die Fähigkeit eines Enzyms mehrere chemische Umsetzungen zu katalysieren, die über verschiedene Zwischenstufen verlaufen. Die katalytische Promiskuität kann zufällig oder durch die Einführung von gezielten Mutationen induziert sein.^[13,15,16]

Im Zusammenhang mit der Enzympromiskuität fällt häufig der Begriff der Enzym-Superfamilien. Enzymen einer Superfamilie ist gemeinsam, dass diese, ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren diversifiziert wurden, jedoch auf unterschiedliche Substrate und Reaktionswege zurückgreifen können. Die Struktur des aktiven Zentrums ist bei Mitgliedern einer Superfamilie zumindest teilweise vergleichbar, weshalb sie über homologe Strukturen verfügen und lediglich kleine Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums aufweisen.^[17,18]

Die Häufigkeit mit der promiske Eigenschaften bei natürlichen Enzymen entdeckt werden, lässt den Schluss zu, dass die Promiskuität ein entscheidender Aspekt für die Entwicklung von effizienten und spezialisierten Enzymen in der Natur ist.^[15] Durch die Adaption der divergenten Entwicklung kann unter geeigneten Umständen ein Katalysator mit einer niedrigen promisken Aktivität durch gezielte Mutation und Selektion so angepasst werden, dass dem Enzym neue primäre katalytische Funktionen verliehen werden.^[17] Daher gilt die Enzympromiskuität als wichtiger Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Biokatalysatoren mit erweiterten Anwendungsmöglichkeiten.

1.1.2 Gerichtete Evolution

Enzyme sind auf die Reaktionen der Standard-Enzymtypen beschränkt und führen aus biotechnologischer Sicht, aufgrund ihrer engen Substratbreite, Produktinhibierung, unzureichender Enzymaktivität und Stabilität, zu Einschränkungen in der Nutzung als Biokatalysatoren.^[19] Daher werden heutzutage die Enzyme auf die Prozesseigenschaften und Kundenspezifikationen evolviert. Erreichbar ist dies durch die Nutzung von Protein-Engineering Technologien wie der gerichteten Evolution (*directed evolution*), die die Neugestaltung bestehender Biokatalysatoren ermöglicht.^[20,21,22]

Während es sich bei der ortsspezifischen Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) um einen rationalen Ansatz handelt, bei dem detaillierte Strukturinformationen und das Verständnis von Aufbau und Funktion der einzelnen Aminosäuren unumgänglich sind, stellt die gerichtete Evolution einen evolutionären Prozess dar, der allgemein anwendbar ist und innerhalb kürzester Zeit eine qualitativ hochwertige Bibliothek von Protein- und Enzymvarianten erzeugt.^[23,24,19] Die gerichtete Evolution beruht auf einem kombinatorischen Ansatz aus molekularbiologischen Methoden und einem Hochdurchsatz-Screening Verfahren. Dazu werden iterative Zyklen von Genmutation, heterologer Expression in einem Wirtsorganismus und Selektion für die gewünschte Eigenschaft durchgeführt (**Abbildung 1**).^[25,26] Minderwertige Mutanten werden vor Beginn eines neuen Zyklus aussortiert, wodurch der evolutionäre Charakter der Methode zustande kommt.^[22] Voraussetzung ist eine effiziente Mutationsstrategie sowie ein schnelles und zuverlässiges Analysesystem.

Ursprünglich wurde die Zufallsmutagenese durch Mutatorstämme, Licht oder Chemikalien induziert. Heute ist die meist genutzte Genmutagenesemethode die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (*epPCR*), bei der durch gezielte Abweichung von den Reaktionsbedingungen die Fehlerhäufigkeit empirisch gesteuert werden kann. Weitere Möglichkeiten bieten das *DNA-Shuffling* und die Sättigungsmutagenese.^[19,23,25] Zur Generierung möglichst kleiner aber qualitativ hochwertiger Bibliotheken werden strukturbasierte Systematisierungen vorgenommen oder sog. „*hot-spots*“ identifiziert und diese überproportional häufig mutiert.^[19,27,21]

Die gerichtete Evolution gilt als eine der fundamentalen Errungenschaften der Biokatalyse und hat sich heute als eine allgemein anwendbare Methode etabliert, um Proteineigenschaften zu verbessern oder Enzyme zu entwickeln, die nicht-natürliche Reaktionen katalysieren.^[17,28] Für ihre Pionierarbeit auf dem Gebiet der gerichteten Evolution an Enzymen erhielt F. A. ARNOLD 2018 den Chemie-Nobelpreis.

1.2 Terpene

Die Terpene stellen mit mehr als 80000 bekannten Verbindungen die größte Klasse sekundärer Naturstoffe.^[29] Der Begriff Terpen leitet sich vom Terpentin ab, aus dem erste Mitglieder der Naturstoffklasse isoliert wurden. Die Terpene stellen zudem die strukturell und chemisch vielfältigste Naturstoffklasse dar, die in allen Bereichen des Lebens vorkommen.^[30] Bereits WALLACH erkannte, dass alle Terpene, trotz ihrer strukturellen Komplexität, auf C₅-Isoprenuntereinheiten zurückgeführt werden können, weshalb die Terpene auch als Isoprenoide bezeichnet werden.^[31,32] RUZICKA formulierte darauf aufbauend 1953 die biogenetische *Isopren-Regel*, in denen er lineare allylische Diphosphate als Vorläufer der Terpene beschrieb.^[33]

Terpene sind Bestandteil von Pflanzen, in denen sie als Lockstoffe, Repellents oder als Antimykotika fungieren. Insekten metabolisieren aufgenommene Terpene zu Hormonen oder Pheromonen, die als Signalstoffe oder Sekret dienen. In Säugetieren sind Terpene in Stoffwechselprozessen eingebunden und agieren als Regulatoren enzymatischer Reaktionen. Weiterhin können sie Bestandteile von Zellmembranen sein.^[34,35,30] Auch Pilze und marine Organismen sind in der Lage eine Vielzahl von komplexen Terpenen zu bilden. Marine Terpene zeichnen sich dabei durch eine ungewöhnliche Diversität aus und enthalten oftmals Substituenten, die nur selten in der Natur anzutreffen sind. So weisen bspw. in Algen enthaltene Terpenoide chlorierte oder auch bromierte Substituenten auf, während in Schwämmen Terpenoide mit

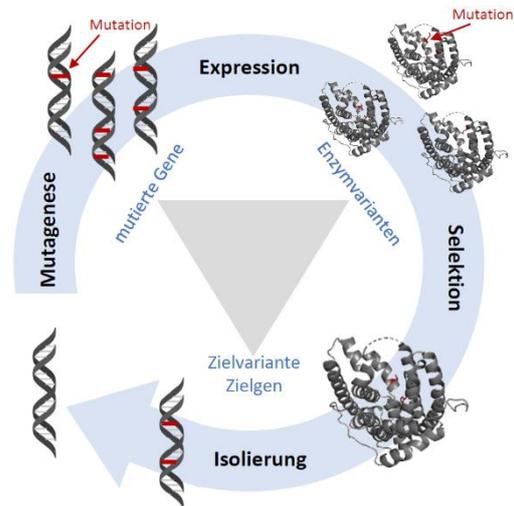


Abbildung 1: Schematische Darstellung der gerichteten Evolution beginnend mit der zufälligen Mutagenese, gefolgt von der Expression in einem Wirtorganismus und Selektion durch ein Hochdurchsatzverfahren von verbesserten Enzymvarianten. Anschließend erfolgt die Isolierung des Gens, welches für den nächsten Zyklus eingesetzt wird.^[25]

Isonitril- und Isothiocyanat-Substituenten nachgewiesen wurden.^[36] Viele Terpene sind von wirtschaftlicher Bedeutung.^[34] Durch ihre ansprechenden Olfaktorik, ihre antimikrobielle und insektizide Wirkungen, ihrem Einsatz als Therapeutika in der Krebstherapie sowie als Bausteine für die Synthese neuer Verbindungen erfahren Terpene eine steigende kommerzielle Aufmerksamkeit (**Abbildung 2**).^[35]

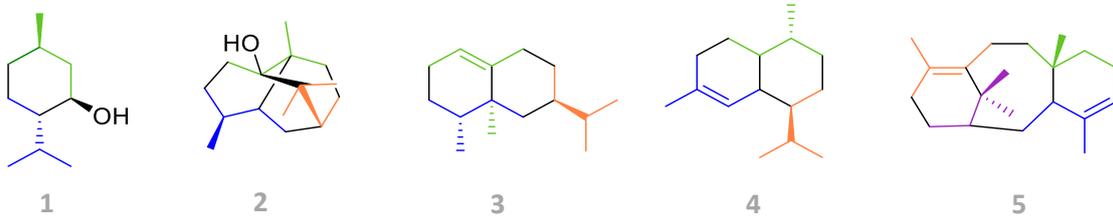
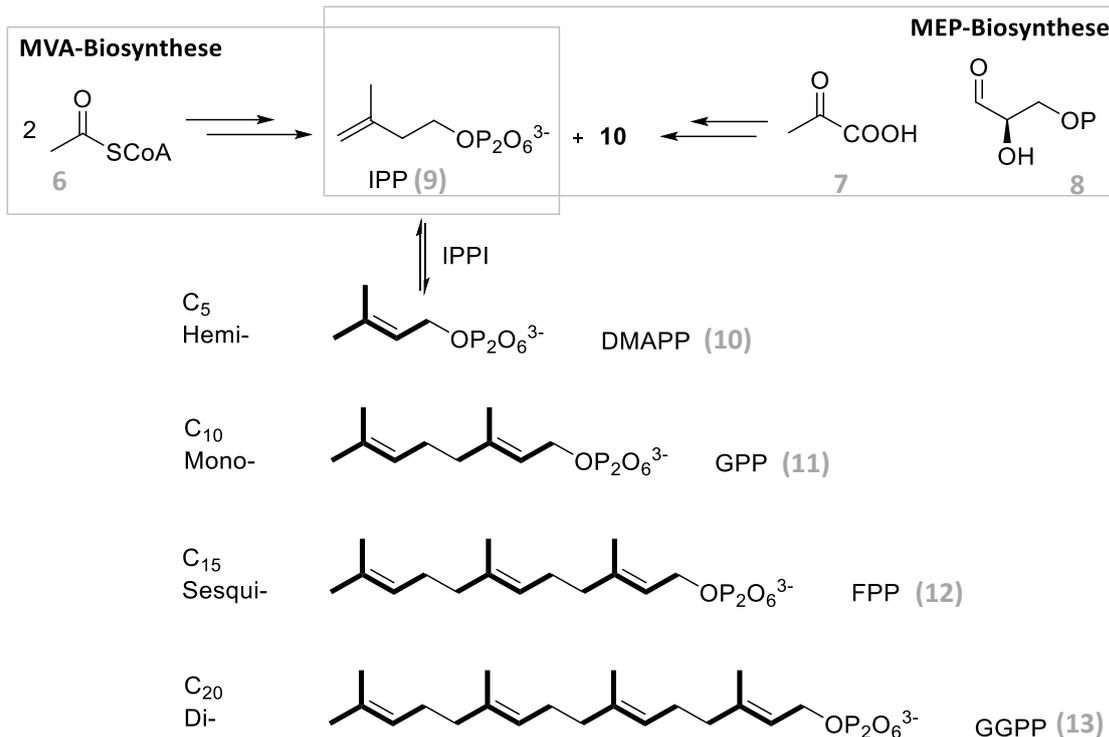


Abbildung 2: Ausgewählte Mono-, Sesqui- und Diterpene mit wirtschaftlichem Nutzen. Farblich markiert sind die jeweiligen Isopreneinheiten. (–)-Menthol (**1**) wird aufgrund seines frischen, süßen und minzigen Geruchs in der Lebensmittelchemie eingesetzt. Das Sesquiterpen Patchoulol (**2**) ist wegen seines charakteristischen holzigen Geruchs einer der wichtigsten Rohstoffe der Parfümindustrie. (+)-Valencen (**3**) wird in der Industrie für die Produktion des Grapefruitaromas (+)-Nootkaton verwendet. Amorpha-4,11-dien (**4**) ist der biogenetische Ausgangsstoff des Malaria-Medikamentes Artemisinin (**93**), während das Diterpen Taxa-4,11-dien (**5**) der Vorläufer des Zytostatika Taxol ist.^[2,37]

Die Biosynthese der Terpene kann in drei Abschnitte eingeteilt werden^[38], beginnend mit der Biosynthese der isoprenoiden Bausteine Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Neben dem Mevalonatweg (MVA), welcher durch CLAISEN Kondensation zweier Acetyl-Coenzym A Moleküle (**6**) initiiert wird, wurde in den 1990er Jahren ein zweiter Biosyntheseweg identifiziert. Der Methylerythritol-Phosphatweg (MEP) nutzt als Ausgangspunkt Pyruvat (**7**) und D-Glyceraldehyd-3-Phosphat (**8**), die durch Verlust von Kohlenstoffdioxid unter Katalyse kondensieren.^[39] Der MVA Biosyntheseweg findet aktiv in Eukaryoten, im Cytosol der Pflanzen, in Pilzen und einigen Bakterien sowie in Archaeen statt. Der MEP-Weg findet sich hingegen in Cyanobakterien, Grünalgen und in den Chloroplasten höherer Pflanzenarten, sodass in Letzteren die beiden Biosynthesewege räumlich getrennt und voneinander unabhängig stattfinden.^[40] Im Fall des MVA-Weges ist eine Isopentenyldiphosphat Isomerase (IPPI) essentiell, die das entstehende IPP (**9**) zu DMAPP (**10**) isomerisiert. Beim MEP-Weg werden hingegen IPP und DMAPP in einem definierten Verhältnis von 5:1 gebildet.^[39] Die Kondensation von DMAPP und IPP zu flexiblen linearen allylischen Diphosphaten erfolgt durch Prenyltransferasen, wobei DMAPP als Startermolekül fungiert und IPP zur Kettenverlängerung genutzt wird (**Schema 1**).^[41] Die Verknüpfung verläuft über Kopf-Schwanz-Kondensation, während bei größeren Terpengerüsten eine Schwanz-Schwanz Verknüpfung bevorzugt wird.^[42] Die endgültige Kettenlänge wird dabei durch aromatische Aminosäurenreste im unteren Bereich der aktiven Tasche bestimmt.^[38] Durch Terpenocyclasen werden die azyklischen Vorläufer anschließend zu komplexen, zyklischen und stereochemisch anspruchsvollen Terpenen umgesetzt.^[38]



Schema 1: Biochemische Edukte des MVA- und MEP-Biosyntheseweges. Während beim MEP-Weg IPP (9) und DMAPP (10) gebildet werden, wird DMAPP beim MVA-Weg nachfolgend durch die IPP-Isomerase produziert. Die Diphosphat Vorläufer werden anhand ihrer Anzahl an C₅-Isoprenbausteinen kategorisiert. So handelt es sich beim Farnesyldiphosphat (FPP) um den Vorläufer der Sesquiterpene. (G = Geranyl, F= Farnesyl, PP= Diphosphat).

1.3 Terpensynthasen

Terpensynthasen katalysieren die komplexesten chemischen Reaktionen in der Natur, bei denen mehr als die Hälfte der vorhandenen Kohlenstoffatome der Isoprenyldiphosphat-Vorläufer Veränderungen hinsichtlich Konnektivität, Hybridisierung und Konfiguration erfahren. Ermöglicht wird dies durch carbokationische Reaktionskaskaden mit hochreaktiven Zwischenprodukten.^[43,44] Da viele der entstehenden Terpene über ein polyzyklisches Grundgerüst verfügen, werden sie auch als Terpenyclasen (TC) bezeichnet.^[38]

Die TC können in zwei Klassen eingeteilt werden, abhängig von der Initialisierung der Reaktionskaskade, der Faltung des Proteins sowie den hochkonservierten Motiven. Klasse I Terpensynthasen weisen dabei strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit den Prenyltransferasen auf, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen lässt.^[43] Die aktive Tasche der Klasse I Terpensynthasen, zu denen Mono-, Sesqui- und einige Diterpene zählen, befindet sich in der Mitte eines α -helikalen Bündels. Sie verfügen über zwei hoch konservierte Metall-Bindemotive die sich auf den Helices D und H befinden. Das aspartatreiche DDXXD-Motiv, welches identisch zur Sequenz der Prenyltransferasen ist, sowie das NSE/DTE-Motiv mit der Konsensussequenz **(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXE**.^[29,45] Die beiden Motive richten einen trinuklearen Magnesiumcluster aus, der für die Koordinierung und Ausrichtung des Substrates verantwortlich ist. Hierbei bindet zunächst ein Magnesium Ion an das NSE/DTE-Motiv, wodurch die Substrat-Enzym Bindung initiiert wird. Die nachfolgende Bindung der zwei weiteren Metallionen an das DDXXD-

Motiv vervollständigt den dreikernigen Magnesiumcluster und trägt zur Schließung der aktiven Tasche und Ausbildung des Michaelis-Menten-Komplexes bei (**Abbildung 3**).^[46] Durch eine Effektortriade erfolgt anschließend die Abstraktion des Diphosphats und Bildung eines Allylkations.^[47] Im Gegensatz dazu zählen Triterpene zu den Klasse II Terpensynthesen, dessen aktives Zentrum sich an der Schnittstelle zweier α -helikalen Domänen befindet. Die Bildung des tertiären Carbokations erfolgt durch Protonierung der terminalen Doppelbindung oder einer Epoxideinheit. Das zentrale Aspartat des hochkonservierten DXDD Motivs agiert dabei als katalytische Säure.^[38,29,39]

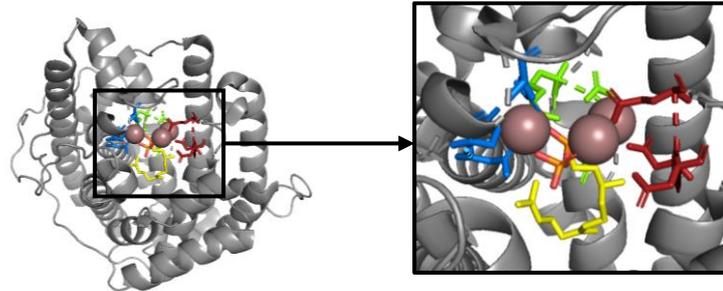


Abbildung 3: Kristallstruktur der bakteriellen Selina-4(15),7(11)dien Synthase aus *Streptomyces pristinaespiralis* in der geschlossenen Konformation mit komplexiertem trinuklearen Magnesiumcluster (rosa) und dem unnatürlichen Substrat 2,3-Dihydrofarnesyl-diphosphat (DHFPF) (Farnesyl: gelb, Diphosphat: orange-rot).^[47] Farblich hervorgehoben sind die Metallbindemotive DDXXE (rot) und NSE (blau) sowie die Effektortriade (grün).

1.3.1 Induced-Fit-Mechanismus

Die Substratumsetzung von bakteriellen, pflanzlichen und pilzlichen Klasse-I-Terpensynthesen beruht auf einem Induced-Fit Mechanismus. Infolge der Substratbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und der damit verbundenen Schließung der aktiven Tasche. Entscheidend hierfür ist eine hochkonservierte Effektortriade, bestehend aus einem Diphosphat-sensor, einem Linker und einem Effektor. Diese ist auf der G1-Helix nahe des Helixbruchmotivs lokalisiert bzw. in pflanzlichen Synthesen auf der Helix H. Der Diphosphatsensor erfährt durch die Substratbindung eine Reorientierung, wodurch zwei Wasserstoffbrücken zum Diphosphatrest ausgebildet werden. Zeitgleich kommt es zu einer weiteren Wasserstoffbrückenausbildung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Linkers und dem Sensor. Durch die Koordination kommt es zu einer Drehung der Helix, die eine vollständige Neuausrichtung des gesamten G1/2-

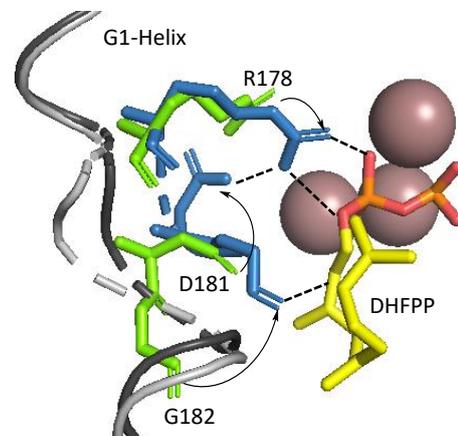
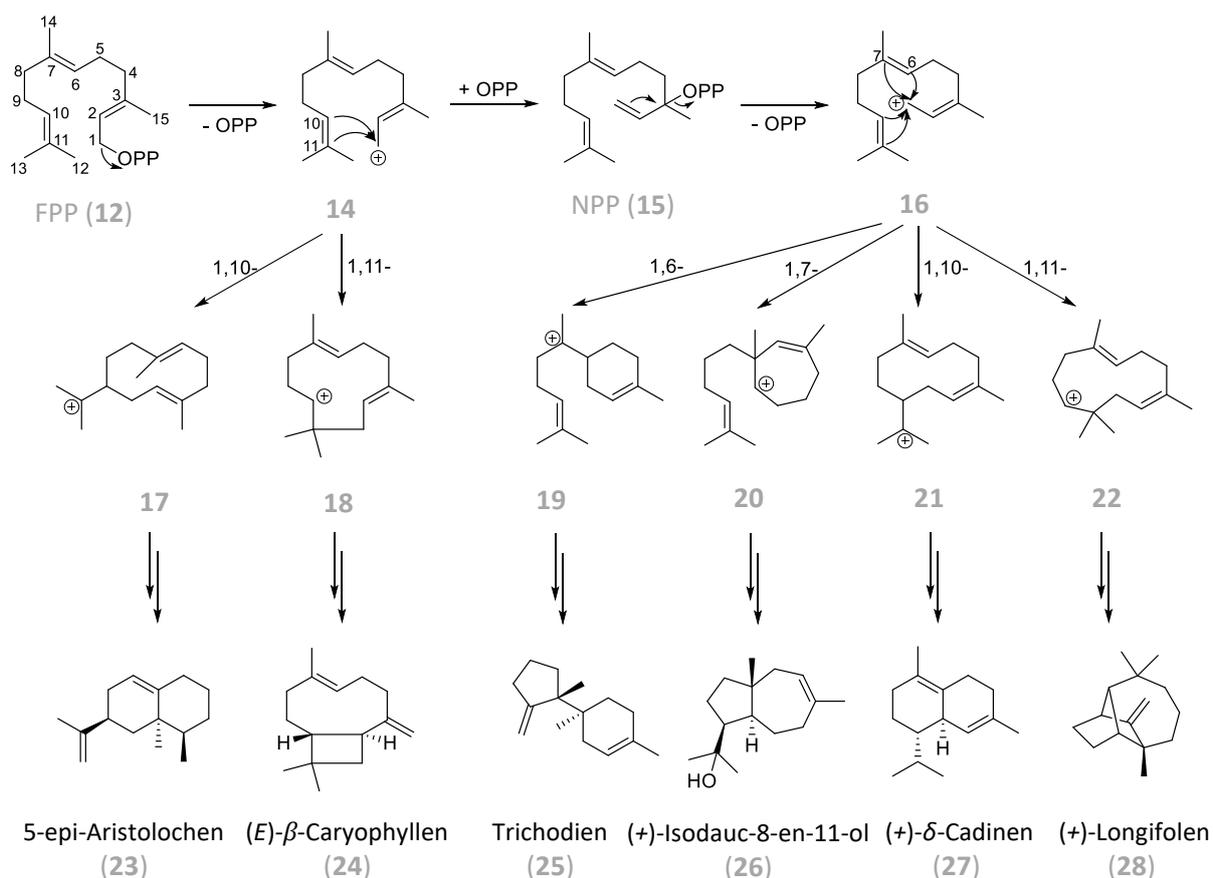


Abbildung 4: Darstellung des Induced-Fit Mechanismus anhand der bakteriellen Selina-4(15),7(11)-dien-Synthase mit Konformationsänderung des G1/2-Helixbruchmotivs. Durch Überlagerung der apo-Konformation (hellgrau, 4OKM) mit der geschlossenen Konformation (dunkelgrau, 4OKZ) als Komplex mit dem Magnesiumcluster (rosa) und 2,3-Dihydrofarnesyl-diphosphat (gelb, DHFPF) wird die Neuorientierung (Pfeile) der Effektortriade (offen: grün, geschlossen: blau) sichtbar. Durch die Konformationsänderungen werden Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht (gestichelte Linien).

Helixbruchmotivs² auslöst. Infolgedessen verschiebt sich auch der Effektor, sodass dessen katalytisch aktiver Carbonylsauerstoff mit dem freien Elektronenpaar direkt auf die C3-Position des Substrates ausgerichtet ist (**Abbildung 4**). Resultierende Wechselwirkungen mit dem π^* Molekülorbital der 2,3-Doppelbindung führen zur Abspaltung des Diphosphats und der Ausbildung des Allylkations.^[47]

1.3.2 Zyklisierungsmöglichkeiten des Farnesylikations

Das entstehende Allylkation durchläuft im Anschluss eine carbokationische Kaskade, bei der die Kontur der aktiven Tasche als Templat agiert. Durch die Koordination des Substrates an den Metallionencluster erfolgt die Ausrichtung in der aktiven Tasche, sodass das Substrat und die Zwischenprodukte durch Stabilisierung von ausgewählten Aminosäuren der aktiven Tasche jene Konformation einnehmen, die zur Bildung des korrekten Produktes führen.^[29] Im Falle der Sesquiterpensynthesen (STC), welche im Fokus dieser Arbeit stehen, hat das resultierende Farnesylikation nach Abspaltung des Diphosphats sechs Möglichkeiten zur Zyklisierung, was zur Steigerung der Produktdiversität der Sesquiterpene gegenüber den Monoterpenen beiträgt (**Schema 2**).^[39,48]



Schema 2: Ionisierung von FPP (**12**) und Isomerisierung zum NPP (**15**) sowie der erste Zyklisierungsschritt in der carbokationischen Reaktionskaskade der Sesquiterpensynthesen zu den Zwischenprodukten **17-22**. Durch weitere Zyklisierungen, Umlagerungen sowie Methyl- und Hydrid-Shifts werden die Sesquiterpene **23-28**, ausgehend von der ersten Zyklisierung, erhalten.

² Im Falle von bakteriellen und pflanzlichen Klasse-I-Terpencyclasen.

Durch eine direkte Zyklisierung des Farnesylkations (**14**) mit der terminalen Doppelbindung, wird eine 1,10- und 1,11-Zyklisierung zum (*E,E*)-Germacradienylkation (**17**) und (*E,E*)-Humulylkation (**18**) eröffnet. Die *transoide* Konfiguration der C2-C3-Doppelbindung stellt hierbei aufgrund der entstehenden Ringgröße kein Hindernis dar, wohl aber im Hinblick auf eine 1,6- bzw. 1,7-Zyklisierung mit der zentralen Doppelbindung.^[49] Diese geometrische Einschränkung kann durch den nucleophilen Angriff des Diphosphats an C3 und der resultierenden Isomerisierung des *transoiden* Farnesylkations zum *cisoiden* (*E*)-Nerolidyldiphosphat (NPP, **15**) überwunden werden.^[30] Durch die Isomerisierung wird eine freie Drehbarkeit um die C2-C3-Einfachbindung erreicht, die nach erneuter Abspaltung des Diphosphats (-OPP⁻) den nucleophilen Angriff der zentralen Doppelbindung auf das tertiäre Nerolidylkation (**16**) ermöglicht und mit der Bildung des 1,6-Bisabolylkations (**19**) oder des weniger verbreiteten 1,7-Cycloheptakations (**20**) einhergeht.^[39,48] Alternativ besteht zudem auch die erneute Zyklisierungsmöglichkeit mit der terminalen Doppelbindung, die zu 1,10- bzw. 1,11-(*E,Z*)-konfigurierten Zwischenprodukten (**21,22**) führt. Durch Einsatz von isotopenmarkierten FPP-Derivaten kann anhand der stereochemischen Veränderung an C1 bestimmt werden, ob die Reaktionskaskade über die direkte Zyklisierung oder die primäre Isomerisierung verläuft.^[30] Damit eine Zyklisierung stattfindet, ist es jedoch unabdingbar, dass die erforderliche Geometrie zur Interaktion durch eine korrekte π -Orbitalausrichtung der relevanten Doppelbindung erreicht wird.^[50]

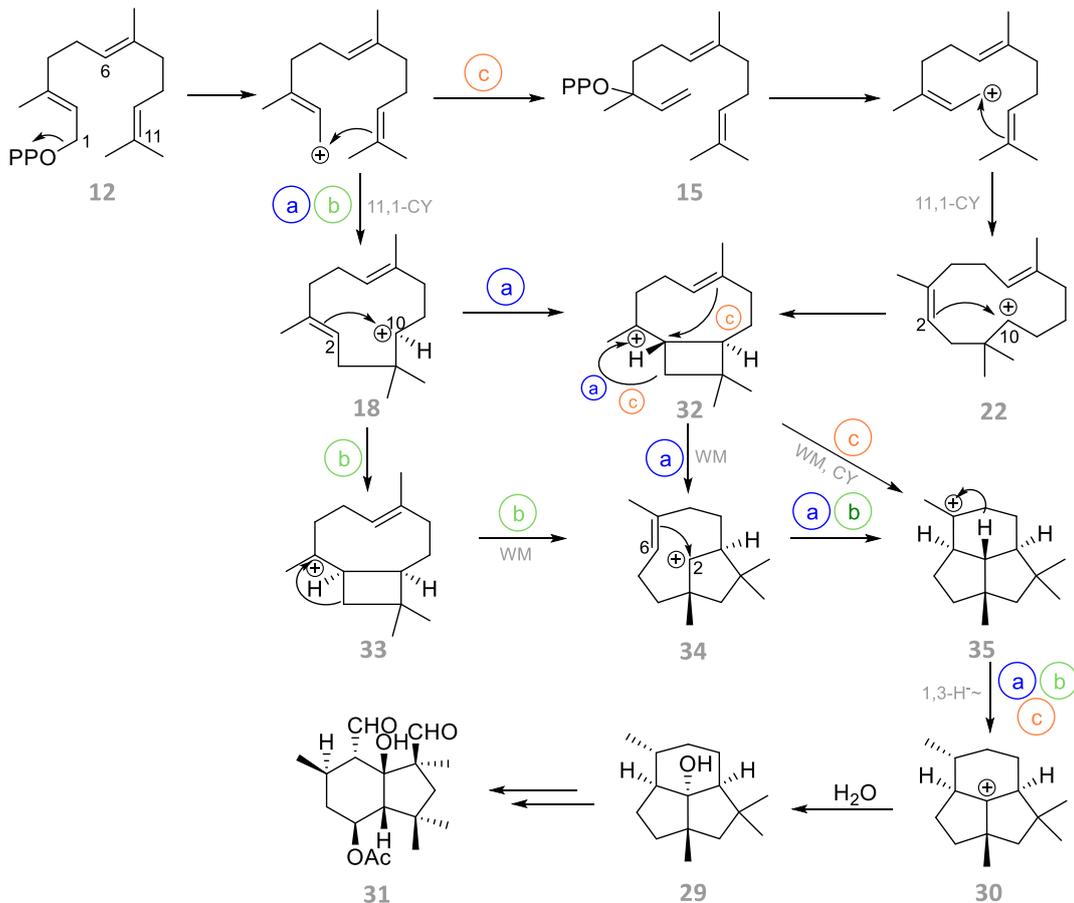
Weitere nachfolgende Zyklisierungen können durch den nucleophilen Angriff einer der beiden verbliebenen Doppelbindungen erfolgen, wodurch eine Vielzahl verschiedenster Grundgerüste geschaffen wird. Die Chemodiversität wird zudem durch Umlagerungen, Hydrid-Shift, WAGNER-MEERWEIN-Umlagerungen und Methyl-Shifts erweitert, was eine Nachverfolgung der Reaktionsmechanismus erschwert, insbesondere bei Terpensynthesen, die lediglich ein Produkt herstellen.^[30,49] Einzigartig ist zudem auch die Bildung von neutralen Intermediaten innerhalb der komplexen Reaktionskaskade.^[44,49] Im Hinblick auf die kationischen Zwischenprodukte haben quantenmechanische Studien gezeigt, dass allylische und tertiäre Carbokationen gegenüber sekundären Kation bevorzugt infolge von Hyperkonjugation gebildet werden.^[51] Durch Deprotonierung oder Addition eines Nucleophils, meist Wasser, wird die Reaktionskaskade beendet und das Produkt aus der aktiven Tasche freigegeben.^[49]

Im Nachfolgenden wird auf die postulierten Reaktionsmechanismen, der in dieser Arbeit verwendeten STCn Presilphiperfolan-8 β -ol Synthase (BcBOT2) aus *Botrytis cinerea* und der Pentalenen Synthase (PenA) aus *Streptomyces exfoliatus* UC5319 genauer eingegangen.

1.3.3 Presilphiperfolan-8 β -ol synthase BcBOT2

Presilphiperfolan-8 β -ol (PSP, **29**) wurde erstmals 1981 von BOHLMANN aus den Pflanzengattungen *Eriophyllum staechadifolium* und *Flourensia heterolepis* isoliert.^[52] PSP (**29**) zeichnet sich durch ein kompaktes Tricyclo[5.3.1.0]undecan-Grundgerüst aus, dessen kationisches Intermediat (**30**) als Vorläufer für eine Vielzahl von weiteren trizyklischen Kohlenwasserstoffen angenommen wird.^[53] Die STC BcBOT2 wurde hingegen aus dem Grauschimmelpilz *Botrytis cinerea* als Teil des Genclusters zur Botrydial Biosynthese isoliert, wobei PSP (**29**) als Zwischenprodukt bei der Bildung des Phytotoxins Botrydial (**31**) fungiert.^[54,55]

Für den Biosyntheseweg des PSP (**29**) wurde bisher kein eindeutiger Mechanismus beschrieben. Allerdings wurde das Terpen zusammen mit weiteren Sesquiterpenen, wie β -Caryophyllen isoliert, die Rückschlüsse auf die biosynthetische Reaktionskaskade ermöglichen.^[52,56] Ein postulierter Mechanismus von BOHLMANN wurde durch Arbeiten von HANSON und CANE weiter verfeinert (**Schema 3**). Ausgehend von der Abspaltung des Diphosphats und einer direkten 1,11-Zyklisierung zum (*E,E*)-Humulylkation (**18**), wird ein weiterer 2,10-Zyklisierungsschritt zu **32** bzw. **33** angenommen, gefolgt von einer WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung zur Ringerweiterung (**34**) und einer erneuten 2,6-Zyklisierung zu **35**. Der nachfolgende 1,3-Hydrid-Shift zu **30** konnte durch die Verwendung von isotoopenmarkierten FPP-Derivaten nachgewiesen werden.^[57,58] Die Addition von Wasser beendet die Reaktionskaskade. Über die Verknüpfung des intermediären Cyclobutylringes (**32/33**) herrscht allerdings weiterhin Uneinigkeit, da über isotoopenmarkierte Substrate lediglich die Konfiguration des Protons H10 festgelegt werden konnte.^[59] Während HANSON (Weg a) eine *trans*-Verknüpfung und Bildung des Caryophyllenyl-Kations (**32**), auf Grundlage des Isolationsproduktes von β -Caryophyllen (**24**) vorschlägt, nimmt CANE (Weg b) die Bildung eines 2-*epi*-Caryophyllenyl-Kations (**33**) an.^[57,59] Letzteres würde hingegen in der Bildung von 2-*epi*-Caryophyllen resultieren, dessen natürliche Existenz bereits von HINKLEY in einer anderen Pflanzengattung nachgewiesen wurde.^[60] Quantenmechanische Ringschluss-Berechnungen von TANTILLO (Weg c) eröffnen zudem einen weiteren Reaktionsweg, welcher von einer Isomerisierung zum NPP (**15**) ausgeht und durch eine 1,11-Zyklisierung das (*Z*)-konfigurierte Humulylkation (**22**) ausbildet.^[61] Die nachfolgende 2,10-Zyklisierung führt, analog zum Mechanismus von HANSON, zur Bildung des Caryophyllenyl-Kations (**32**). Anstelle der Bildung des energetisch ungünstigen sekundären Kations (**34**) postuliert TANTILLO jedoch eine hochkonservierte Kation-Alken-Zyklisierung zu Intermediat **35**^[51,61], ehe durch die 1,3-Hydridverschiebung und die Addition von Wasser das Presilphiperfolan-8 β -ol gebildet (**29**) wird. Die absolute Stereochemie des PSP (**29**) wurde mittels Röntgenkristallographie und einer enantioselektiven Totalsynthese bestätigt.^[62,63]



Schema 3: Postulierte Mechanismen von HANSON (Weg a), CANE (Weg b) und TANTILLO (Weg c) zur Biosynthese von PSP (**29**) durch das Enzym BcBOT2 ausgehend von FPP (**12**).^[57,59,61] CY: Zyklisierung, WM: WAGNER-MEERWEIN Umlagerung, H⁺: Hydridshift.

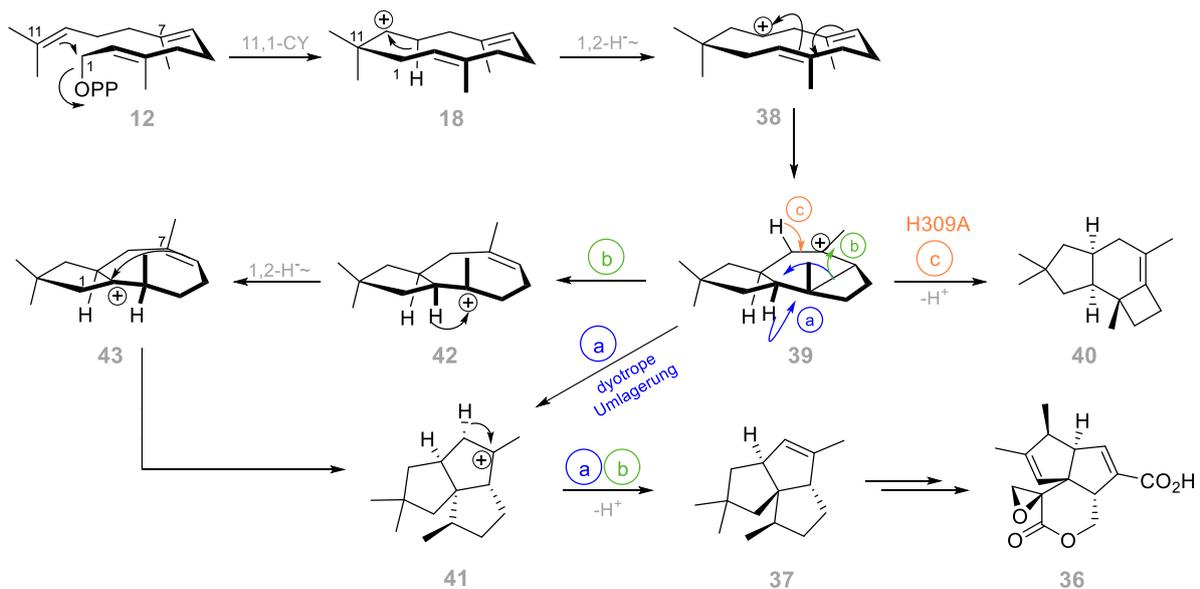
1.3.4 Pentalenen Synthase PenA

Die bakterielle Pentalenen Synthase PenA wurde erstmals von der Arbeitsgruppe D. E. CANE aus *Streptomyces exfoliatus UC5319*³ isoliert und gilt als eine der ersten charakterisierten TC.^[64,65] PenA ist Teil des Genclusters zur Biosynthese von Pentalenolacton (**36**), einem antibiotischen Metaboliten, der sowohl in der Human- und Veterinärmedizin als auch in der landwirtschaftlichen Nutzung Anwendung findet und durch eine Vielzahl von Streptomyceten produziert wird.^[48,66] Das Produkt der STC PenA ist das Sesquiterpen Pentalenen (**37**), welches eine trizyklische [6.3.0.0]-Kernstruktur aufweist und erstmals 1957 als natürliches Produkt aus *Streptomyces rosegriseus* isoliert wurde^[67,68]. Pentalenen (**37**) gilt als Stammkohlenwasserstoff der Pentalenolactone und bietet somit einen Ausgangspunkt für die Antibiotikaforschung, weshalb dessen enantioselektive Totalsynthese bereits mehrfach beschrieben wurde.^[68–70]

Der allgemein akzeptierte Biosyntheseweg (**Schema 4**) zum Pentalenen (**37**) beruht auf Ergebnissen mit isotoopenmarkierten FPP-Derivaten sowie quantenmechanischen Berechnungen und beginnt mit einer direkten 1,11-Zyklisierung nach Abspaltung der Diphosphats zum (E,E)-Humulylkation (**18**). Eine primäre Isomerisierung zum NPP (**15**) kann hingegen aufgrund einer Inversion am C1-

³ Der bakterielle Stamm wurde in älteren Publikationen zunächst nur als *Streptomyces UC5319* bezeichnet.

Kohlenstoff des FPP (**12**) ausgeschlossen werden.^[74] Ein 1,2-Hydridshift führt zur Ausbildung eines sehr hochkonjugierten sekundären Cyclopropylcarbinyl-Kations (**38**), welches sich in einer konzertierten Reaktion zum Protoilludylkation (**39**) umlagert.^[48,72] Eine zunächst angenommene Deprotonierungs-Protonierungssequenz anstelle des 1,2-Hydridshifts konnte aufgrund einer fehlenden Basenwirkung durch ortsspezifische Mutagenesestudien ausgeschlossen werden.^[73–75] Das Protoilludylkation (**39**) stellt ein Schlüsselintermediat in der carbokationischen Kaskade der Pentalenen-Biosynthese dar, dessen Existenz durch isotoopenmarkierte Studien mit der Mutante H309A belegt werden konnte, die das natürliche Produkt Δ^6 -Protoilluden (**40**) als Nebenprodukt erzeugte (Weg c).^[73] Basierend auf quantenmechanischen Überlegungen sind ausgehend von **39** zwei mechanistische Wege zum Pentalenen (**37**) denkbar. So könnte sich eine konzertierte Typ 1 dyotrope Umlagerung zum Kation **41** anschließen, bei der es zu einer nacheinander stattfindenden Migration einer Methylgruppe und eines Protons kommt (Weg a). Eine dyotrope Umlagerung erzeugt jedoch eine hohe Energiebarriere, was eine selektive Stabilisierung des Übergangszustandes durch die vorhandenen elektronenreichen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan der aktiven Tasche bedingt. Auch eine Stabilisierung von energetisch ungünstigen Carbokationen sowie 1,2-Hydridshifts durch das freie Elektronenpaar der Aminosäuren-Stickstoffatome ist denkbar, wie es bei dem zweiten postulierten Biosyntheseweg vorgeschlagen wird (Weg b).^[76] Dieser basiert auf einer Ringöffnung des Cyclobutylrings von **39**, sodass das (*Z*)-Isomer des Secoilludylkations (**42**) gebildet wird, welches anschließend einen 1,2-Hydridshift zu **43** und eine weitere Zyklisierung zu **41** erfährt. Dadurch liegt ein zweistufiger Prozess vor und der energiereiche Übergangszustand der dyotropen Umlagerung wird vermieden. Welcher der beiden Mechanismen von der STC PenA genutzt wird wurde bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt. Eine stereoselektive Deprotonierung führt jedoch in beiden Fällen zur Beendigung der Reaktionskaskade zur Bildung des Pentalenen (**37**).^[72,76]



Schema 4: Postulierter Mechanismus für die Biosynthese des Pentalenen (**37**) durch PenA mit den auf quantenmechanischen Berechnungen basierenden Reaktionskaskaden (Weg a und Weg b) des Protoilludylkations (**39**). Weiterhin ist das Nebenprodukt Δ^6 -Protoilluden (**40**) der Mutagenesestudien mit der Variante H309A abgebildet (Weg c). CY: Zyklisierung, H⁺: Hydridshift, -H⁺: Deprotonierung.

Die Kristallstruktur der STC PenA aus *Streptomyces exfoliatus* UC5319 wurde durch LESBURG beschrieben (**Abbildung 5**).^[77] Anhand derer zeigt sich, dass die aktive Tasche von PenA im unteren Bereich einen hydrophoben Charakter aufweist, während im oberen Bereich hydrophilere Aminosäuren angesiedelt sind. Durch ortsspezifische Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren D80, D81 und N219 der Metallbindemotive essentiell für die Enzymfunktionalität sind und die aromatischen Aminosäuren F76 und F77 als auch N219 stabilisierend auf die carbokationischen Intermediate wirken.^[48,73] Eine mögliche Basenwirkung von H309 und W308 bei der finalen Deprotonierung konnte hingegen ausgeschlossen werden.^[73,78] Stattdessen wird angenommen, dass das in der aktiven Tasche gebundene Diphosphat als mögliche Brønsted Base agieren könnte.^[79]

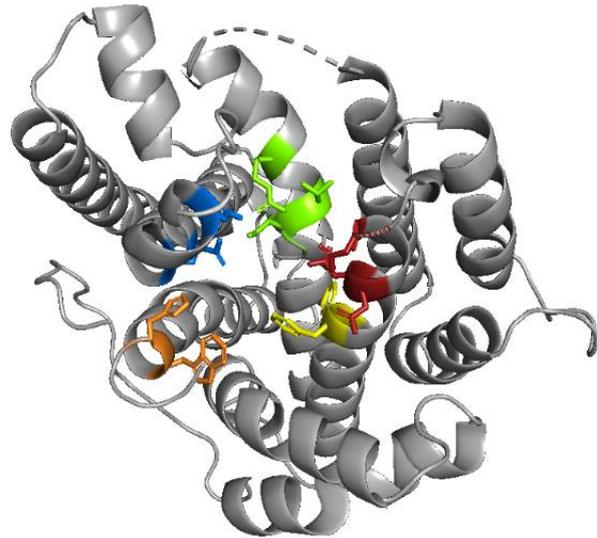


Abbildung 5: Kristallstruktur der Pentalenen Synthase aus *Streptomyces exfoliatus* UC5319 in der offenen Konformation. Farblich markiert sind die Metallbindemotive DDxxD (rot) und NSE (blau) sowie die Effektortriade (RTI, grün). Zudem sind die potentiellen aktiven Basen W308 und H309 (orange) und die aromatischen Aminosäuren F76 und F77 (gelb) eingefärbt.^[69,66]

1.4 Einfluss von Aminosäuren der aktiven Tasche

Die enzymatische Reaktion findet in der aktiven Tasche des Enzyms statt, in der die Bindung des Substrates, die Stabilisierung der carbokationischen Intermediate und schlussendlich die Freigabe des gebildeten Produktes erfolgt.^[15] TCn weisen, mit Ausnahme der polaren Metallbindemotive, eine hydrophobe aktive Tasche mit aromatischen und aliphatischen Resten auf, die das aktive Zentrum konturieren.^[77] Die Kontur der aktiven Tasche agiert dabei als Templat und gestattet nur jene Konformation von Substrat und Zwischenprodukten, die zur Bildung des korrekten Produktes führen. Hierbei weisen nur ausgewählte Aminosäuren eine direkte Wechselwirkung mit dem Substrat auf, während andere Aminosäuren lediglich für die Größe und Struktur der aktiven Tasche verantwortlich sind.^[15,29]

Während einige TCn über eine bemerkenswerte Spezifität verfügen und eine sehr hohe stereochemische Präzision aufweisen, verfügen andere über eine ausgeprägte Produktpromiskuität.^[29] Multiproduktsynthasen weisen dabei meist eine vergrößerte aktive Tasche auf, die dem Substrat eine höhere konformative und auch räumliche Flexibilität ermöglicht, wodurch alternative Reaktionspfade eröffnet werden.^[49,80–82] Eine Stabilisierung der kationischen Intermediate erfolgt durch polare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Ladungs-Dipol-, Ladungs-Quadrupol- oder auch Kationen- π -Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren.^[29] Eine wichtige Stellung nehmen dabei die aromatischen Aminosäuren ein, die durch den Phenylring eine elektrostatische Stabilisierung erzeugen können.^[83] Hierbei ist allerdings eine exakte Geometrie der aromatischen Reste zu dem Carbokation maßgeblich.^[73] Durch die

insgesamt in der aktiven Tasche vorliegenden negativen elektrostatischen Oberflächenpotentiale werden Übergangszustände stabilisiert, die ohne das Vorhandensein des Enzyms energetisch ungünstig sind, wie die Bildung der Anti-MARKOVNIKOV-Produkte **18** und **22** der 1,11-Zyklisierung des Farnesyl- bzw. Nerolidylkations (**Schema 2**).^[84,44]

Für die Identifikation relevanter Aminosäuren und deren Funktion eignet sich die ortsspezifische Mutagenese. Die Einführung von Mutationsstellen sollte dabei ohne Störung der globalen Proteinfaltung erfolgen, um eine Inaktivierung der Enzyme zu unterbinden.^[15] Die Mutationen können zum einen auf aromatische oder hydrophobe Reste abzielen, die die aktive Tasche konturieren und die Zwischenprodukte entlang eines Reaktionspfades leiten, andererseits können Mutationen an Positionen ausgewählt werden, die entscheidend für die Substratbindung sind oder Einfluss auf den Induced-Fit Mechanismus und die Substratierung nehmen.^[47] So haben zahlreiche Mutagenesestudien mit STCn gezeigt, dass die Metallbindemotive essentiell für die Enzymaktivität sind und eine Veränderung des Produktspektrums hervorrufen können.^[48,45,85] Zudem tragen die aromatischen Aminosäuren neben der Stabilisierung der Carbokationen auch zur korrekten Faltung der Zwischenprodukte bei.^[44,86,87,45] Studien mit den Terpensynthasen Cop4 und Cop6 aus *Coprenius cinerea* zeigten zudem ein direktes Verhältnis zwischen Taschengröße und Produktpromiskuität und ermöglichten die Identifikation von Aminosäuren, die für die pH-Empfindlichkeit von Cop4 verantwortlich sind.^[80,88] Anhand der Hedycaryol Synthase konnte zudem nachgewiesen werden, dass D82 des DDxxD-Motivs an der Wasseraktivierung beteiligt ist.^[89] Eine mögliche Basenaktivität der Aminosäuren Tryptophan und Histidin konnte hingegen durch gezielte Mutagenese für PenA ausgeschlossen werden, während diese bei TEAS für Tryptophan (W273) wahrscheinlich ist.^[90,73] Zudem konnte im Fall von PenA gezeigt werden, dass F77 essentiell für die Bildung des sekundären (*E,E*)-Humulylkation (**18**) ist.^[73]

1.5 Unnatürliche Farnesyldiphosphatanaloga

Während durch die ortsspezifische Mutagenese ausgewählter Aminosäuren deren Funktion für die katalytische Aktivität der TCn ermittelt werden kann, können synthetisch hergestellte unnatürliche Substrate dazu genutzt werden, mechanistische Aspekte der carbokationischen Reaktionskaskade aufzuklären. Die Nutzung nicht-natürlicher Farnesyldiphosphate ermöglicht zudem die Bildung neuer Terpenoide mit höherem Funktionalisierungsgrad und einem von der Isopren-Regel abweichendem Kohlenstoffgrundgerüst. Zudem können unnatürliche Substrate als Inhibitoren fungieren, um Kristallstrukturen der Enzyme in geschlossener Form zu erhalten, die Aufschluss über die Substratkonformation in der aktiven Tasche geben. Zudem können Inhibitoren mit spezifischen strukturellen Eigenschaften dazu genutzt werden, die Reaktionskaskade zu unterbrechen und Intermediat-Analoga freizusetzen, die Rückschlüsse auf carbokationische Zwischenprodukte zulassen.^[91] Hierbei wird sich die Eigenschaft der Enzyme zunutze gemacht, dass viele Enzyme zwar über eine hohe katalytische Selektivität verfügen, gleichzeitig jedoch eine erhöhte Substratpromiskuität aufweisen wodurch sie eine Vielzahl an FPP-Derivaten akzeptieren können.^[6]

So wurden bereits mehrere Aza-Analoga (**49-52**) umgesetzt, um postulierte carbokationische Zwischenstufen zu imitieren. Auch dienten sie neben 12,13-difluoro-FPP (**44**) und Farnesylthiolodiphosphat (**59**) als kompetitive Inhibitoren für die Konformationsanalyse.^[46,92] Weiterhin wurden die Ammonium-Aza-Analoga **54**, **55** und BTAC (**56**) zur Mechanismusaufklärung der primären Zyklisierung als Analoga des Bisabolylkations genutzt.^[93] Das zyklische, nicht-natürliche Farnesylanalogon **53**, Farnesylphosphonophosphat (**60**) und –Phosphonomethylphosphonat (**61**) als auch bromierte und fluorierte Farnesylanaloga (**45-48**) wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften analysiert (**Abbildung 6**).^[94]

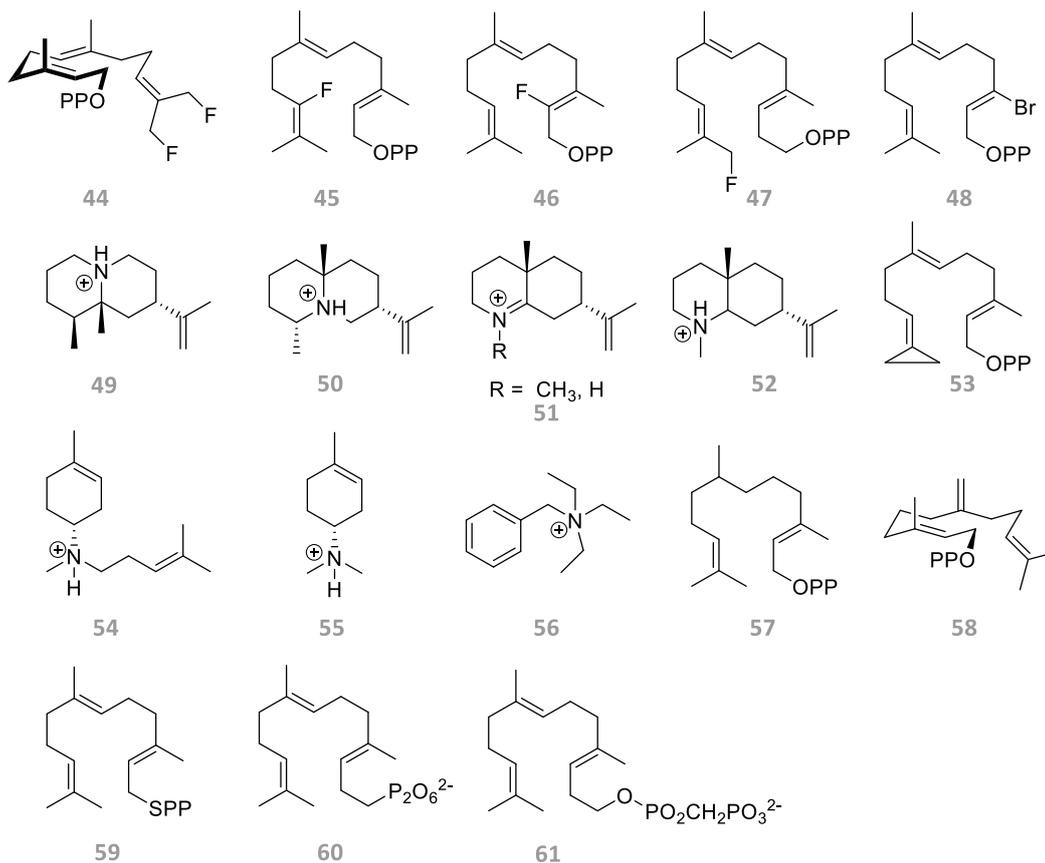
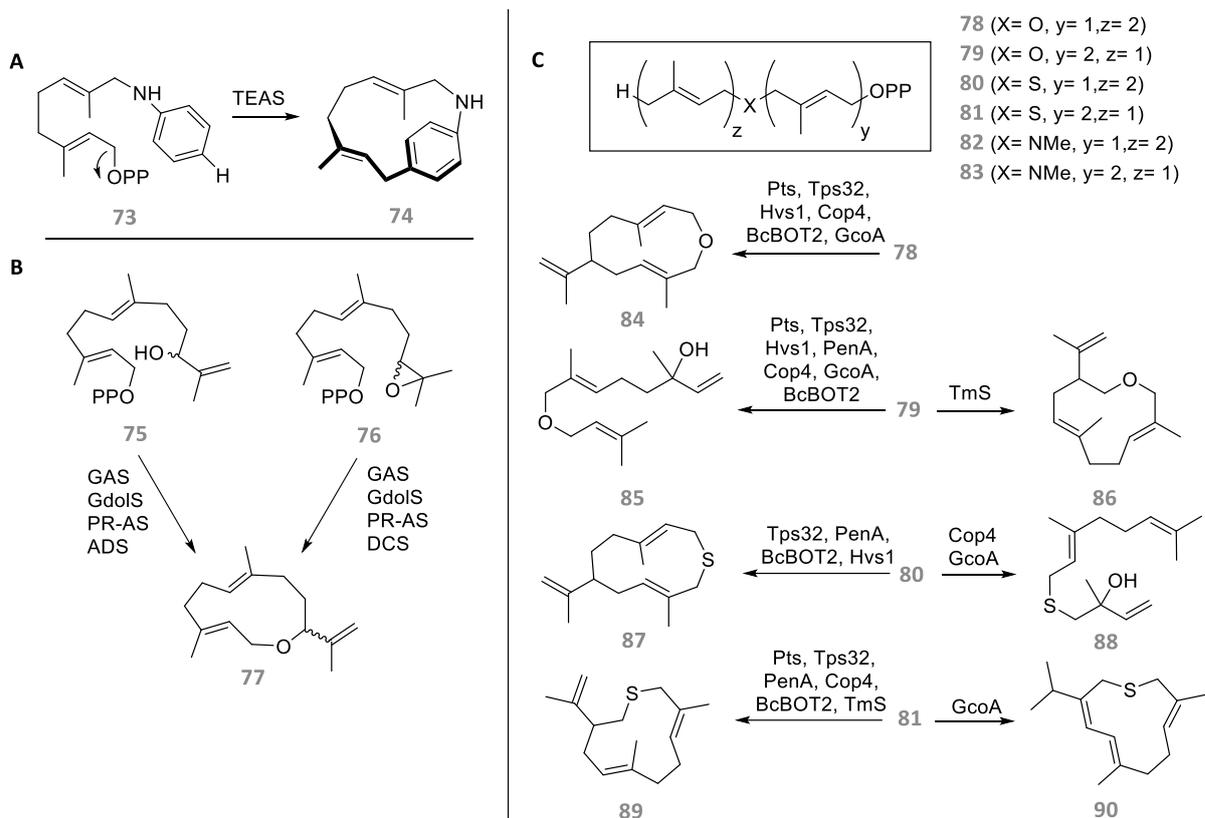


Abbildung 6: Auswahl von unnatürlichen Analoga **44-61** die als Inhibitoren sowie Substrate zur Konformationsanalyse und zur Erstellung von Kristallstrukturen genutzt wurden.

Untersuchungen zur Zyklisierungskaskade erfolgten mit beiden Enantiomeren des unnatürlichen Substrats 6,7-Dihydro-FPP (**57**). Während bei der Trichodiene Synthase die kationische Kaskade bereits vor der primären Zyklisierung aufgrund der fehlenden zentralen Doppelbindung unterbrochen wurde und lediglich azyklische olefinische und allylische Farnesenanaloga detektiert wurden, konnte bei der Aristolochen Synthase (PR-AS) ein 1,10-Zyklisierungsprodukt erhalten werden, welches zusammen mit der Umsetzung von 7-Methylen-FPP (**58**) das Eudesmylkation und Germacren A (**62**) als neutrales Intermediat der Reaktionskaskade bestätigte.^[95,96]

Eine Vielzahl von fluorierten Farnesylanaloga (**44-46,64-66**) wurden genutzt, um die carbokationische Reaktionskaskade von TCn zu unterbrechen. Der Vorteil von Fluoriden ist hierbei, dass sie aufgrund ihrer Größe und Form die Bindungsaffinität nicht beeinträchtigen, gleichzeitig

Auch die Umsetzung des Allylalkohols **75** und des Epoxids **76** erzeugten bei der Umsetzung mit verschiedensten TCn ein neues zyklisches *oxa*-Terpenoid (**77**), bei dem anstelle einer C-C- eine C-O-Bindung während der Zyklisierung ausgebildet wird.^[107] OBERHAUSER nutzte acht verschiedene STCn, welche zunächst heterolog exprimiert und anschließend mit Heteroatom modifizierten Substraten (**78-83**) umgesetzt wurden. Durch Coinjektionsexperimente konnte hierbei gezeigt werden, dass einige der Produkte lediglich von ausgewählten Synthasen produziert wurden, während andere Produkte im Produktspektrum verschiedenster Synthasen detektiert wurden. Zudem zeigten die Studien, dass die Amine **82** und **83** von keiner der STCn akzeptiert wurden, da die Substrate vermutlich über inhibitorische Eigenschaften verfügen (**Schema 6**).^[108]



Schema 6: Ausgewählte Biotransformationen unnatürlicher Substrate. **A)** Biotransformation von Anilino-GPP (**73**), **B)** Transformationen von allyl-Hydroxy-FPP (**75**) und Epoxy-FPP (**76**) durch Sesquiterpencyclasen. ADS: Amorphadien Synthase. **C)** Umsetzungen von Heteroatom-modifizierten Substraten **78-83** mit den nachfolgenden Sesquiterpensynthasen: PenA, BcBOT2, Pts: Patchouliol Synthase, Tps32: Viridifloren Synthase, Hvs1: Vetispiradien Synthase, Cop4: Cubebol Synthase, GcoA: Caryolan-1-ol-Synthase, TmS: (+)-T-Muurolool Synthase.⁴

Von anwendungstechnischer Bedeutung ist die Biotransformation von 12-Hydroxy-FPP (**91**) mit der Amorphadiensynthase (ADS). Als Produkt wird Dihydroartemisininaldehyd (DHAAI, **92**) erhalten, das als Vorläufer des Anti-Malaria-Mittels Artemisinin (**93**) dient. Dies ermöglicht einen neuartigen Syntheseweg des Arzneimittels, der ausgehend von **92** durch vier weitere chemisch-synthetische Schritte gebildet werden kann.^[109] Eine weitere zu erwähnende Anwendung ist die Entwicklung eines kolorimetrischen Hochdurchsatz-Assays der bereits bei der gerichteten Evolution der STC

⁴ Eine weitere Umsetzungen von BcBOT2 mit **78** ist Teil der vorliegenden Dissertation und wird daher unter Kapitel 3.73.9 eingehend erläutert.

BcBOT2 zur Steigerung der Thermostabilität als Screeningmethode genutzt wurde. Die Aktivität des Enzyms kann dabei indirekt über das freigesetzte Methanol des Methyletherderivats **94** bestimmt werden (**Abbildung 7**).^[110]

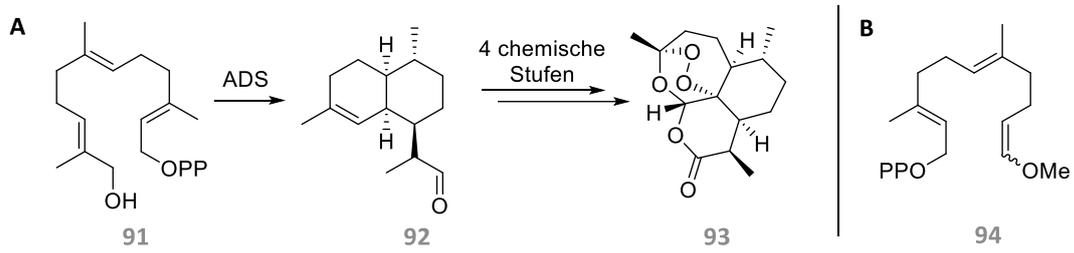


Abbildung 7: Anwendungsbezogene Biotransformationen von unnatürlichen Substraten. **A)** Biotransformation von **91** zu DHAAl (**92**), dem Vorläufer des Anti-Malaria-Mittels Artemisinin (**93**), **B)** Etherderivat **94**, welches als Substrat für einen kolorimetrischen Hochdurchsatz-Assay verwendet wurde.

2 Zielsetzung – Thema I

Terpene sind aufgrund ihrer teils bemerkenswerten olfaktorischen Eigenschaften von hohem Interesse in der Duft- und Aromaindustrie.^[111] Um der steigenden Nachfrage nach neuen Düften und Aromen gerecht zu werden, bietet die biotechnologische Herstellung einen vielversprechenden Ansatz. Terpenzyklen sind in der Lage, die isoprenoiden azyklischen Prenyldiphosphate zu komplexen und zyklischen Terpenen katalytisch zu überführen, die sich durch definierte Konfiguration an den Stereozentren auszeichnen.^[43] Durch die Nutzung von unnatürlichen Prenyldiphosphaten kann die Chemodiversität der Naturstoffklasse erweitert und neue, bisher unbekannte Terpenoide erzeugt werden. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit werden dazu Biotransformationen mit unnatürlichen Farnesyldiphosphaten durchgeführt, die über ein zusätzliches Sauerstoffatom im Kohlenstoffgrundgerüst verfügen oder ein von der Isopren-Regel abweichendes Methylierungsmuster aufweisen (**Abbildung 8**).

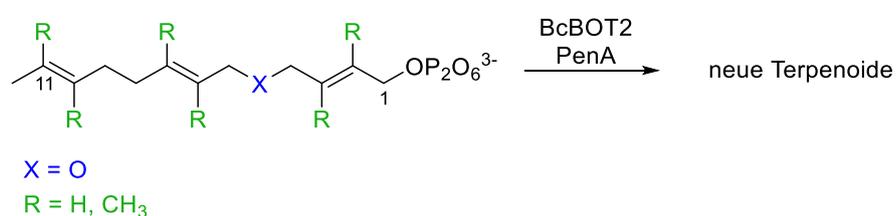


Abbildung 8: In der Promotionsarbeit verwendete unnatürliche Substrate, die ein zusätzliches Sauerstoffatom im Kohlenstoffgrundgerüst oder ein von der Isopren-Regel abweichendes Methylierungsmuster aufweisen.

Als Terpensynthasen werden die STCn BcBOT2 aus *Botrytis cinerea* und PenA aus *Streptomyces exfoliatus* ausgewählt. Diese werden zunächst heterolog exprimiert und die Überexpression und Löslichkeit der Enzyme durch eine SDS-Page verifiziert. Anschließend erfolgt eine Aktivitätsüberprüfung der STCn mit dem natürlichen Substrat Farnesyldiphosphat (FPP). Durch eine Optimierung ausgewählter Reaktionsparameter und Reaktanden soll zunächst die Produktausbeute anhand des natürlichen Substrats FPP erhöht werden. Dazu werden semi-quantitative Bestimmungen mit einem internen Standard durchgeführt.

In einem weiteren Schritt werden die unnatürlichen Farnesyldiphosphat-Analoga in analytischen Enzymtests mit den STCn biotransformiert, um die Substratakzeptanz zu überprüfen. Neu gebildete Produkte werden chromatographisch und massenspektrometrisch charakterisiert und durch eine semi-quantitative Ausbeuteermittlung die Möglichkeiten zur Produktisolierung verifiziert. Durch weitere Optimierungsschritte werden die Enzymtests anschließend auf einen semi-präparativen Maßstab skaliert. Die Hauptprodukte werden mittels GC-MS Analyse charakterisiert und eine NMR-spektroskopische Strukturaufklärung durchgeführt. Die relativen Stereochemien der Verbindungen werden durch ausgewählte NOE-Experimente ermittelt. Zudem werden die sensorischen Profile der unnatürlichen Terpenoide durch eine GC-Olfaktometrie ermittelt. Im Falle von entstehenden Produktgemischen werden die Produkte zunächst durch die Anwendung einer präparativen GC isoliert. Anhand der isolierten und strukturaufgeklärten Terpenoide werden weiterhin postulierte

Biosynthesewege aufgestellt, die ausgehend von den postulierten Biosynthesewegen mit dem natürlichen Substrat FPP formuliert werden.

Ein weiteres Teilprojekt befasst sich mit der semi-synthetischen Umsetzung eines durch Biotransformation erzeugten unnatürlichen Terpenoids. Hierbei werden die Vorteile der Biotechnologie und der chemischen Synthese vereint. Während durch die enzymatische Katalyse innerhalb kürzester Zeit komplexe, zyklische Terpenkohlenwasserstoffe mit definierten Stereozentren ausgebildet werden, ermöglicht die nachfolgende chemische Oxyfunktionalisierung eine einfache Einführung von Sauerstofffunktionalitäten ohne kostenintensive Cofaktoren. Die Semisynthese bietet somit einen weiteren Ansatzpunkt, die Diversität der strukturell anspruchsvollen Naturstoffklasse auf einfache Weise auszubauen.

Neben Biotransformationen mit unnatürlichen Substraten zur Bildung von neuen unbekanntem Terpenoiden wurden zudem ortsspezifische Mutagenesestudien mit der STC BcBOT2 durchgeführt. Dazu wird ein Homologiemodell der STC BcBOT2 erstellt und geeignete Mutationsstellen ausgewählt. Der Fokus liegt hierbei auf Aminosäuren, die durch ihre aromatischen und polaren Reste einen Einfluss auf den Biosyntheseweg des natürlichen Produkts Presilphiperfolan-8 β -ol nehmen könnten, indem sie direkt an der Stabilisierung der carbokationischen Zwischenprodukte oder an Umlagerungen beteiligt sind. Durch den gezielten Austausch von voluminösen Aminosäuren kann zudem die Orientierung und Faltung der Substrate beeinflusst werden. Die hergestellten BcBOT2-Mutanten werden anschließend mit dem natürlichen Substrat FPP umgesetzt. Abweichungen vom Produktspektrum des Wildtyps werden anhand einer GC-MS Analyse identifiziert und die Ausbeuten semi-quantitativ ermittelt. Bei ausreichender Substratazeptanz werden die Produkte isoliert und mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Der Einfluss der vorgenommenen Mutationen auf das Produktspektrum wird im Anschluss durch Aufstellung von postulierten Biosynthesewegen begutachtet.

3 Ergebnisse und Diskussion – Thema I

3.1 Herstellung der Sesquiterpensynthasen BcBOT2 und PenA

Die synthetischen Gene der STCn, dessen Sequenzen auf den Codongebrauch von *Escherichia coli* angepasst sind, wurden als Konstrukt in pUC57 von Genewiz, Inc bezogen. OBERHAUSER amplifizierte diese zunächst in *E. coli* TOP10, ehe die Gene in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert wurden. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* BL21 (DE3).^[112] Kryokulturen des transformierten *E. coli* Stammes dienten als Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation.

3.1.1 Heterologe Expression in *E. coli* BL21 (DE3)

Die Durchführung der heterologen Expression der STCn Gene von BcBOT2 und PenA erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). Der Stamm verfügt in seinem Genom über ein Phagen-Gen für die T7-Polymerase, die durch einen *lacUV5*-Promoter reguliert wird. Zudem sind die Proteasen *Lon* und *OmpT* deaktiviert, um eine Degradation der rekombinanten Proteine zu reduzieren. Der verwendete pET28a(+)-Vektor mit den ligierten Genen weist einen T7/*lac*-Promoter sowie eine *lac*-Operatorsequenz auf. Zudem enthält der Vektor die Kodierungssequenz für den *lac*-Repressor und eine Kanamycin Resistenz zur Selektion. Durch die Kombination des pET-Vektortyps mit dem DE3-Lysogen blockiert der *lac*-Repressor sowohl den *lacUV5*-Promotor als auch den T7/*lac*-Promotor, wodurch eine Basaltranskription ohne Induktion nahezu ausgeschlossen werden kann.^[113] Wird zur Induktion IPTG zugesetzt, so wird der *lacUV5*-Promoter aktiviert, wodurch die Bildung der T7-RNA-Polymerase induziert wird. Diese für den T7-Promoter hoch selektive Polymerase ist nun in der Lage im Expressionsvektor die Gene der STCn zu transkribieren, da diese durch den T7/*lac*-Promoter reguliert werden. In der Biotechnologie wird anstelle von Laktose auf das Galactosederivat IPTG als Induktor zurückgegriffen, welches aufgrund fehlender Metabolisierung nicht verbraucht wird und daher während der Expressionsdauer in konstanter Konzentration vorliegt.^[114,115]

Die heterologe Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.3-0.8 durch die Zugabe von IPTG induziert und die Bakterienkultur anschließend inkubiert. Die optimierten Bedingungen wurden dabei von OBERHAUSER übernommen.^[112] Zur Überprüfung der erfolgreichen Überexpression wurde vor Zugabe des IPTG und nach Abschluss der Kultivierung eine Probe genommen, um die Überexpression der Proteine mittels SDS-PAGE zu überprüfen. Während vor der IPTG Zugabe keine charakteristischen Banden beobachtet wurden, zeigten die Proben nach der für beide STCsn eine Bande im Bereich der zu erwartenden Größe der Proteine⁵,

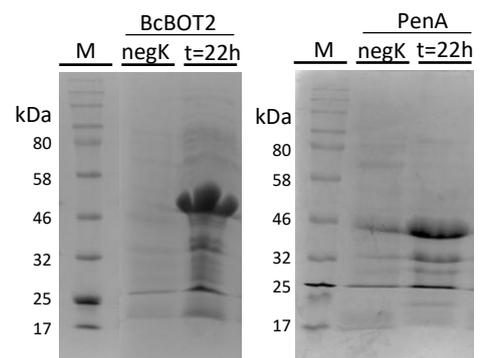


Abbildung 9: SDS-Page der *E. coli*-BL21 (DE3)-Hauptkulturen der heterologen Expression vor der Induktion mit IPTG (negK) und nach einer 22-stündigen Kultivierung (t =22h). Die Größenangaben des Markes sind in kDa angegeben.

⁵ Theoretische Molekulargewichte der Sesquiterpensynthasen: BcBOT2 = 47.43 kDa, PenA = 43.07 kDa. Die Ermittlung erfolgte mittels des ExPASy *ProtParam Tools*.^[116]

sodass eine signifikante Expression des Zielgens erst nach Induktion des *lac*-Operons nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 9**).

Zur Überprüfung der Löslichkeit wurden die Zellpellets mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und nach Zentrifugation sowohl vom Zelllysat als auch vom Rückstand Proben für eine SDS-Page angefertigt (**Abbildung 10**). Ein Vergleich von Pellet und Lysat zeigte, dass die STCn BcBOT2 und PenA als lösliches Protein erhalten wurden. Hierbei ist neben den charakteristischen Banden für die jeweiligen Proteine eine weitere Bande bei 32 kDa sichtbar, welche den proteinogenen Bestandteilen der Wirtszelle zugeordnet werden kann. Eine solche Expression von *E. coli* eigenen Proteinen kann durch die Zugabe von Rifampicin reduziert werden.^[114] Bei näherer Betrachtung der Banden von PenA zeigte sich zudem, dass das Protein nicht vollständig in gelöster Form vorliegt, sondern ein nicht unerheblicher Teil auch im Rückstand wiedergefunden wurde. Ursächlich hierfür könnte eine Fehlfaltung des Proteins sein oder eine zu stark ausgeprägte Expression, wodurch die Bildung von Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*) begünstigt wird. Dieser Problematik kann durch eine weitere Absenkung der Expressionstemperatur und der IPTG-Konzentration entgegengewirkt werden. Auch die Coexpression mit molekularen Chaperonen, die eine korrekte Faltung der Proteine begünstigen oder die Verwendung von Fusionspartnern wie Glutathion-S-Transferase oder Ubiquitin, ermöglichen eine Verbesserung der Löslichkeit und beugen einer Proteolyse vor. Bei Proteinfusionssystemen ist allerdings ein entsprechender Tag im Protein unerlässlich.^[114,117]

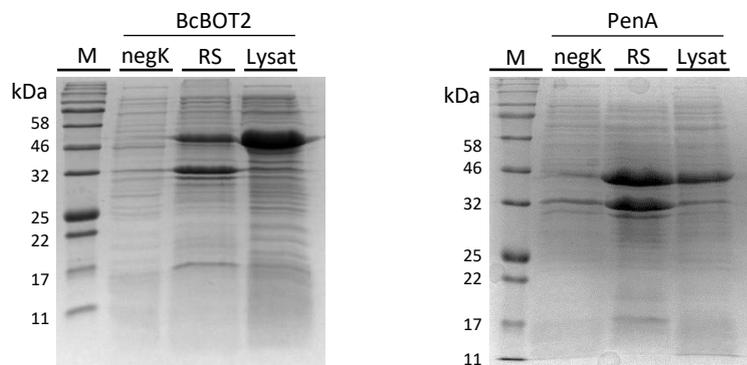


Abbildung 10: SDS-Page nach dem Zellaufschluss zur Überprüfung der Löslichkeit der Sesquiterpensynthasen BcBOT2 und PenA. Neben dem Marker (M), dessen Größenstandards in kDa angegeben sind, ist die Negativkontrolle (negK) vor Zugabe des IPTG abgebildet. Zudem sind die Proben des Rückstands (RS) und des Zelllysats (Lysat) abgebildet.

Es sollte jedoch auch bedacht werden, dass bei der differentiellen Zentrifugation, je nach Position der Matrixbestandteile im Zentrifugationsgefäß eine Cosedimentation von löslichen Bestandteilen eintreten kann, wodurch fälschlicherweise Banden im Rückstand erzeugt werden.^[118] Zudem sind die Bandenintensitäten von Rückstand und Zelllysat nicht direkt miteinander vergleichbar. Während vom Lysat ein genau definiertes Aliquot als Probe entnommen wurde, erfolgte beim Rückstand die Abnahme einer unspezifischen Menge. Daher kann nicht eindeutig von der Bandenintensität auf die Proteinkonzentration geschlossen werden. Dennoch ist die SDS-Page eine einfache und effektive Methode, um als Nachweis einer erfolgreichen Expression zu dienen und Proteine anhand ihres Molekulargewichtes zu identifizieren.

3.1.2 *Reinigung mittels immobilisierter Metallchelatchromatographie*

Zur Reinigung der Proteine wurde eine Metallchelatchromatographie (IMAC) gewählt, die eine Variante der Affinitätschromatographie darstellt. Bei der Reinigung handelt es sich um ein standardisiertes Verfahren, welches auf dem 6x-His-Tag der verwendeten Proteine beruht.^[114] Die Einführung des 6x-His-Tag in die rekombinanten Proteine erfolgte über den pET-28a(+)-Expressionsvektor, der die entsprechende Sequenz am N- und C-Terminus der ligierten Gene im Vektor aufweist. Während BcBOT2 über eine eigene Stopp-Sequenz im synthetischen Gen verfügt und daher nur am N-Terminus einen 6x-His-Tag aufweist, fehlt diese bei PenA, sodass bei der Translation die Stopp-Sequenz des Vektors genutzt wurde. Daher verfügt das Protein über einen weiteren 6x-His-Tag am C-Terminus verfügt.

Der 6x-His-Tag stellt ein einfaches Werkzeug zur Proteinreinigung dar, der zudem unter physiologischen Bedingungen ungeladen ist und die Struktur und Funktion des Proteins nicht beeinflusst. Daher ist eine Entfernung des Tags nach der Reinigung nicht notwendig.^[119] Die sechs aufeinanderfolgenden Histidine bilden mit den zweiwertigen Nickel-Ionen der stationären Phase einen Chelatkomplex und werden retardiert. Die Nickel-Ionen sind ihrerseits über Nitril-Tri-Essigsäure (Ni-NTA) an eine Matrix gebunden.^[114] Durch eine stetige Absenkung des pH-Wertes und der dadurch resultierenden Protonierung des Histidins oder durch steigende Imidazol-Konzentrationen kommt es zur Elution des Proteins.^[120]

Für geringe Proteinmengen (< 15 mg/mL) erfolgte die Reinigung über eine manuelle Säule mit einem diskontinuierlichen Imidazolgradienten zur Elution. Von Vorteil hierbei ist ein konstanter pH-Wert, sodass die Elution unter milden Bedingungen erfolgt und eine Denaturierung des Proteins vermieden wird. Das Lysat des Zellaufschlusses wurde dazu zweimal über die Säule gegeben, wobei es zur Retardierung von vor allem histidinhaltigen Proteinen kommt. Proteine, die keine Wechselwirkung mit der stationären Ni-NTA-Matrix zeigen, werden direkt eluiert. Durch nachfolgende Waschprozesse mit geringen Imidazolkonzentrationen können unspezifisch gebundene Proteine und jene mit geringerer Affinität heruntergespült werden, sodass es zu einer Reinigung des 6x-His-Tag-Proteins kommt, bis schlussendlich auch dieses durch die steigende Imidazolkonzentration verdrängt wird und von der Säule eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-Page durchgeführt, um den Verlauf der Reinigung nachzuvollziehen.

Anhand der **Abbildung 11** zeigt sich, dass sowohl PenA als auch BcBOT2 eine hohe Affinität gegenüber der Ni-NTA-Säule aufweisen. Das Maximum der Elution wird für beide Proteine bei 250 mM Imidazol beobachtet. Während bei BcBOT2 bereits bei 50 mM eine einsetzende Elution beobachtet werden kann, tritt dieses bei PenA erst bei 100 mM auf. Als Grund kann der zusätzliche 6x-His-Tag am C-Terminus von PenA angeführt werden. Dass nur ein geringer Affinitätsunterschied der beiden Proteine beobachtet werden kann, könnte auf eine unzureichende Komplexierung eines der beiden 6x-His-Tags des PenA infolge einer Abschirmung durch die Proteinstruktur hindeuten. Andersherum ist auch eine Affinitätssteigerung des BcBOT2 durch die Komplexierung von

oberflächennahen Histidinen der STC denkbar oder eine Wechselwirkung durch die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken.^[120]

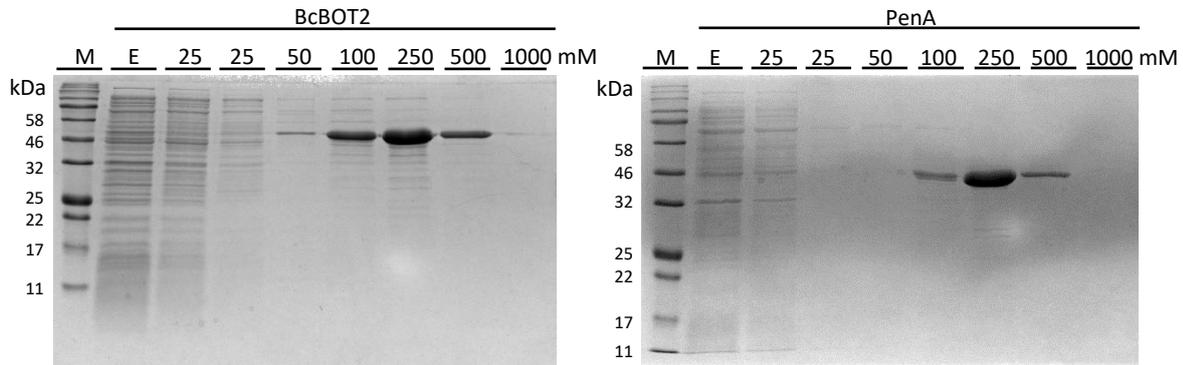


Abbildung 11: SDS-Page der Nickelaffinitätschromatographie zur Aufreinigung der Proteine BcBOT2 und PenA. Zur besseren Übersicht sind die Banden des Größenstandards mit den jeweiligen kDa gekennzeichnet. Der Durchfluss nach zweimaliger Aufgabe auf die Säule (E) sowie die zwei Waschschrte mit 25 mM Imidazol und die Elutionsschritte mit 50 mM – 500 mM Imidazol sind oberhalb der SDS-Page aufgetragen.

Eine Betrachtung der Banden bei 100 mM und 250 mM zeigte, dass nur eine Teilreinigung der Proteine erreicht worden ist, aufgrund von bestehenden Coelutionen. Obwohl deren Anteil gering ist, können sie insbesondere bei Wechselwirkungen mit den Enzymtest-Bestandteilen von entscheidender Bedeutung sein. So können vorhandene Phosphatasen das Diphosphat der Substrate abspalten und Proteasen zu einem Aktivitätsverlust und verringerter Lagerungsdauer der STCn beitragen. Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol kann der Anteil der Hintergrundproteine reduziert werden, ebenso durch den Zusatz von Detergenzien.^[120] Weiterhin zeigte die SDS-Page, dass die STCn nicht vollständig retardiert worden sind, was auf eine zu geringe Säulenkapazität zurückgeführt werden kann. Durch eine Regenerierung des Säulenmaterials oder eine Erhöhung des chromatographischen Betts kann die Kapazität durch Bereitstellung weiterer Wechselwirkungsplätze erhöht werden. Zudem kann eine Verkürzung des Reinigungsprozesses aufgrund der Vielzahl an zusätzlichen Proteinen ausgeschlossen werden. Auf eine Abspaltung des 6x-His-Tags wurde nach erfolgreicher Proteinreinigung verzichtet, da die Umsatzkinetik der STCn nicht durch den Tag beeinflusst wird.^[105]

Wurden hingegen größere Mengen an Protein benötigt, so erfolgte die Proteinreinigung mittels FPLC (**Abbildung 12**). Hierbei wurde bereits dem Lysepuffer eine geringe Konzentration an Imidazol zugesetzt, um eine Komplexierung unspezifisch bindender Proteine an die Ni-NTA-Phase zu unterbinden. Zudem erfolgte die Elution in Form eines kontinuierlichen Gradienten, wodurch eine weitere Steigerung der Reinheit erzielt werden konnte. Die Detektion des Proteins erfolgte durch UV-spektroskopische Verfolgung des chromatographischen Laufs bei 280 nm. Insgesamt wurden für BcBOT2 im Durchschnitt $205 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gereinigtes Protein aus einem Liter Kultur gewonnen, während im Fall von PenA durchschnittlich $85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gereinigtes Protein pro Liter Kultur erzielt wurden.

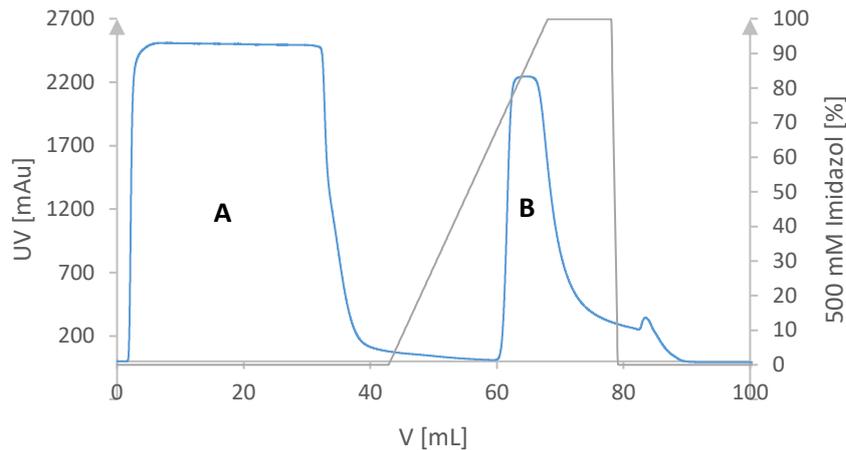


Abbildung 12: BcBOT2 Reinigung mittels FPLC und Ni-NTA Säule sowie einem 500 mM Elutionspuffer. Es ist in blau die UV-Absorption bei 280 nm gegen das Volumen aufgetragen. In grau ist der kontinuierliche Imidazolgradient in Anhängigkeit von dem prozentualen Anteil an Elutionspuffer abgebildet. Peak A bildet Proteine ohne oder nur mit geringer Affinität zur stationären Phase ab, welche aufgrund dessen nur kurzzeitig retardiert werden und bereits bei 25 mM Imidazol von der Säule verdrängt werden. Der Peak B entspricht der Elution des 6x-His-Tag Proteins BcBOT2, dessen Elutionsmaximum bei 400 mM Imidazol eintritt.

3.2 Auswahl und Validierung der Analysemethode

Sesquiterpene zeichnen sich durch eine hohe Flüchtigkeit aus, die aus dem Dampfdruck der Verbindungen resultiert, sodass die Gaschromatographie die Trennmethode der Wahl zur Analyse der entstehenden Produkte ist. Durch die Kopplung der leistungsstarken Trennmethode mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) sowie einem massenselektiven Detektor (MSD) werden stoffliche Informationen qualitativer Art erhalten, die zur Identifikation von Verbindungen genutzt werden. Hierbei werden Retentionsindices (RI) und Massenspektren der separierten Verbindungen herangezogen. Der Vorteil des RI gegenüber der Retentionszeit ist dessen Unabhängigkeit von experimentellen Faktoren wie der Alterung der Säule. Zur Ermittlung der RI wird die Retentionszeit des Analyten in Beziehung zu der Retentionszeit definierter Verbindungen gesetzt, wodurch der RI für das vorliegende chromatographische System charakteristisch für den jeweiligen Analyten ist und eine Vergleichbarkeit mit Literaturdaten gegeben ist (**Gleichung 1**). Die quantitative Bestimmung eines Analyten basiert auf der direkten Beziehung von Peakfläche und der Analytmenge. Voraussetzung für die quantitative Analyse ist, dass es sich bei dem Chromatogramm um ein exaktes Abbild der Probe handelt und die Analytverbindung keine Coelution mit der Matrix aufweist.^[121] In der vorliegenden Dissertation wurde für die quantitative Analyse ein interner Standard gewählt, wodurch systematische Fehler kompensiert werden können.

$$RI = 100 \cdot \frac{[\log t_{R(i)} - \log t_{R(z)}]}{[\log t_{R(z+1)} - \log t_{R(z)}]} + 100z$$

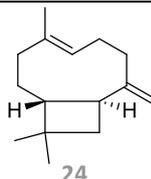
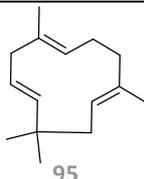
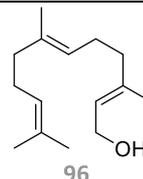
Gleichung 1: Retentionsindexberechnung nach Kovats^[119]. Bei „i“ handelt es sich um den Analyten, während „z“ das Alkan unmittelbar vor und „z+1“ das Alkan unmittelbar nach der analysierten Verbindung ist. Die Multiplikation mit 100 erfolgt aufgrund der Tatsache, dass per Definition die Retentionsindices genau 100-mal größer sind als die Anzahl (z) der Kohlenstoffatome im Alkan.

3.2.1 Auswahl eines internen Standards für die semi-quantitative Analyse

Um eine semi-quantitative⁶ Auswertung zu ermöglichen, wird zunächst ein Vergleichsstandard benötigt, der bestimmte Auswahlkriterien erfüllt. So sollte der Standard nicht Bestandteil der Probenmatrix sein oder mit der Matrix interagieren. Folglich wird eine auf die zu prüfende Substanz inerte Verbindung benötigt, die zudem ähnliche chemische Eigenschaften wie der Analyt aufweist. Zum anderen sollte die Verbindung keine Coelution mit etwaigen Verbindungen der Matrix zeigen.^[121]

Im Falle der resultierenden literaturbekannten Produkte von BcBOT2 und PenA wurde β -Caryophyllen (**24**) als Vergleichsstandard ausgewählt, da es ebenso wie die Produkte über ein zyklisches C₁₅-Kohlenstoffgerüst verfügt. Zudem wurden α -Humulen (**95**) und *E,E*-Farnesol (**96**) als weitere interne Standards herangezogen (**Tabelle 1**). Die durchgeführten semi-quantitativen Bestimmungen beruhen auf der FID-Spur, sodass das Ansprechverhalten des Detektors von dem Reduktionsvermögen der Kohlenstoffatome abhängig ist. Da der FID ein molares Responseverhalten für eine Vielzahl von Verbindungen aufzeigt, werden molare relative Responsefaktoren für Analyt und Standard angenommen. Die Reinheitsbestimmung der internen Standards erfolgte auf Grundlage der prozentualen Flächenprozentage bei Integration aller im Chromatogramm vorhandenen Peaks. Nicht flüchtige Bestandteile werden allerdings durch die GC diskriminiert, sodass eine Überschätzung der ermittelten Reinheit nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 1: Übersicht der gewählten internen Standard (IS) unter Angabe der prozentualen Flächenprozentage A[%] und der Retentionsindices auf einer DB-5 Säule.

IS	RI _{DB5}	A[%]	Strukturformeln
β -Caryophyllen (24)	1552	94.2	
α -Humulen (95)	1585	95.3	
(<i>E,E</i>)-Farnesol (96)	1831	99.4	

3.2.2 Überprüfung des dynamischen linearen Bereichs

Neben der Auswahl eines geeigneten Standards sollte auch die Methodik selbst überprüft werden. Bei der GC-MS erfolgt hierbei eine Überprüfung des dynamischen linearen Bereichs. Nur innerhalb des Bereichs ist eine lineare Abhängigkeit von Peakfläche zur injizierter Probenmenge gegeben. Durch Ermittlung des linearen Bereiches kann eine geeignete Probenkonzentration ausgewählt und das Injektionsvolumen angepasst werden, sodass einerseits quantitative Aussagen ermöglicht werden und andererseits eine Überladung der Säule und somit „Tailingeffekte“ reduziert und gleichzeitig der Trennfaktor gesteigert werden können.

⁶ Da von molaren Responsefaktoren ausgegangen wird und keine Kalibrierfunktion aus internem Standard und Analyt vorliegt, wird von einer semi-quantitativen Analyse gesprochen.

Die Festlegung des Prüfbereiches erfolgte anhand der Nachweisgrenze des FID und der Säulenkapazität. Es wurden insgesamt 11 Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 2 ppm und 75 ppm angesetzt und diese in einer Dreifachbestimmung analysiert. Als Prüfsubstanz wurde β -Caryophyllen ausgewählt. Die **Abbildung 13** veranschaulicht deutlich, dass sich der dynamische lineare Bereich der GC-FID über den gesamten Prüfbereich erstreckt. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,998$ kann zudem von einer guten statistischen Sicherheit ausgegangen werden. Der negative Achsenabschnitt kann auf die Reststreuung zurückgeführt werden. Ein möglicher Ausreißer konnte anhand eines durchgeführten F-Test ($P = 95\%$) nicht identifiziert werden. Die Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen erfolgte gemäß DIN 32645 nach der Kalibriergeradenmethode. Die Erfassungsgrenze (EG) errechnet sich in guter Näherung aus der doppelten Nachweisgrenze. Anhand der berechneten Daten zeigt sich, dass Analytgehalte von mehr als 9.1 ppm innerhalb des Vertrauensbereichs liegen und somit quantitativ bestimmt werden können. Analyten mit einem Gehalt unterhalb 2.5 ppm können hingegen mit der gewählten Analyseverfahren nicht qualitativ nachgewiesen werden.

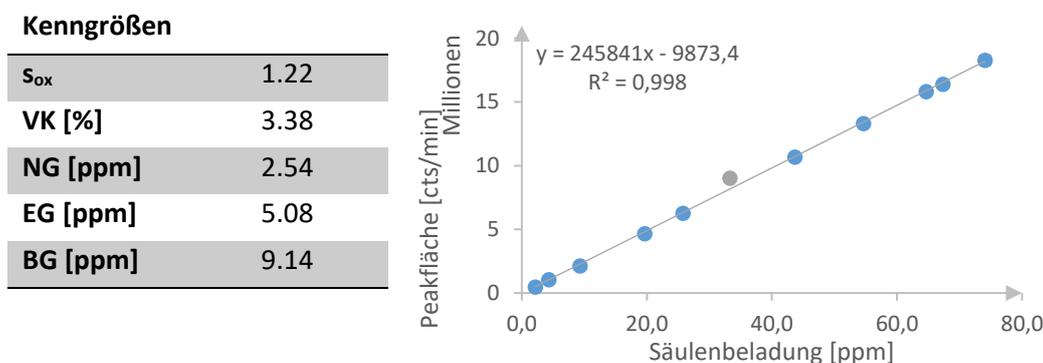


Abbildung 13: Kalibrierfunktion und berechnete Kenngrößen. Ein F-Test wurde für den in grau dargestellten Kalibrierpunkt durchgeführt. Zur Berechnung der Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) dienen der einseitige t-Wert = 2,1318 sowie der zweiseitige t-Wert = 2,7767. Zudem wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = \beta = 0.05$ gewählt und eine Ergebnisunsicherheit von $k=3$. Zudem sind der Verfahrensvariationskoeffizient VK und die Verfahrensstandardabweichung s_{ox} angegeben.

3.2.3 Bestimmung des Injektionsvolumens

Die Wahl des Injektionsvolumens ist von entscheidender Bedeutung für die Auflösung und die Trennung der Peaks. So kann eine zu hohe Probenkonzentration infolge einer Peakverbreiterung zu einer Coelution von Probenkomponenten führen, sodass semi-quantitative Bestimmungen erschwert werden. Tritt zudem eine Säulenüberladung auf, so entspricht die Peakform oftmals nicht mehr der üblichen Gaußform, wodurch eine fehlerhafte Integration der Peakflächen auftreten kann. Dies wird durch eine fehlende Basislinientrennung zusätzlich erschwert. Zu große Probenvolumina können zudem zu einem Rückstoßverhalten der Probe führen, besonders wenn das maximale Fassungsvermögen des Liners überschritten wird.^[122] In der Folge kondensieren weniger flüchtige Bestandteile und interferieren mit nachfolgenden Analysen. Weiterhin können reaktive Probenkomponenten durch den Kontakt mit aktiven Metalloberflächen die Probenzusammensetzung verfälschen. Zur Überprüfung des Injektionsvolumens wurde die organische Phase der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**) mit unterschiedlichen Injektionsvolumina auf die Säule gegeben und die Peakform des Hauptproduktes PSP (**29**) begutachtet. Hierbei zeigte

sich deutlich, dass zu hohe Injektionsvolumina zu einer Coelution des Hauptpeaks mit zwei Nebenkomponten führten, wodurch semi-quantitative Analysen verfälscht werden (**Abbildung 14**). Auch weisen die Peaks bei einem zu hohen Injektionsvolumen ein deutliches Fronting auf. Durch Senkung des Injektionsvolumens auf 1 μL konnten die Problematiken umgangen werden, da eine vollständige Basislinientrennung erzielt wurde. Durch die Reduktion des Injektionsvolumens und der Verwendung von *n*-Hexan als Lösemittel kann zudem ein möglicher Rückstoß der Probe vermieden werden, da das Expansionsvolumen der Probe im Bereich des verwendeten Linervolumens liegt. Die Konzentration des Hauptpeaks befindet sich auch mit einem geringeren Injektionsvolumen (1 μL) im Bereich des dynamischen linearen Bereichs, sodass quantitative Auswertungen weiterhin durchführbar sind. Zudem wurden die Proben *splitless* injiziert, um eine mögliche Diskriminierung von weniger flüchtigen Probenbestandteilen vorzubeugen.^[121] Als Injektor wurde ein Kaltaufgabesystem verwendet, um eine thermische Belastung der Probenkomponenten und dadurch resultierende thermische Umlagerungen oder Zersetzungen zu verhindern. Durch die gewählten Parameter ist es möglich, die Probe vollständig auf die Säule zu transferieren, sodass das Chromatogramm die Probenzusammensetzung gut repräsentiert. Lediglich nicht-verdampfbare Probenkomponenten werden durch die Analysemethode diskriminiert.

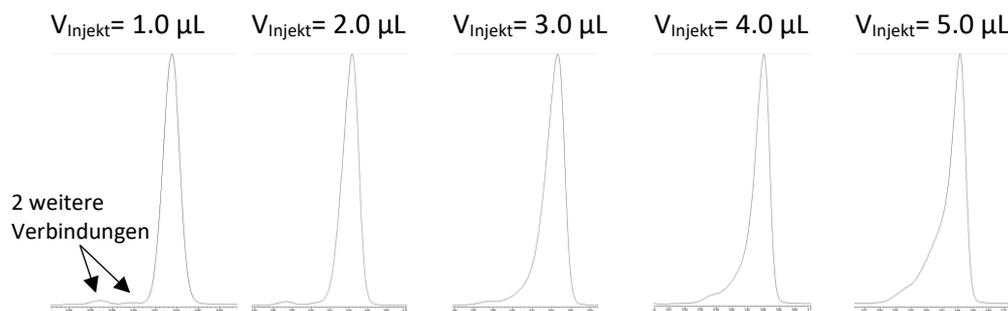


Abbildung 14: Hauptpeak der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP bei steigendem Injektionsvolumen. Deutlich sichtbar ist ein zunehmendes Fronting, sowie die Coelution zweier Nebenkomponten mit steigendem Injektionsvolumen.

3.3 Aktivitätsbestimmung der Terpencyclasen BcBOT2 und PenA

Zur Überprüfung der Aktivität der heterolog exprimierten STCn BcBOT2 und PenA wurden analytische *in vitro* Enzymtests im 500 μL Maßstab durchgeführt. Die Reaktionsparameter sowie die Konzentration an Substrat, Cofaktor und Enzym wurden von OBERHAUSER übernommen.^[112] Die Proteinkonzentration der eingesetzten Enzyme wurden spektrometrisch bei 280 nm ermittelt. Als Substrat wurde das natürliche FPP (**12**) verwendet. Den Puffern wurde zudem DTT zugesetzt, um ein zelltypisches reduzierendes Milieu zu imitieren.^[114] Die Abtrennung der gebildeten Produkte erfolgte durch Extraktion mit *n*-Hexan. Für die Evaluierung des Produktspektrums wurde die GC-MS Analysemethode ausgewählt. Zusätzlich erfolgte die Inkubation zweier Negativkontrollen, in denen nur das Enzym oder das Substrat zum Homogenisationspuffer zugesetzt wurden. So können eingeschleppte Verunreinigungen identifiziert und eine eindeutige Identifikation von Biotransformationsprodukten gewährleistet werden.

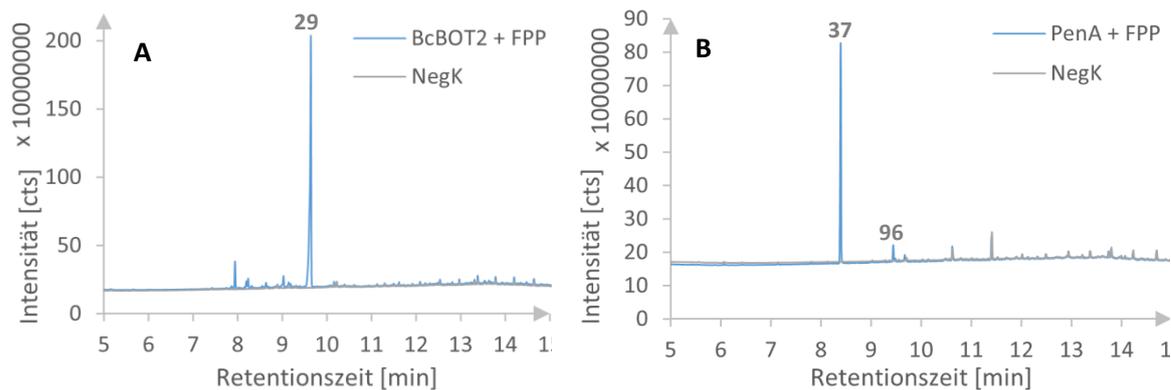
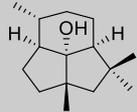
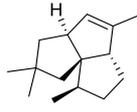


Abbildung 15: Chromatogramme der Biotransformation von A) BcBOT2 und B) PenA mit dem natürlichen Substrat FPP. In blau ist jeweils die FID-Spur der Biotransformation dargestellt und in grau die der Negativkontrolle (NegK). Bedingungen: A) 0.03 mg/mL BcBOT2, 150 μ M FPP, 5 mM MgCl₂, pH 7.5 (50 mM HEPES); B) 0.01 mg/mL PenA, 150 μ M FPP, 5 mM MgCl₂, pH 8.2 (Tris-HCl). Die Inkubation erfolgte bei T = 37°C und t = 30 min. (*E,E*)-Farnesol (**96**) ist beispielhaft im Chromatogramm der Biotransformation von PenA mit FPP abgebildet.

Ein Vergleich der Biotransformationen mit den Negativkontrollen zeigte für beide Enzyme die Bildung eines Hauptproduktes (**Abbildung 15**). Da die gebildeten Produkte nicht Bestandteil der Negativkontrollen sind, kann dementsprechend von einer Aktivität der STCn ausgegangen werden. Durch einen Abgleich von Massenspektren und Retentionsindices mit der Literatur und Datenbanken⁷ erfolgte eine Identifikation der Produkte.^[59,68] So konnte für BcBOT2 das Produkt Presilphiperfolan-8 β -ol (**29**) mit einem prozentualen Flächenanteil von 88.1 % bestimmt werden. Da jedoch das Massenspektrum im Vergleich zur Literatur^[59] ein abweichendes Fragmentierungsmuster aufwies, erfolgte die Bestätigung der Verbindung erst durch eine Strukturaufklärung (s. Kap. 3.5.1). Für PenA konnte hingegen eindeutig das Produkt Pentalenen (**37**) mit einem prozentualen Flächenanteil von 89.9 % ermittelt werden (**Tabelle 2**). Die restlichen Flächenprozent verteilen sich bei beiden STCn auf weitere Nebenprodukte, welche in den Kapiteln 3.5.2 und 3.6.2 näher betrachtet werden. Anhand der Negativkontrollen konnte zudem eine Verbindung mit einem RI von 1728 identifiziert werden, welche nicht Bestandteil der biotransformierten Produktspektren ist. Stattdessen stellt die Verbindung eine Verunreinigung des eingesetzten Substrates FPP (**12**) dar. Durch Coinjektion sowie einem Abgleich von RI und Massenspektrum konnte die Verunreinigung als (*E,E*)-Farnesol (**96**) identifiziert werden.^[123] Die Bildung des (*E,E*)-Farnesol (**96**) kann auf die Hydrolyseempfindlichkeit des FPP zurückgeführt werden, die besonders bei Vorliegen von acidischen Bedingungen zur Abspaltung des Diphosphats führt.^[124] Dementsprechend sollte eine Lagerung der Substrate möglichst wasserfrei erfolgen. Zudem können mehrere Peaks beobachtet werden, die sowohl in den Negativkontrollen als auch in der Probe selbst enthalten sind. Da sich die Massenspektren dieser Verbindungen weder durch ein typisches Terpen-Fragmentierungsmuster auszeichnen noch entsprechende Molpeaks aufweisen, die auf Mono- oder Sesquiterpene zurückgeführt werden können, scheint es sich um mitextrahierte Weichmacher aus den verwendeten Gefäßen zu handeln. Eine Extraktion von Pufferbestandteilen kann hingegen aufgrund der Polarität ausgeschlossen werden.

⁷ Für die vorliegende Dissertation konnten die internen Datenbanken der Symrise AG für semi-qualitative Bestimmungen auf Basis von RI und Massenspektren genutzt werden.

Tabelle 2: Übersicht der semi-qualitativen Analyse. Neben dem Retentionsindex (RI) ist der prozentuale Flächenanteil angegeben. Die Kenngrößen Molpeak (MP) und Basispeak (BP) sowie das charakteristische Fragmentierungsmuster der Massenspektren sind ebenfalls aufgelistet. Die Signale des Fragmentierungsmusters sind nach sinkender Intensität geordnet.

Produkt	RI _{DB5}	A[%]	MP	BP	m/z
PSP (29) 	1623	88.1	222	119	91, 189, 105, 55, 133, 147, 161, 204, 175, 207, 69, 79
Pentalenen (37) 	1366	89.9	204	105	91, 147, 106, 119, 189, 161, 133, 77, 175

Um eine Abschätzung der Enzymaktivität zu ermöglichen, wurde den Biotransformationen β -Caryophyllen als interner Standard zugesetzt. Hierbei konnte für die Bildung des Pentalenen (**37**) eine Ausbeute von $6.1\% \pm 1.1\%$ ermittelt werden. Für BcBOT2 liegt die semi-quantitativ bestimmte Ausbeute bei $9.6\% \pm 0.8\%$ für PSP (**29**). Beide Ausbeuten dienen der nachfolgenden Optimierung als Ausgangspunkt.

3.4 Optimierung der Biotransformationen der STCN BcBOT2 und PenA mit FPP (**12**)

Für die Optimierungen der beiden STCN wurden analytische Enzymtests im 500 μ L Maßstab unter Zusatz von β -Caryophyllen als interner Standard in einer semi-quantitativen Dreifachbestimmung angewendet. Als Substrat wurde das wasserlösliche, natürliche Substrat FPP (**12**) genutzt (**Abbildung 16**). Die semi-quantitative Bestimmung erfolgte anhand der Hauptprodukte PSP (**29**) und Pentalenen (**37**). Da die Ausbeuten der STCN bei der Aktivitätsbestimmung unter den von OBERHAUSER gewählten Bedingungen für spätere semi-quantitative Umsetzungen nicht wirtschaftlich sind, wurden verschiedenste Parameter optimiert. Hierbei sei angemerkt, dass die Optimierungen in Anbetracht des resultierenden Probenumfangs nacheinander erfolgten, wodurch lediglich punktuelle Optima in Abhängigkeit von der Optimierungsreihenfolge identifiziert wurden. Vor Beginn der Optimierungen erfolgte zunächst eine Überprüfung der Wiederfindungsrate, die Informationen zum Probenverlust während der Inkubation und Aufarbeitung lieferte.

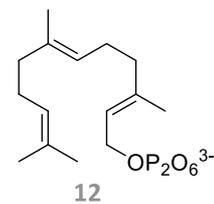


Abbildung 16: Natürliches Substrat FPP (**12**).

3.4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Da der eingesetzte interne Standard erst nach Aufarbeitung der Proben zugesetzt wurde und somit nur systematische Fehler während der Analyse kompensiert werden, wurde eine Standardaddition (**Abbildung 17**) mit der Vergleichssubstanz β -Caryophyllen durchgeführt, um Informationen zum Verlust von Probenmaterial während der Inkubation und Aufarbeitung zu erhalten. Da für die Umsetzung, infolge der Unlöslichkeit des Analyten in der wässrigen Phase, ein Zweiphasensystem verwendet wurde, können keine Informationen zur Güte des Extraktionsvorganges erworben werden.

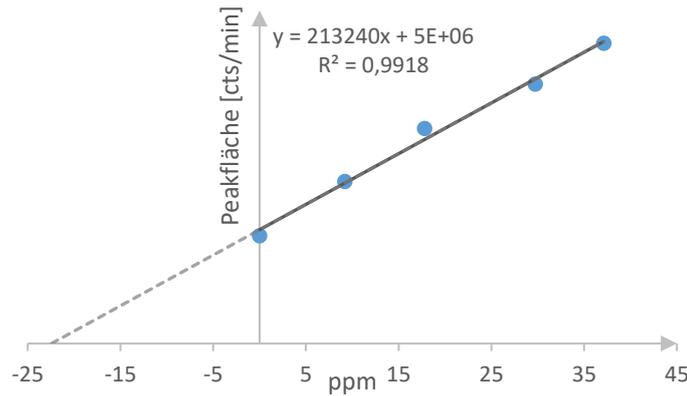


Abbildung 17: Ergebnisse der Standardaddition. Es ist die ermittelte Peakfläche gegen die Konzentration aufgetragen. 0 ppm entsprechen der Probe ohne zusätzliche Addition von β -Caryophyllen. Es erfolgte eine Addition von Analyt im Bereich von 10-40 ppm. Über den Schnittpunkt mit der x-Achse kann der Gehalt des Analyten ermittelt werden. Die einzelnen Proben wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung mittels GC-FID vermessen. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 24°C für 15 min.

Durch einen Vergleich der berechneten β -Caryophyllen Konzentration mit der tatsächlich eingesetzten wurde eine Wiederfindungsrate (WFR) von 101.7% ermittelt. Da die positive Abweichung der WFR (+ 1.7 %) im Bereich der relativen Standardabweichung ($\pm 2.1 \%$) der eingesetzten Analysenprobe liegt, kann die erhöhte WFR auf die Präzision der Analysenmethode und weitere systematische Fehler während der Probenvorbereitung zurückgeführt werden. Eine analytisch relevante Evaporation von Analytsubstanz bzw. eine Konzentrierung der Probe kann dementsprechend ausgeschlossen werden, sodass das verwendete System anwendbar ist.

3.4.2 Optimierung von Aufarbeitung und Reaktionssystem

Zunächst wurde überprüft, ob ein wässriges Einphasensystem oder ein Zweiphasensystem, bei dem die wässrige Reaktionsphase mit einem organischen Lösemittel überschichtet ist, zu einer Ausbeuteerhöhung beitragen. Anhand der **Abbildung 18** zeigt sich, dass im Falle der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**) unter Einbezug der relativen Standardabweichung, keine signifikante Ausbeuteerhöhung mit einem Zweiphasensystem erzielt werden konnte. Bei der enzymatischen Umsetzung von PenA mit FPP konnte hingegen ein Ausbeuteverlust von 25 % beobachtet werden, sodass, insbesondere für die Umsetzung mit der STC PenA ein Einphasensystem gewählt wird.

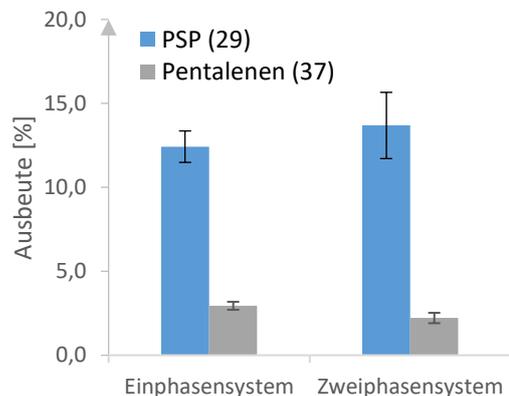


Abbildung 18: Vergleich von Ein- und Zweiphasensystem für die Biotransformationen von BcBOT2 (blau) und PenA (grau) mit FPP (**12**) zu PSP (**29**) und Pentalenen (**37**). Für das Zweiphasensystem wurde die wässrige Phase vor Inkubationsbeginn mit *n*-Hexan überschichtet.

Da durch die Verwendung eines Zweiphasensystems eine stetige Abführung des Produktes und demzufolge eine Produktinhibierung des Enzyms sowie eine Verlagerung des chemischen Gleichgewichts auf die Produktseite erzielt wird, wurde für die STC BcBOT2 ein solches Zweiphasensystem für eine Umsetzung in Betracht gezogen.^[6,125]

Dazu wurde überprüft, ob der Produktübergang durch Schütteln des Systems zu einer Ausbeute-

steigerung des PSP (29) beiträgt. Durch die Bewegung des Reaktionsansatzes wird die Diffusion und der Phasenübergang der Produktmoleküle in die organische Phase unterstützt. Dazu wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der die Inkubation der Proben sowohl im Thermomixer, für die analytischen Enzymtests, als auch im Schüttler für die semi-präparativen Ansätze untersucht wurde. Während bei der Inkubation im Thermomixer mit einer Schüttelfrequenz von $300 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ eine Ausbeutesteigerung beobachtet wurde, die allerdings bei Betrachtung der relativen Standardabweichungen nicht signifikant zur Inkubation ohne Schütteln ist, geht eine weitere Steigerung auf $650 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ mit einer deutlichen Reduktion der Ausbeute einher (Abbildung 19). Analog verhält es sich für die Messungen im Schüttler. Während bei $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ noch kein signifikanter Ausbeuteverlust festgestellt werden kann, ist dieser bei $150 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ deutlich erkennbar. Dass der Ausbeuteverlust im Schüttler bereits bei geringeren Schüttlerfrequenzen detektiert wurde, kann durch die unterschiedliche Rotationsbewegung von Schüttler und Thermomixer begründet werden. Während Letzterer kleine stoßende Bewegungen vollführt, kommt es bei dem Schüttler zu ausladenden Bewegungen, die zu einer besseren Durchmischung

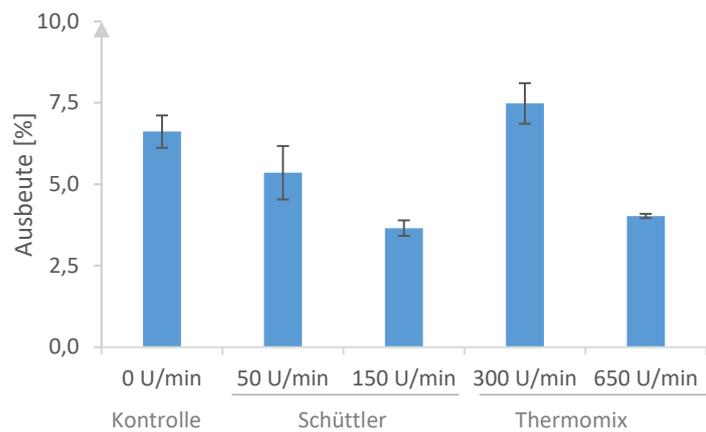


Abbildung 19: Einfluss von Schütteln im analytischen und semi-präparativen Maßstab auf ein Zweiphasensystem. Eine Inkubation ohne Schütteln dient als Kontrolle. Die Umsetzungen erfolgten mit BcBOT2 und FPP (12) als Substrat.

von wässriger und organischer Phase führen. Infolgedessen kommt es zu ausgeprägteren Denaturierungseffekten und einen einhergehenden Aktivitätsverlust des Enzyms durch die organische Phase.^[6] Anhand der Ergebnisse wird für die STC BcBOT2 ebenfalls von einem Zweiphasensystem abgesehen und stattdessen analog wie für die STC PenA ein Einphasensystem für analytische und semi-präparative Umsetzungen gewählt.

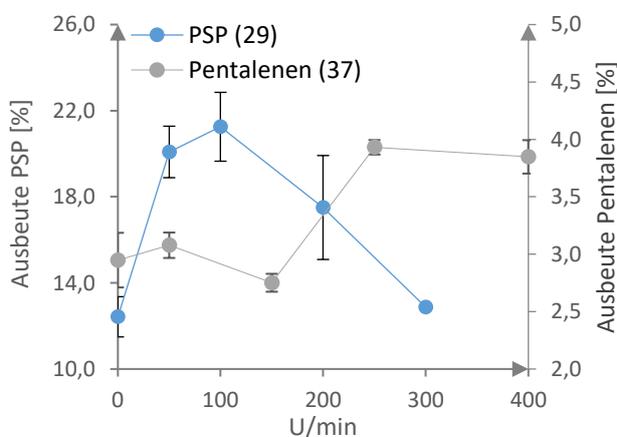


Abbildung 20: Einfluss von einem Einphasensystems auf die Produktausbeute von PSP (29) und Pentalenen (37).

Auch für das Einphasensystem wurde zunächst für die analytischen Enzymtests, der Einfluss von Schütteln auf die Ausbeute untersucht. Dazu wurden die Ansätze bei unterschiedlichen Schüttelfrequenzen inkubiert, aufgearbeitet und massenspektroskopisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass für die STC BcBOT2 eine Inkubation bei $300 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und für PenA eine Frequenz von $600 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ gewählt werden sollte (**Abbildung 20**). Durch das Schütteln wird eine bessere Homogenisierung von Substrat und Enzym erreicht, wodurch punktuelle Substratmaxima verhindert werden. Weiterhin kann durch die Bewegung der diffusionsabhängige Abtransport von Produkt erleichtert werden wodurch eine Produktinhibierung verringert wird.

Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung des Extraktionsvorganges anhand der Biotransformation der STC BcBOT2 mit FPP (**12**). Um die Wirksamkeit des Extraktionsschrittes mit *n*-Hexan zu verifizieren, wurde neben der Extraktionsdauer auch das Extraktionsvolumen sowie eine mehrmalige Extraktion untersucht, die gemäß dem NERNST'schen Verteilungssatz zu einer Verbesserung der Extraktionsgüte beiträgt. Anhand der **Abbildung 21** ist unverkennbar, dass sowohl eine Steigerung der Extraktionsdauer als auch des Extraktionsvolumens zu keiner Erhöhung der Ausbeute beiträgt. Eine zweimalige Extraktion zeigt zudem, dass bei dem zweiten Extraktionsschritt lediglich eine vernachlässigbar kleine Produktmenge extrahiert wird. Folglich führt eine Extraktion mit $100 \mu\text{L}$ *n*-Hexan über eine Dauer von 30 Sekunden bereits zu einem annähernd vollständigen Übergang des Produktes aus der wässrigen in die organische Phase.

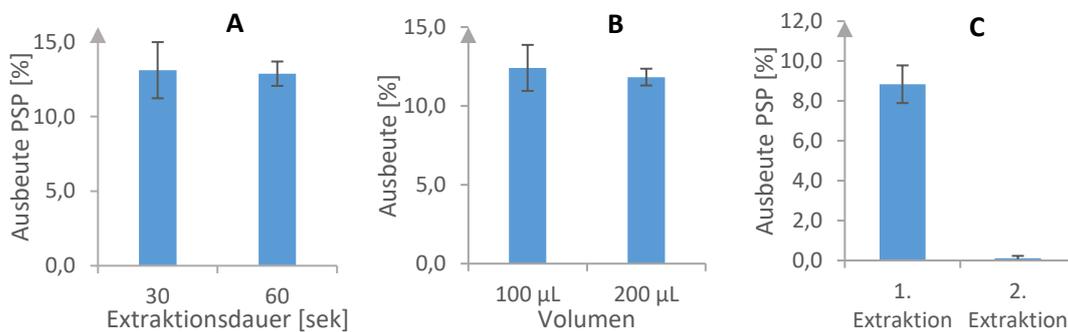


Abbildung 21: Optimierung der Wirksamkeit der Extraktion anhand der Biotransformation von BcBOT2 und FPP. **A)** Steigerung der Extraktionsdauer von 30 Sekunden auf 60 Sekunden, **B)** Erhöhung des Extraktionsvolumens auf $200 \mu\text{L}$, **C)** Zweifache Extraktion mit jeweils $100 \mu\text{L}$ *n*-Hexan gemäß dem NERNST'schen Verteilungssatz.

Um einer Verfälschung der semi-quantitativen Bestimmung durch eine Produktbildung nach Ablauf der Inkubationsdauer vorzubeugen, sollte das Protein nach Beendigung der Reaktion vollständig denaturiert werden. Dazu wurden neben unterschiedlichen organischen Lösemitteln, die auch zur Extraktion der Produkte dienen, EDTA als Komplexbildner, Harnstoff als Denaturierungsreagenz und Citronensäure zur Senkung des pH-Wertes als mögliche Reagenzien getestet. Diese wurden den Enzymtests vor Beginn der Inkubationsdauer und Zugabe des Substrates FPP (**12**) zugesetzt. Als Vergleich diente eine Biotransformation ohne zusätzliche Detergenzien.

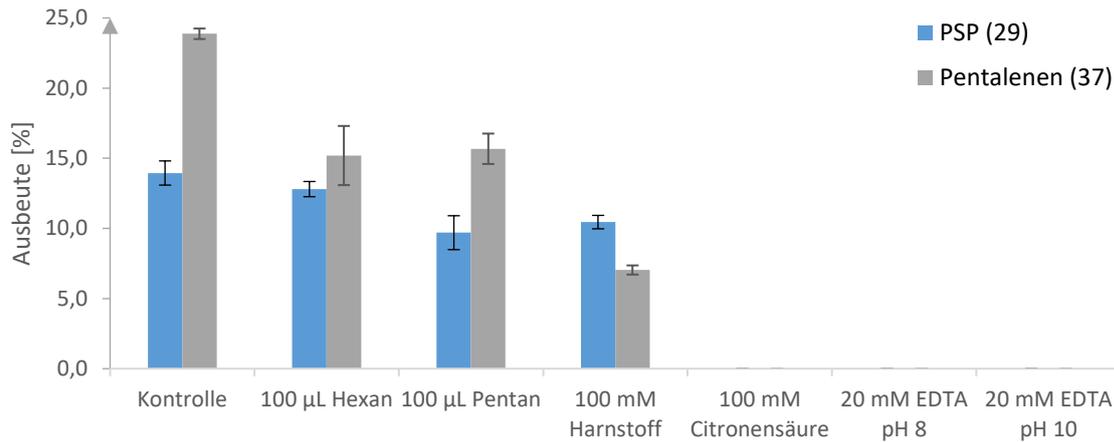


Abbildung 22: Denaturierungstest der STCs BcBOT2 (blau) und PenA (grau) mit unterschiedlichen Detergenzien und dem Komplexbildner EDTA bei zwei pH-Werten. Die Kontrolle stellt eine Biotransformation ohne Zusatz etwaiger Detergenzien dar. Es erfolgte eine semi-quantitative Bestimmung in Dreifachbestimmung mit β -Caryophyllen als ISD.

Ein Vergleich mit der Kontrolle zeigt, dass weder die eingesetzten organischen Lösemittel noch Harnstoff zu einer vollständigen Denaturierung der STCs führen (**Abbildung 22**). Im Falle der organischen Lösemittel konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Enzymaktivität von dem $\log P$ -Wert⁸ des verwendeten Lösemittels abhängig ist.^[125] Hierbei zeigte sich, dass organische Lösemittel mit einem $\log P$ -Wert in einem Bereich von zwei bis vier einen variablen Effekt auf die Aktivität des Enzyms ausüben, während Lösemittel mit einem $\log P$ -Wert größer vier keinen Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen.^[126] Da *n*-Hexan und *n*-Pentan einen $\log P$ -Wert von 3.9 bzw. 3.4 aufweisen und dementsprechend lediglich über eine geringe Wasserlöslichkeit verfügen, ist der Kontakt zwischen Enzym und Lösemittel größtenteils auf die Phasengrenze beschränkt. Daher kann lediglich ein Aktivitätsverlust beobachtet werden, jedoch keine vollständige Denaturierung des Enzyms. Im Falle der STC BcBOT2 zeigt sich zudem, dass mit *n*-Pentan geringere Ausbeuten an PSP (**29**) erzielt werden können. Dies kann auf die höhere Wasserlöslichkeit von *n*-Pentan zurückgeführt werden, die in der Folge eine Interaktion des Lösemittels mit dem Enzym bewirken könnte, weshalb im semi-präparativen Maßstab auf eine Überschichtung der wässrigen Reaktionsphase mit dem organischen Lösemittel während der Inkubationsdauer verzichtet werden sollte. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die STC PenA insgesamt anfälliger auf die organischen Lösemittel *n*-Hexan und *n*-Pentan reagiert als die STC BcBOT2.

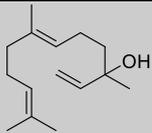
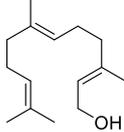
Harnstoff ist ein chaotropes Reagenz, welches eine reversible chemische Denaturierung bewirkt. Es wird allgemein angenommen, dass Harnstoff durch seine chaotrope Eigenschaften die Lösemittelumgebung beeinflusst und hydrophobe Wechselwirkungen reduziert. Zudem wird eine Adsorption der Harnstoffmoleküle an geladene hydrophile Reste der Proteinoberfläche angenommen sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Wechselwirkungen, wodurch eine Solvatisierung hydrophober innenliegender Reste begünstigt wird, die zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur und letztendlich zur Denaturierung führen.^[127]

⁸ $\log P$ -Wert: Kenngröße, die den Verteilungskoeffizienten eines Stoffes in einem Gemisch aus Wasser und *n*-Octanol bei 25°C beschreibt^[125].

Die nicht vollständige Denaturierung der STCn PenA und BcBOT2 kann hierbei jedoch nicht auf eine Toleranz der STCn gegenüber Harnstoff zurückgeführt werden, sondern auf eine zu geringe Konzentration an zugesetztem Harnstoff. So entfaltet Harnstoff seine denaturierende Wirkung erst bei Konzentrationen oberhalb von 6M.^[128] Geringere Harnstoffkonzentrationen können hingegen einen stabilisierenden Effekt auf das Protein ausüben.^[129] Dass dennoch ein Ausbeuteverlust beobachtet wurde, könnte für eine inhibitorische Wirkung des Harnstoffs gegenüber den STCn sprechen.

Der Zusatz von Citronensäure führt zu einer Absenkung des pH-Wertes unterhalb von pH 3, was ausgehend von Landungsänderungen an der Proteinstruktur und einem Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zu einer irreversiblen Denaturierung des Enzyms führt.^[4] Durch den Protonenüberschuss ist zudem eine Verdrängung des Mg²⁺-Cofaktors aus dem aktiven Zentrum denkbar, sodass es zur Inhibierung der Biotransformation kommt. Anstelle von PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) konnten für beide STCs allerdings zwei neue Verbindungen detektiert werden. Diese können qualitativ anhand von RI und MS-Spektren als (*E*)-Nerolidol (**97**) und (*E,E*)-Farnesol (**96**) identifiziert werden (**Tabelle 3**).^[130] Die Detektion der Verbindungen steht im Einklang mit Beobachtungen von CANE und TIDD, wonach pH-Werte unterhalb von pH 5 die Abspaltung der Diphosphatgruppe begünstigen.^[131] Allylische Diphosphate wie in FPP (**12**) hydrolysieren dabei durch einen säurenkatalysierten S_N1-Mechanismus, dessen treibende Kraft die Stabilisierung des intermediären Allylkations ist.^[132] Als Produkte werden umgelagerte und nicht umgelagerte Alkohole sowie anorganisches Diphosphat erhalten.

Tabelle 3: Identifizierte Hydrolyseprodukte (*E*)-Nerolidol (**97**) und (*E,E*)-Farnesol (**96**) anhand der RI und MS-Spektren mit Literaturspektren bzw. Vergleich mit kommerziell erhältlichem (*E,E*)-Farnesol. Neben den prozentualen Flächenprozenten A[%] und dem RI sind die charakteristischen Fragmentierungen aus dem MS-Spektrum aufgelistet. MP: Molpeak, BP: Basispeak, m/z: weitere Fragmente sortiert nach abnehmender Intensität.

Produkt	RI _{DB5}	A[%]	MP	BP	m/z
(<i>E</i>)-Nerolidol (97) 	1565	75.5	222	69	93, 107, 81, 136, 161, 121, 189, 204
(<i>E,E</i>)-Farnesol (96) 	1722	24.5	222	69	81, 93, 107, 136, 121, 161, 204

EDTA ist ein sechszähliger Ligand, der als Chelatkomplex fungiert und bevorzugt zweiwertige Metalle komplexiert. Das Ausmaß der Komplexbildung ist von der Fällung des Metallions, der Protonierung des Liganden und der thermodynamischen Stabilitätskonstante abhängig. Instabile Komplexe werden hierbei erst mit zunehmendem pH-Wert quantitativ ausgebildet. Im Fall des Cofaktors Magnesium, welches durch die Zugabe von EDTA komplexiert werden soll, um eine Inaktivierung des Enzyms hervorzurufen, ist eine Komplexbildung bei pH-Werten oberhalb von pH 12 nicht möglich, da es zur Hydroxid-Fällung kommt.^[133] Daher wurde neben pH 8, welches nahe

den physiologischen Bedingungen der Biotransformation liegt, ein pH-Wert von pH 10 ausgewählt, der im Bereich des Maximums der konditionellen Stabilitätskonstante des Mg-EDTA-Komplexes liegt. Bereits ab einem pH-Wert von pH 8 konnte keine Produktbildung mehr beobachtet werden, sodass eine vollständige Komplexierung des Cofaktors erreicht wurde. Die Bildung von Nebenprodukten durch Hydrolyse des eingesetzten FPP (**12**) kann zudem durch die Wahl von alkalischen Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden.^[131] Folglich eignet sich für eine vollständige Unterbindung der Biotransformation die Zugabe von EDTA zur Entfernung des Cofaktors aus der Reaktionslösung durch Komplexierung. Die Zugabe des Liganden ist dabei vor allem wichtig für kinetische Untersuchungen der STCs. Da diese allerdings nicht im Fokus dieser Arbeit liegen, wurde für die nachfolgenden Optimierungen, mit Ausnahme der Reaktionszeitoptimierung, auf den Zusatz von EDTA verzichtet und stattdessen Endpunktbestimmungen nach Erreichen des Umsatzmaximums durchgeführt.

3.4.3 Optimierung der Reaktionsparameter

Zur Ermittlung der zeitlichen Umsetzungsrate wurden Biotransformationen mit variabler Inkubationsdauer (2.5 min – 60 min) durchgeführt und die Ausbeute an PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) durch den Zusatz von β -Caryophyllen als interner Standard semi-quantitativ ermittelt. Um die Reaktion nach Ablauf der Inkubationsdauer zu unterbrechen, wurden die Enzymtests mit 20 mM EDTA (pH 10) versetzt, um den Cofaktor zu komplexieren (siehe 3.4.2).

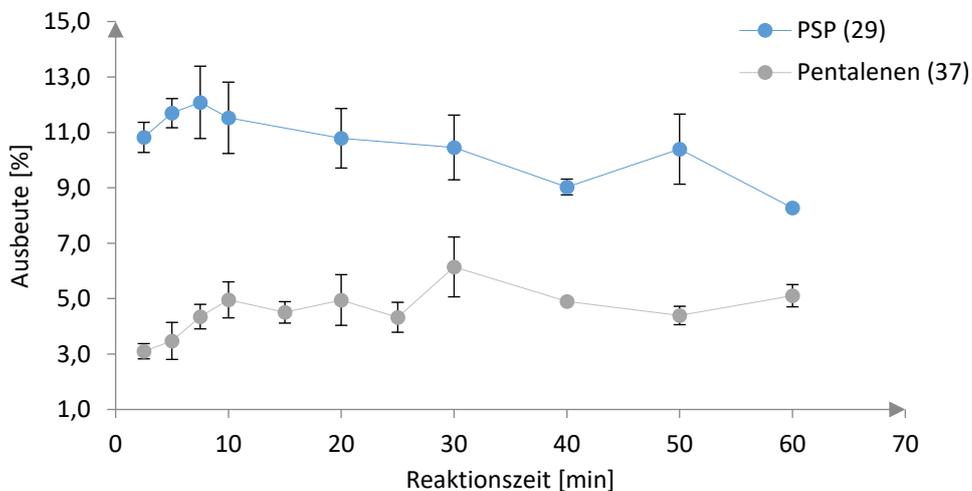


Abbildung 23: Bestimmung der Ausbeute an PSP (**29**, blau) und Pentalenen (**37**, grau) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Enzymtests.

Anhand der **Abbildung 23** kann für die Bildung von Pentalenen (**37**) ein annähernd linearer Anstieg innerhalb der ersten 10 min beobachtet werden, ehe sich unter Einbezug der relativen Standardabweichungen eine nahezu konstante Ausbeute an Pentalenen (**37**) einstellt. Um eine Endpunktbestimmung zu gewährleisten, wird für die nachfolgenden Optimierungen daher eine Reaktionsdauer von 30 min gewählt. Für das Enzym BcBOT2 kann ebenfalls innerhalb der ersten 7.5 min ein linearer Verlauf beobachtet werden kann. Ab einer Reaktionsdauer von 10 min kann auch in diesem Fall unter Einbezug der relativen Standardabweichungen eine konstante Ausbeute an PSP (**29**) erhalten werden, sodass eine Inkubationsdauer von 15 min gewählt wird. Allerdings

weisen die Datenpunkte auf eine Tendenz zu einem stetigen Ausbeuteverlust hin, der besonders durch den Messpunkt nach 60 min deutlich wird. Der Ausbeuteverlust kann auf eine mögliche Verflüchtigung des Produktes während der Inkubation zurückgeführt werden oder auf eine zeitabhängige Adsorption an das Polypropylen-Reaktionsgefäß, sodass eine vollständige Überführung in die organische Phase während der Extraktion gehemmt wird. Um Letzteres für semi-präparative Umsetzungen auszuschließen, und zugleich auch mitextrahierte Weichmacher zu eliminieren, erfolgen diese in Glasgefäßen.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Ermittlung der optimalen Temperatur für die Biotransformation der *mesophilen* STCn in einem Bereich zwischen 4°C bis 40°C. Dazu wurde der verwendete Puffer und Cofaktor zunächst bei der jeweiligen Temperatur equilibriert und nach Erreichen der Temperatur die Biotransformation durch Zusatz von Enzym und Substrat gestartet. Da sich die Temperaturkurve aus zwei gegenläufigen Prozessen zusammensetzt, entspricht das Maximum der Produktausbeute nicht unbedingt auch den optimalen Bedingungen des Enzyms.^[4] Während enzymatische Reaktionen ebenfalls der VAN'T HOFF'schen RGT-Regel folgen, nach der die Reaktionsgeschwindigkeit sich verdoppelt sobald es zu einer Temperaturerhöhung von 10°C kommt, führen erhöhte Temperaturen außerhalb des charakteristischen Temperaturbereichs des Enzyms zu einer fortschreitenden Inaktivierung infolge von Denaturierungsprozessen.^[4,125]

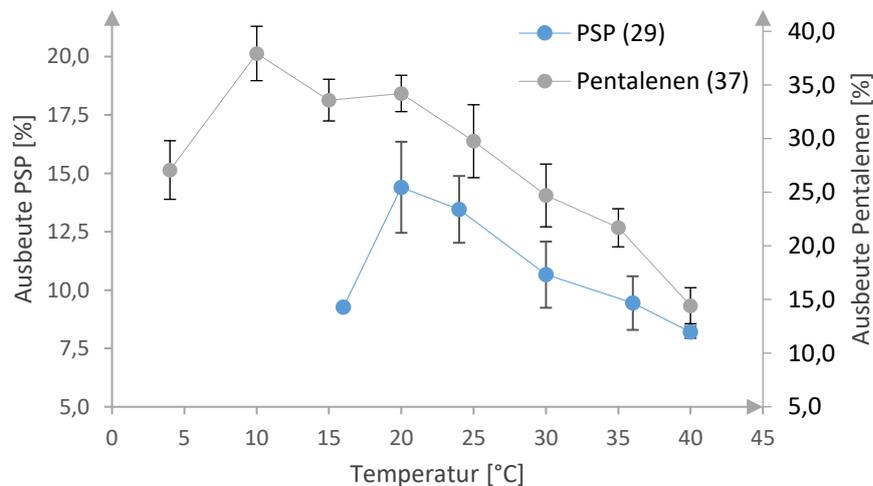


Abbildung 24: Semi-quantitative Ausbeutebestimmung in einer Dreifachbestimmung in Abhängigkeit von der Temperatur. Auf der Primärachse ist die Ausbeute an PSP (29, blau) der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP abgebildet und auf der Sekundärachse die Ausbeute an Pentalenen (37, grau) nach der Biotransformation von PenA mit FPP.

Für die STC BcBOT2 kann anhand der **Abbildung 24** ein Optimum im Bereich zwischen 20°C bis 25°C beobachtet werden, welches unterhalb der in Literatur verwendeten 30°C liegt.^[54,59] Oberhalb von 35°C kann die Inaktivierung des Enzyms durch einsetzende Denaturierungsprozesse beobachtet werden. Ausbeuten, die bei Temperaturen unterhalb des Maximums der Temperaturkurve erzielt wurden folgen hingegen der RGT-Regel.

Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur wird durch die ARRHENIUS-Gleichung beschrieben. Eine logarithmische Auftragung der Ausbeute gegen die reziproke Temperatur unter Annahme von sättigenden Bedingungen sowie einer direkten Proportionalität der Ausbeute zur Umsatzgeschwindigkeit zeigt, dass das Enzym BcBOT2 bereits ab einer Temperatur oberhalb von 20°C einer zeitlichen Denaturierung unterworfen ist, wobei die Enzymstabilität mit steigender Temperatur weiter abnimmt (**Abbildung 25**). Temperaturen unterhalb von 20°C liegen vermutlich im linearen Bereich des Arrhenius-Diagramms und sind keinen Denaturierungsprozessen unterworfen, wobei die Identifikation des linearen Bereichs aufgrund unzureichender Messpunkte nicht eindeutig identifiziert werden kann.

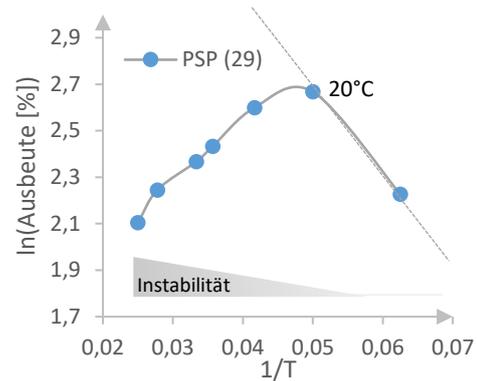


Abbildung 25: Auftragung der Temperaturabhängigkeit der PSP-Ausbeute nach ARRHENIUS. Mit steigender Temperatur kommt es zu einer zunehmenden Instabilität des Enzyms BcBOT2 durch Denaturierungsprozesse.

Die STC PenA (**Abbildung 24**) weist unter Einbezug der relativen Standardabweichung einen optimalen Temperaturbereich zwischen 10°C und 20°C auf. In der Literatur hingegen wurde für die Biotransformation ein Temperaturbereich von 25°C bis 30°C verwendet.^[73,75,71] Temperaturen oberhalb von 30°C führen auch bei PenA zu signifikanten Ausbeuteverlusten in Folge von einsetzender Denaturierung. Unterhalb von 10°C deutet sich analog zur STC BcBOT2 ein Verlauf der Temperaturkurve entsprechend der RGT-Regel an. Da die Denaturierungsprozesse neben der Temperatur auch von der Inkubationszeit abhängig sind, sollten für semi-präparative Ansätze aufgrund der längeren Inkubationszeit niedrigere Temperaturen gewählt werden, um dem negativen Effekt der Denaturierung und der eingehenden zeitlichen Veränderung der Enzymaktivität vorzubeugen. Allerdings sollte hierbei auf ein akzeptables Maß zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und vertretbarem Aktivitätsverlust geachtet werden, um hohe Ausbeuten an Produkt in möglichst kurzer Reaktionszeit zu generieren. Die Produktspezifität der STCn wird durch eine Temperaturerhöhung nicht beeinflusst, sodass beide Enzyme nicht konditionspromisk sind.

Während bei dem pH-Wert in der Literatur für BcBOT2 ein einheitlicher pH-Wert von pH 7.0 gewählt wurde,^[54,59] wurden für PenA Umsetzungen im Bereich pH 7.2 – 8.6 beschrieben.^[73–75] Daher erfolgten im Rahmen der vorliegenden Dissertation pH-Optimierungen in einem Bereich von pH 3 bis pH 11, wobei anorganische und organische Puffer verwendet wurden. Der pH-Wert stellt neben der Temperatur einen wichtigen Reaktionsparameter dar, da dieser Einfluss auf den Protonierungszustand von reaktiven Gruppen im aktiven Zentrum nimmt und dadurch die Enzymaktivität beeinflusst.^[125] Anstelle eines Universalpuffers wurden für die pH-Optimierungen hauptsächlich Good's Puffer verwendet, die sich durch eine enzymatische und hydrolytische Stabilität auszeichnen, nahezu Temperatur- und konzentrationsbeständig sind und nur eine begrenzte Wirkung auf biochemische Reaktionen haben.^[134] Dennoch kann nicht vollständig

ausgeschlossen werden, dass die ausgewählten Puffersysteme durch ihre verschiedenen Ionentypen und -stärken die Enzymaktivität unterschiedlich beeinflussen.

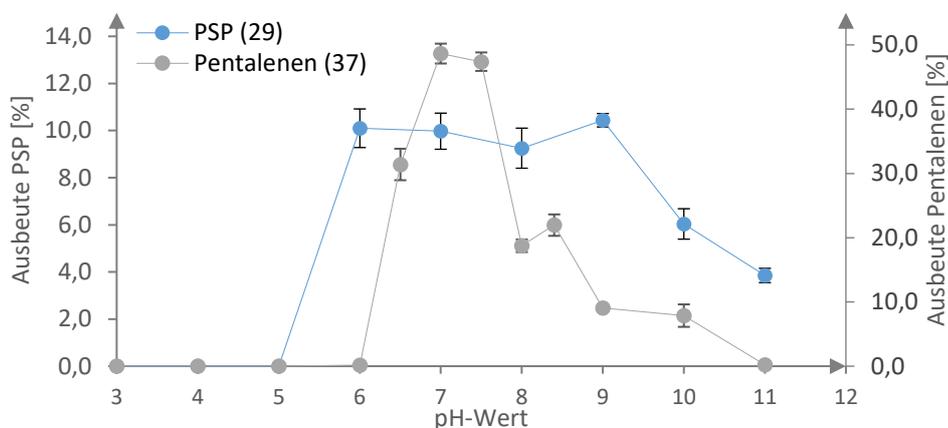


Abbildung 26: Ausbeutebestimmung anhand von PSP (29, Primärachse) und Pentalenen (37, Sekundärachse) in Abhängigkeit vom pH-Wert zur Ermittlung des optimalen pH-Wertes. Die Messungen erfolgten unter Nutzung von anorganischen und biologischen Puffersystemen sowie β -Caryophyllen als internen Standard.

Für BcBOT2 konnte ein breites pH-Optimum im Bereich von pH 6 bis pH 9 identifiziert werden (**Abbildung 26**). Bei niedrigen pH-Werten konnte hingegen keine PSP-Produktbildung beobachtet werden. Während bei pH 3.0 erneut die Hydrolyseprodukte (*E*)-Nerolidol (97) und (*E,E*)-Farnesol (96) nachgewiesen wurden, die auf eine Instabilität des eingesetzten FPP (12) zurückgeführt werden können, wurden bei pH 4.0 und pH 5.0 weder chemische noch enzymatisch generierte Produkte detektiert. Demzufolge ist einerseits das eingesetzte Substrat FPP (12) oberhalb von pH 3.0 stabil, andererseits liegt das Enzym BcBOT2 unterhalb von pH 6.0 in einem inaktivierten Zustand vor, der durch die Protonierung aktiver Aminosäurereste und durch die Verdrängung des Cofaktors aufgrund des Protonenüberschusses hervorgerufen werden könnte. Oberhalb von pH 9.0 führt eine Deprotonierung essentieller Gruppen zu einem erneuten Aktivitätsverlust. Analog verhält es sich bei der STC PenA, welche jedoch im Gegensatz zur STC BcBOT2 über ein definiertes pH-Maximum bei pH 7.0 – 7.5 verfügt und dessen Inaktivierung infolge von Deprotonierung bereits bei pH 8.0 einsetzt. Bei pH 11.0 ist das Enzym PenA vollständig inaktiviert, sodass durch die deutliche Abweichung vom pH-Optimum eine irreversible Schädigung der Tertiärstruktur angenommen werden kann. Da das pH-Optimum für PenA sehr prägnant ist, ist eine pH-Sensitivität des Enzyms wahrscheinlich, die zur einer Konformationsänderung und einer damit einhergehenden besseren Zugänglichkeit des Substrates in die aktive Tasche bei Annäherung an das pH-Optimum führen könnte. Weiterhin führt auch eine pH-Änderung bei beiden STCn zu keiner Abweichung von der Produktspezifität und bestätigt eine ausbleibende Konditionspromiskuität. Daher kann in der geschlossenen Konformation der STCn eine vollständige Abschirmung der aktiven Taschen gegenüber Lösemittelleffekten angenommen werden.^[80] Bei fungalen STCn wird eine H-1 α -Schleife verantwortlich gemacht, die über den Eingang des aktiven Zentrums legt.^[88,81] Im Fall der STC BcBOT2 existiert allerdings keine Kristallstruktur, weshalb das Vorhandensein einer solchen Schleife zum jetzigen Zeitpunkt weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann.

3.4.4 Optimierung der Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor

Um eine Inhibierung der STCn BcBOT2 und PenA durch das eingesetzte Substrat zu minimieren, wurden festgelegte Konzentrationen an Enzym ($0.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ – $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mit variierenden Substratkonzentrationen ($5 \text{ }\mu\text{M}$ – $150 \text{ }\mu\text{M}$) inkubiert und die Ausbeute an PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) bestimmt.

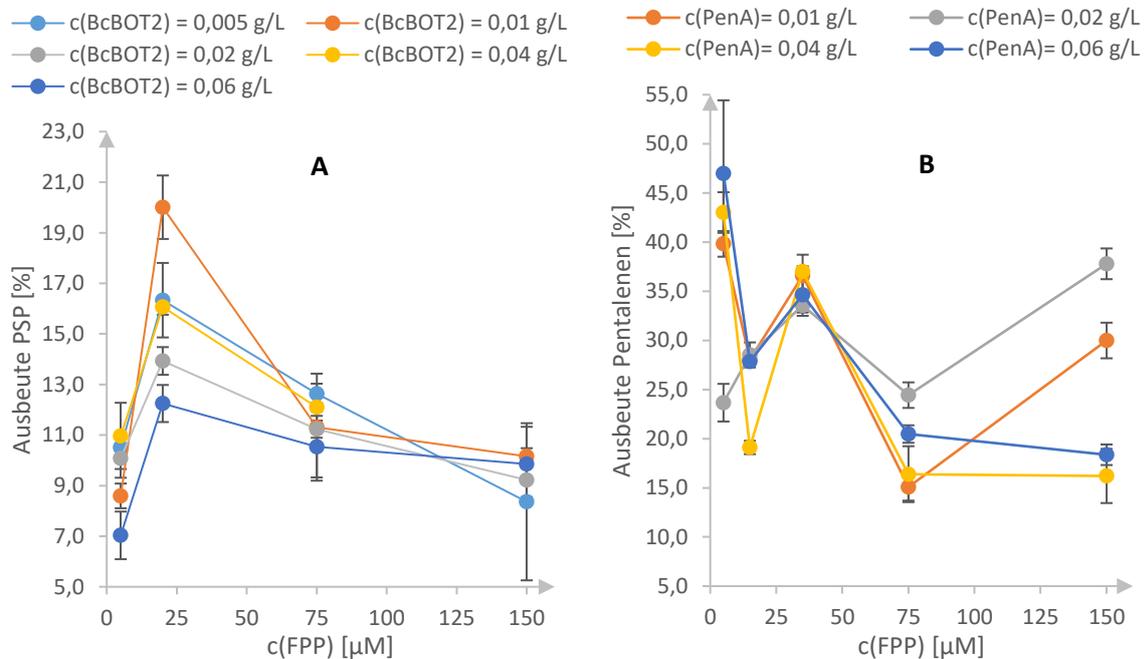


Abbildung 27: Auftragung der Ausbeuten an PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) in Prozent gegen die eingesetzte FPP-Konzentration für unterschiedliche Konzentrationen an Enzym BcBOT2 (A) und PenA (B).

Bei der STC BcBOT2 konnte für alle Enzymkonzentrationen ein einheitliches Maximum für die Bildung von PSP (**29**) bei einer Substratzugabe von $25 \text{ }\mu\text{M}$ FPP (**12**) ermittelt werden (**Abbildung 27**). Dabei konnte mit $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Enzymkonzentration die höchste Ausbeute erzielt werden. Oberhalb von $25 \text{ }\mu\text{M}$ kann eine Abnahme der Ausbeute an PSP (**29**) beobachtet werden, die auf eine Substratinhibierung zurückgeführt werden kann. Diese stellt eine besondere Form der unkompetitiven Hemmung dar, bei der ein zweites Substratmolekül an das Enzym bindet und einen unproduktiven Komplex ausbildet der die eigentliche Katalyse stört.^[4,10] Auch eine kompetitive Hemmung durch das entstehende Produkt, eine direkte Folge der Reversibilität der Enzymreaktion, kann nicht ausgeschlossen werden. Bei einer geringeren Substratzugabe ($5 \text{ }\mu\text{M}$) könnte hingegen die Diffusion der beschränkende Faktor sein, der eine höhere Ausbeute innerhalb der festgelegten Inkubationsdauer hemmt. Für die STC PenA konnte ein Ausbeutemaximum bei $35 \text{ }\mu\text{M}$ FPP (**12**) identifiziert werden. Analog zur STC BcBOT2 resultiert eine geringere FPP-Konzentration in einer niedrigeren Produktausbeute. Bei steigender FPP-Konzentration kann hingegen nur für die Enzymkonzentrationen von $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ eine unkompetitive Hemmung beobachtet werden. Für $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Enzymkonzentrationen wird hingegen ein erneutes Maximum bei $150 \text{ }\mu\text{M}$ beobachtet. Ein zweites Maximum ist eher untypisch für enzymatische Reaktionen, sodass eine fehlerbehaftete Probenvorbereitung als Ursache in Frage kommen könnte. Um möglichst geringe Mengen an Katalysator einzusetzen, wurden weitere analytische Enzymtests

mit einer Konzentration von $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PenA durchgeführt. Im Hinblick auf semi-präparative Umsetzungen ist zudem eine kontinuierliche Substratzugabe von Vorteil, um unkompetitive Hemmungen durch das Substrat vorzubeugen.

Zur Überprüfung einer optimalen Cofaktor-Konzentration erfolgten analytische *in vitro* Enzymtests mit einer MgCl_2 -Konzentration im Bereich von 0.5 mM – 20 mM (**Abbildung 28**). Hierbei konnte für BcBOT2 eine optimale Konzentration von 2.5 mM – 10 mM identifiziert werden, während bei PenA ein breites Maximum oberhalb von 5 mM MgCl_2 erzielt wurde. Geringere Konzentrationen führen zu einer unvollständigen Aktivierung des Enzyms. Bereits RILLING beschrieb die katalytische Wirkung von Magnesium- und Mangan-Ionen auf die Hydrolyse von allylischen Diphosphaten, welche bei Vorhandensein der Ionen bereits bei $\text{pH } 7.0$ auftrat.^[135] Die Katalyseeigenschaft der Metallionen nahm dabei mit steigender Konzentration zu, sodass bei der Durchführung der analytischen und semi-präparativen Ansätze mit möglichst geringen Konzentrationen an MgCl_2 gearbeitet werden sollte. Des Weiteren trägt der Cofaktor Mg^{2+} in Konzentrationen oberhalb von 10 mM zu einer Präzipitation des eingesetzten Substrates bei, da der Überschuss zu einem Austausch des Gegenions Ammonium durch Magnesium im eingesetzten FPP-Salz führt.^[104,136] Infolge eines geringeren Löslichkeitsproduktes wird die Präzipitation des Substrates begünstigt und das Substrat der Biotransformation entzogen. Dies konnte optisch anhand einer fortschreitenden Trübung bestätigt werden.

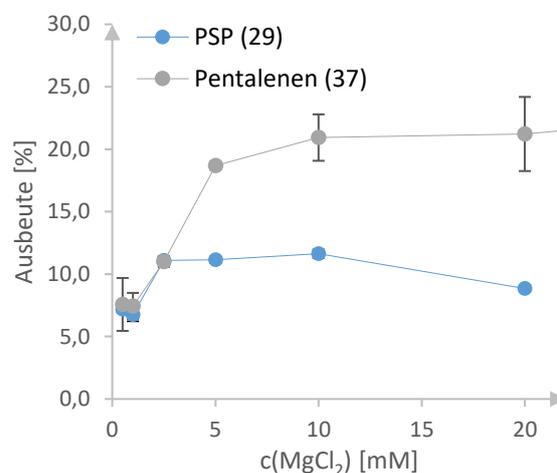


Abbildung 28: Ermittlung der optimalen Cofaktor-Konzentration in Abhängigkeit von der Ausbeute an PSP und Pentalenen durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an MgCl_2 zur Biotransformation. Die Linien zwischen den Messpunkten dienen lediglich der Veranschaulichung.

Anhand der Optimierungen konnte die Ausbeute an Presilphiperfolan- 8β -ol (**29**) und Pentalenen (**37**) signifikant gesteigert werden. So konnte im Fall der STC BcBOT2 die ursprüngliche Ausbeute an PSP (**29**) von $9.6 \pm 0.8 \%$ durch die Optimierungen auf $20.0 \pm 2.1 \%$ gesteigert werden. Es konnte somit eine Ausbeuteerhöhung von 108% erreicht werden. Für die STC PenA konnte eine Ausbeutesteigerung an Pentalenen (**37**) von $21.6 \pm 1.4 \%$ auf $48.7 \pm 1.5 \%$ erzielt werden. Dies entspricht einer Steigerung der Ausbeute um 125% . In beiden Fällen wurde die Ausbeuteerhöhung insbesondere durch die Anpassung der Reaktionsparameter Temperatur und pH-Wert sowie einer Reduktion des eingesetzten Substrates zum Abbau einer unkompetitiven Hemmung erreicht. In der nachfolgenden **Tabelle 4** sind die einzelnen Maxima der Optimierungen zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 4: Durch die Optimierungen festgelegte Reaktionsparameter und Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor. Für Optima, welche sich über einen breiteren Bereich erstreckten, sind in der Tabelle jene Werte angegeben, die für die nachfolgenden analytischen Enzymtests angewendet wurden. Während es sich dabei oftmals um Werte handelt, die mittig im optimalen Bereich liegen, wurden im Hinblick auf die Reaktionsgeschwindigkeit Temperaturen im oberen Bereich der Optima gewählt. Als Puffer wurde für beide Biotransformationen ein 50 mM HEPES Puffer mit entsprechendem pH-Wert gewählt, da dieser auch für die Optimierung genutzt wurde.

	t [min]	T [°C]	pH	U·min ⁻¹	C _{Substrat}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15	24	7.5	300	20 μM	0.01 mg·L ⁻¹	5 mM
PenA	30	20	7.0	600	35 μM	0.01 mg·L ⁻¹	10 mM

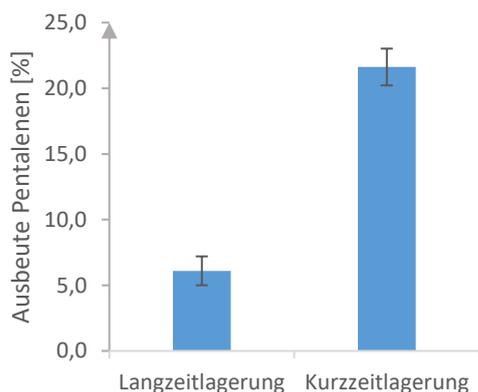


Abbildung 29: Biotransformation von FPP mit PenA zur Untersuchung der Alterung des FPP. Langzeitlagerung: > 2 Jahre, Kurzzeitlagerung: > 6 Monate. Die Analyse wurde vor der Optimierung der Reaktionsparameter T und pH sowie den Studien zur Konzentration an Substrat, Enzym und MgCl₂ durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine weitere Umsetzung mit PenA durchgeführt, bei der der Einfluss der Alterung des Substrates betrachtet wurde. Anhand der **Abbildung 29** zeigt sich, dass die Ausbeute an Pentalenen (**37**) durch die Nutzung eines kurzzeitig gelagerten Substrates deutlich gesteigert wird. So kann die anfänglich unter Kapitel 3.3 semi-quantitativ ermittelte Ausbeute von 6.1 % ± 1.1 % vor Beginn der Optimierungen durch Nutzung eines kürzer gelagerten Substrates auf 21.6 % ± 1.4 % erhöht werden. Ursächlich ist hierbei die leichte Hydrolysierbarkeit des allylischen Diphosphats unter aciden Bedingungen.^[131,132] Nach der

Abspaltung des Diphosphats wird das Substrat nicht mehr von den STCn erkannt, da eine Bindung und Ausrichtung des Substrates durch den trinuklearen Metallcluster in der aktiven Tasche verwehrt bleibt. Infolgedessen bleibt die Aktivierung des Diphosphatsensors der Effektortriade aus, weshalb die Ausbildung des *Induced-Fit* entfällt. Dementsprechend sollten für semi-präparative Umsetzungen möglichst Substrate verwendet werden, die nur kurzzeitig gelagert wurden. Der Alterungseinfluss der Substrate ist zudem auch ein Grund, weshalb die vorhergehenden Optimierungen von BcBOT2 und PenA nicht direkt miteinander vergleichbar sind, da für BcBOT2 eingelagertes Substrat und für PenA kurzzeitig gelagertes FPP (**12**) verwendet wurde.

3.4.5 Optimierung für semi-präparative Ansätze mit FPP (12) als Substrat

Für die Umsetzung im semi-präparativen Maßstab werden die vorhergehenden Optimierungen als Grundlage verwendet und durch weitere analytische Messungen ergänzt. So können hohe Enzymkonzentrationen eine quantitative Extraktion der entstehenden hydrophoben Terpene erschweren. Da die Zugabe von *n*-Pentan als Extraktionsmittel zu einer teilweisen Denaturierung des Enzyms beiträgt, gelangen hydrophobe Seitenkettenreste an die Proteinoberfläche, wodurch es zu einer Aggregation des Proteins kommen kann. Aufgrund der sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Oberfläche der Aggregate sammeln sich diese bevorzugt zwischen der Phasengrenze, sodass eine vollständige Abtrennung der organischen Phase erschwert wird. Des Weiteren können die entstehenden Terpene mit hydrophoben Seitenketten des Enzyms wechselwirken und dadurch der Übergang in die organische Phase gehemmt werden. Daher wurden im analytischen Maßstab nach Beendigung der Biotransformation steigende Enzymaktivitäten an Proteinase K (Prot K) zugesetzt, um den Einfluss der Proteinase auf die Produktausbeute zu beurteilen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 2.5 mM CaCl₂, um einer Autolyse vorzubeugen. Nach Zugabe der Prot K wurden die Enzymtests jeweils bei der optimalen Temperatur der STCn und der Prot K inkubiert, ehe die Extraktion mit *n*-Hexan erfolgte.

Anhand der **Abbildung 30** zeigt sich, dass für BcBOT2 als auch für PenA die Prot K in Abhängigkeit von der zugesetzten Enzymeinheit einen Einfluss auf die Produktausbeute hat. Diese wird zudem entscheidend von der Wahl der Inkubationstemperatur beeinflusst. Als mögliche Ursache kann ein Probenverlust durch Abdampfen in Betracht gezogen werden. Auch eine Interaktion mit den hydrophoben Bestandteilen der Reaktionsgefäße oder mit der Prot K kann nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten semi-präparative Umsetzungen in verschlossenen Glasgefäßen ausgeführt werden und eine verlängerte Inkubationszeit unterhalb der Arbeitstemperatur der Prot K ausgewählt werden.

Neben einer möglichen kompetitiven Hemmung durch das Produkt konnte PARGELLIS auch eine Inhibierung der Synthesenaktivität durch das anorganische Diphosphat, welches als Nebenprodukt der Biotransformation anfällt nachweisen.^[64] Daher wurde der Einfluss einer Pyrophosphatase (PPase) auf die Produktausbeute an Pentalenen (**37**) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die PPase

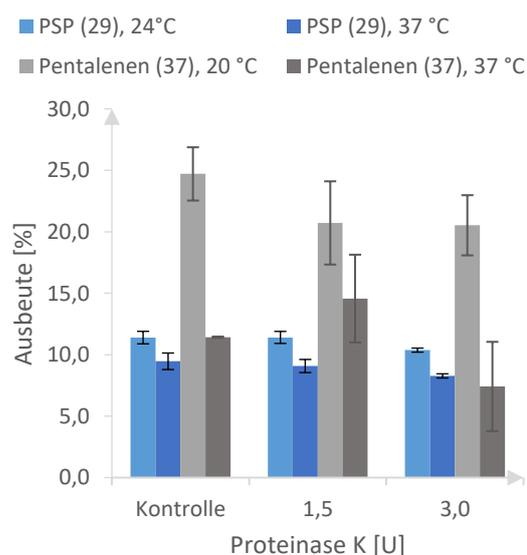


Abbildung 30: Untersuchung des Einflusses einer Prot K auf die Ausbeute an Produkt bei zwei verschiedenen Temperaturen. Die Zugabe der Prot K erfolgte vor der Extraktion aber nach beendeter Biotransformation als Vergleich diente eine Umsetzung ohne Zugabe von Prot K (Kontrolle).

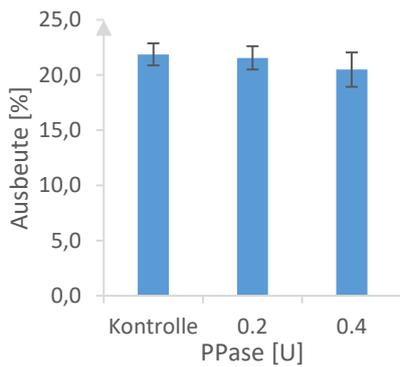


Abbildung 31: Einfluss einer PPase auf die Produktausbeute an Pentalenen. Der Kontrolle wurde keine PPase zugesetzt.

unter Einbezug der relativen Standardabweichungen keinen Einfluss auf die Produktausbeute nimmt (**Abbildung 31**). Um eine Inaktivität der PPase auszuschließen, wurde ein kolorimetrisches Testverfahren von HEINONEN und LAHTI angewendet, bei dem das durch die PPase freigesetzte *ortho*-Phosphat in Form von Phosphormolybdat ($\lambda_{355\text{ nm}/590\text{ nm}}$) detektiert wurde.^[137] Hierbei konnte bei Zugabe von PPase die Freisetzung von *ortho*-Phosphat nachgewiesen werden, sodass eine PPase-Aktivität vorliegt. Da keine Beeinträchtigung der Produktausbeute beobachtet werden konnte, wurde die PPase bei semi-präparativen Ansätzen zugesetzt, um einer Inhibierung durch größere Mengen an freigesetztem Diphosphat entgegenzuwirken.

Da zudem der Cofaktor zu einer Präzipitation der eingesetzten Diphosphatsalze führt, wurde Tween®20 als Detergenz zur Löslichkeitserhöhung getestet. Dieses hat sich in einer Testreihe von OBERHAUSER bewährt, da es im Gegensatz zu anderen Detergenzien nur eine geringe Schaumbildung während der Extraktion verursacht und zu keinem Aktivitätsverlust beiträgt.^[112] Der Einfluss des Polysorbats auf die Produktausbeute wurde im analytischen Maßstab anhand der Biotransformation von PenA und FPP (**12**) untersucht (**Abbildung 32, A**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Tween®20 keine inhibierenden Effekte auf die Biotransformation ausübt. Auch eine Steigerung der Tween®20 Konzentration führte zu keinem signifikanten Verlust an Ausbeute, sodass die Enzymaktivität nicht durch das Detergenz beeinflusst wurde.

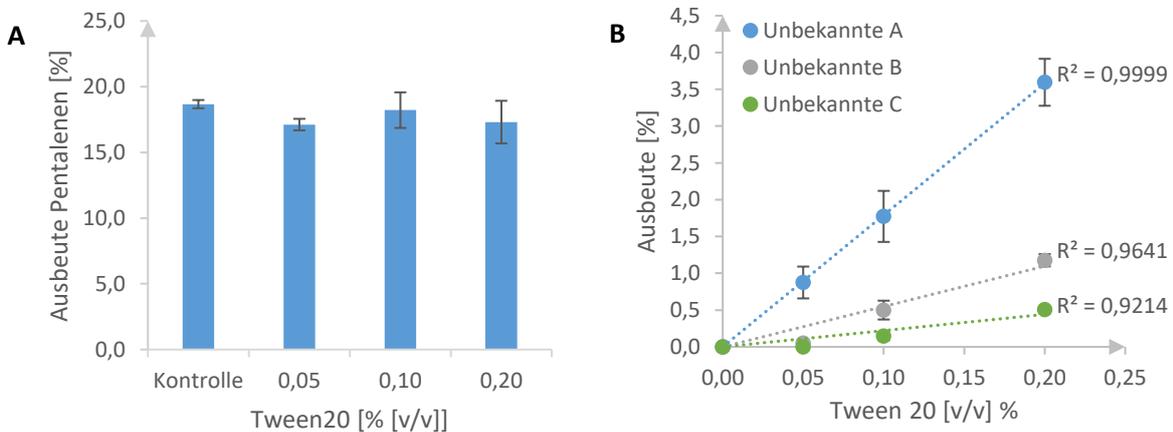


Abbildung 32: A) Ausbeute an Pentalenen (**38**) bei Zusatz steigender prozentualer Volumenanteile an Tween®20. Der Kontrolle wurde kein Tween®20 zugesetzt. **B)** Linearer Zusammenhang zwischen der Ausbeute der Unbekannten A – C und dem Volumenanteil an Tween®20. Das geringe Bestimmtheitsmaß R^2 der Unbekannten B und C kann auf Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze zurückgeführt werden. Die Unbekannten konnten in der Kontrollmessung (0 % [v/v] Tween®20) nicht nachgewiesen werden.

Allerdings wurde mit steigender Konzentration an Tween®20 die Ausbildung von drei weiteren Peaks im Chromatogramm beobachtet (**Abbildung 32, B**). Die semi-quantitativen Ausbeuten der unbekannt Komponenten weisen dabei einen linearen Zusammenhang mit der eingesetzten Tween®20 Konzentration auf. Da die Peaks in der Kontrollmessung nicht detektierbar sind, können die Verbindungen auf Bestandteile des Tween®20 zurückgeführt werden, die während der

Aufarbeitung der Enzymtests mitextrahiert wurden und bei denen es sich um mögliche Autoxidationsprodukte des Polysorbats handeln könnte.^[138] Im analytischen Maßstab wird daher auf einen Detergenzienzusatz verzichtet. Im semi-präparativen Maßstab werden hingegen 0.02 % [v/v] Tween®20 zugesetzt, da eine höhere Gesamtkonzentration an Cofaktor vorliegt, die eine Substratpräzipitation fördert. Weiterhin verfügt Tween®20 über eine stabilisierende Wirkung gegenüber Proteinaggregation.^[138] Der prozentuale Volumenanteil an Tween®20 wurde hierbei jedoch möglichst gering gewählt, da neben der Coextraktion auch eine vollständige Phasentrennung durch die Tenseigenschaft des Tween®20 gehemmt wird.^[139]

Weiterhin wurde für die semi-präparativen Ansätze der Einfluss von Schütteln während der Inkubationsdauer anhand von analytischen Enzymtests im Schüttler untersucht (**Abbildung 33**). Durch die Bewegung werden die Homogenisierung des Systems und diffusionsabhängige Vorgänge unterstützt. Sowohl für die Biotransformation von BcBOT2 als auch PenA kann durch die Rotationsbewegung eine Steigerung der Produktausbeute erzielt werden. Während bei BcBOT2 ein Maximum unter Einbezug der

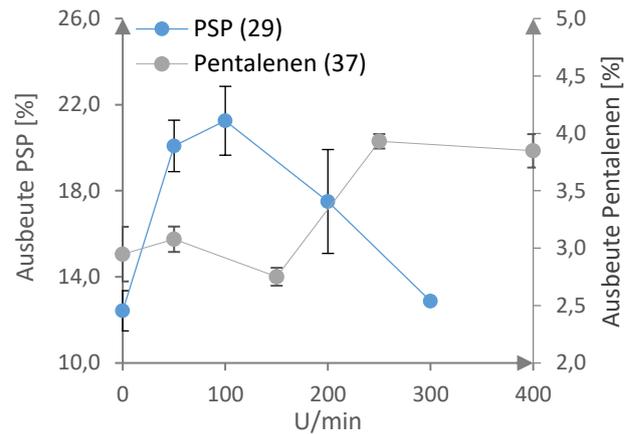


Abbildung 33: Verwendung eines Schüttlers zur Homogenisierung der Enzymtest während der Inkubationsdauer.

relativen Standardabweichung zwischen 50 U·min⁻¹ und 200 U·min⁻¹ auftritt, wird bei PenA ein sprunghafter Anstieg ab 250 U·min⁻¹ beobachtet. Der bei der STC BcBOT2 eintretende Ausbeuteverlust oberhalb von 200 U·min⁻¹ kann auf durch Schütteln induzierte Scherkräfte und Luftsauerstoffeintrag zurückgeführt werden, die eine Enzympräzipitation begünstigen.^[140]

Aufgrund der in der Literatur variabel gewählten pH-Werte^[73–75], wurde für die STC PenA ein Stabilitätstest bei 20°C und unterschiedlichen pH-Werten sowie Puffersystemen durchgeführt (**Abbildung 34**). Für den Stabilitätstest wurden die analytischen Enzymtests zunächst ohne das Substrat über definierte Zeiträume bei 20°C equilibriert, ehe die Biotransformation durch Zusatz von FPP initiiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass mit Ausnahme der Inkubation bei pH 8.4 ein deutlicher Ausbeuteverlust innerhalb einer Lagerungsdauer von 30 Minuten beobachtet werden konnte, ehe sich anschließend ein annähernd konstanter Verlauf bei verringerter Ausbeute einstellte. Das Puffersystem Tris-HCl (pH 7.0) wies im Vergleich zum HEPES Puffer (pH 7.0) einen stärkeren Aktivitätsverlust auf, der durch die unterschiedlichen Ionentypen hervorgerufen wird.^[4] Die Inkubation mit Tris-HCl-Puffer bei pH 8.4 zeigte hingegen über die gesamte Lagerungsdauer keinen signifikanten Ausbeuteverlust, sodass eine bessere Langzeitstabilität der STC PenA bei pH 8.4 nachgewiesen werden konnte. Dass ohne Lagerungsdauer die Ausbeute an Pentalenen bei pH 8.4 deutlich geringer ausfällt als bei niedrigeren pH-Werten steht im Einklang mit der pH-Optimierung (siehe 3.4.3). Aufgrund der längeren Inkubationsdauer bei semi-präparativen Umsetzungen ist die Enzymstabilität jedoch von entscheidender Bedeutung. Durch die verbesserte

Langzeitstabilität sind ferner geringere Mengen an Katalysator notwendig. Folglich eignet sich das pH-Optimum lediglich für analytische *in vitro* Enzymtests mit kurzer Inkubationsdauer, jedoch nicht für semi-präparative Ansätze, bei denen Enzymstabilität und Ausbeute in einem angemessenen Verhältnis zueinanderstehen sollten.

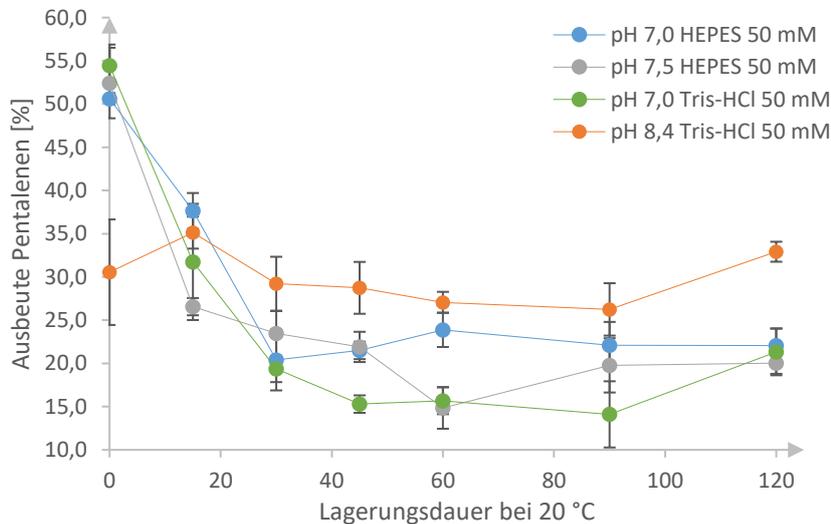


Abbildung 34: Einfluss der Lagerung bei 20°C durch unterschiedliche pH-Werte und Puffersysteme. Die Enzymaktivität wurde indirekt über die Ausbeute an Pentalenen bestimmt. Für die Versuchsdurchführung wurden die Assays ohne Substrat für eine definierte Zeitspanne (0 min – 120 min) bei 20°C equilibriert und anschließend mit FPP versetzt, um die Biotransformation zu initiieren. Die Verbindungslinien zwischen den einzelnen Messpunkten dienen lediglich der Veranschaulichung.

Weitere Optimierungen, die für die Durchführung von semi-präparativen Umsetzungen mit den unnatürlichen Substraten durchgeführt wurden, werden in Kapitel 3.8 präsentiert.

3.4.6 Abweichungen zwischen analytischer und semi-präparativer Ausbeute

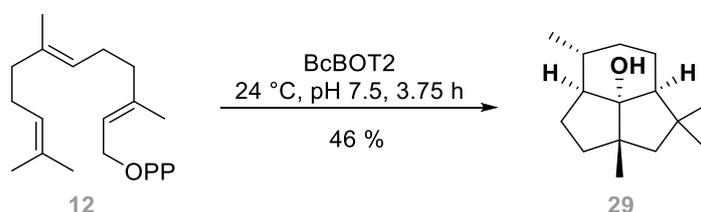
Bei den nachfolgenden semi-präparativen Umsetzungen wurden zumeist höhere Ausbeuten als bei den vergleichbaren Umsetzungen im analytischen Maßstab gefunden. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei den semi-präparativen Biotransformationen um die Ausbeute des erhaltenen Rohproduktes handelt, während bei der Ausbeutebestimmung im analytischen Maßstab die Peakfläche des gesuchten Analyten der Berechnung zugrunde gelegt wurde. Dementsprechend wird die Ausbeute im semi-präparativen Maßstab überschätzt, da Verunreinigungen und Nebenprodukte mit einbezogen werden. Im Falle einer Multiproduktbildung, setzt sich die Ausbeute des Rohproduktes ferner aus den prozentualen Anteilen der einzelnen Produkte zusammen. Zum anderen erfolgte die Bestimmung der Ausbeute im analytischen Maßstab lediglich semi-quantitativ, da auf eine externe Kalibration des Analyten, aufgrund der nicht kommerziellen Verfügbarkeit von PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) verzichtet werden musste. Die Ausbeuteermittlung erfolgte daher über einen direkten Vergleich der Peakflächen von Analyt und dem in bekannten Mengen zugesetzten internen Standard. Daher wurde als Detektor ein FID gewählt, der über ein molares Ansprechverhalten für eine Vielzahl von Verbindungen verfügt.^[121] Liegen dennoch abweichende Responsefaktoren vor, so kann die tatsächliche Ausbeute von der semi-quantitativ ermittelten abweichen. Dennoch eignet sich die

semi-quantitative Bestimmung hervorragend, um anhand der Ausbeuten optimale Bedingungen der Biotransformationen zu ermitteln und einen ersten Eindruck zur Akzeptanz der Substrate zu erhalten.

Des Weiteren unterscheiden sich die semi-präparativen Umsetzungen von den analytischen Enzymtests hinsichtlich einer Vielzahl von Variablen, wie einer längeren Reaktionszeit, einer kontinuierlichen Substratzugabe zur Vermeidung einer unkompetitiven Hemmung, einem größeren Volumen sowie der Zugabe einer PPase. Letztere zeigte zwar im analytischen Maßstab keinen Einfluss auf die Ausbeute, kann allerdings im semi-präparativen Maßstab aufgrund einer erhöhten Substratkonzentration von Bedeutung sein. Auch, dass die semi-präparativen Umsetzungen in Glasgefäßen durchgeführt wurden, und damit eine Wechselwirkung der hydrophoben Terpeneide mit den Polypropylenreaktionsgefäßen unterbunden wurde, könnte zu einer Steigerung der Produktausbeute im semi-präparativen Maßstab beigetragen haben. Zudem hat die Alterung des eingesetzten Substrats einen entscheidenden Einfluss auf die Produktausbeute. Folglich ist eine direkte Vergleichbarkeit der Ausbeute von analytischen Enzymtests und semi-präparativen Umsetzungen nur bedingt möglich.

3.5 Semi-präparative Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (12)

Ausgehend von den durchgeführten Optimierungen erfolgte zunächst die Umsetzung von BcBOT2 mit dem natürlichen Substrat FPP (12) im semi-präparativen Maßstab⁹, um das Hauptprodukt als literaturbekanntes Produkt PSP (29) zu bestätigen. Dazu wurde das Enzym BcBOT2 zunächst in *E. coli* BL21 (DE3) heterolog exprimiert, mittels FPLC gereinigt, aufkonzentriert und in den Homogenisationspuffer überführt. Neben Tween®20 zur Verbesserung der Löslichkeit sowie einer PPase zum Abbau des anorganischen Diphosphats wurde nach Beendigung der Biotransformation eine Proteinase K sowie CaCl₂ zum Abbau der STC BcBOT2 zugegeben. Zur Vermeidung einer unkompetitiven Hemmung erfolgte keine vollständige Substratzugabe (1.5 mM FPP) zu Beginn der Umsetzung, sondern eine diskontinuierliche Zugabe von 200 µM. Das Rohprodukt wurde als gelbliches Öl in 46 % Ausbeute erhalten (Schema 7).



Schema 7: Semi-präparative Biotransformation von FPP (12) mit BcBOT2 zu dem literaturbekannten Produkt Presilphiperfolan-8β-ol (29) in 46% Ausbeute.

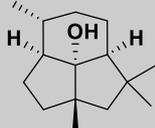
⁹ Eine ausführliche Beschreibung zur Durchführung und Aufarbeitung dieser und aller nachfolgenden semi-präparativen Umsetzungen kann unter Kapitel 10.6 und 10.7 eingesehen werden.

3.5.1 Analytische Charakterisierung und Strukturaufklärung

Das Rohprodukt wurde anschließend mittels GC-MS, HR-GCMS und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Hierbei wurde für das Produkt PSP (**29**) nach chromatographische Trennung mit einer polaren Trennsäule in einer Reinheit von 77.2 %, bestimmt anhand der prozentualen Flächenprozent, erhalten (**Tabelle 5**). Abweichungen bezüglich der Reinheit zwischen polarer und unpolare Säule können durch Signalüberlagerungen und Sensitivitätsunterschiede begründet werden. Insgesamt liegt jedoch eine gute Übereinstimmung vor. Die weiteren Flächenprozent verteilen sich auf weitere Nebenprodukte (s. Kap. 3.5.2), (*E,E*)-Farnesol ($A[\%]_{\text{FFAP}} = 1.9 \%$) als Hydrolyseprodukt sowie auf mitextrahierte Verunreinigungen. Hinsichtlich der HR-GC-MS Analyse wurde eine deutliche Abweichung von der zur erwarteten Masse von 222.1984 [M^+] verzeichnet. Dies kann auf die Abspaltung der Hydroxygruppe in Form von Wasser zurückgeführt werden, die infolge der verwendeten Elektronenstoßionisation auftritt. Dadurch würde sich für das Molekül eine theoretische Masse von 204.1878 [$M^+ - H_2O$] ergeben, die eine sehr gute Übereinstimmung mit der ermittelten Masse aufweist (**Tabelle 5**). Über eine GC-Olfaktometrie konnte für das Produkt PSP (**29**) kein sensorisches Profil nachgewiesen werden.

Die Strukturaufklärung erfolgte durch NMR-Spektroskopie anhand ein- und zweidimensionaler Experimente. Aufgrund der chemischen Verschiebungen, skalaren Kopplungen und Multiplizitäten der Verbindung sowie auftretenden Kreuzkopplungen in den 2D-Experimenten kann das Hauptprodukt eindeutig als Presilphiperfolan-8 β -ol (**29**) identifiziert werden. Abweichungen des Fragmentierungsmusters im MS-Spektrum können demzufolge auf unterschiedliche Einstellungen von Ionenquelle und Detektor zurückgeführt werden. Neben der Strukturformel kann die relative Stereochemie der Verbindung zudem durch einen Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren mit der Literatur bestätigt werden.^[59]

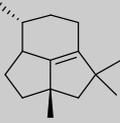
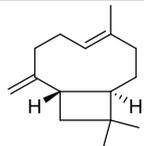
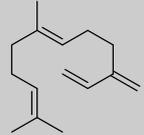
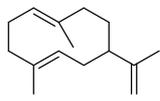
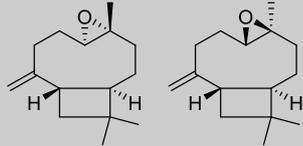
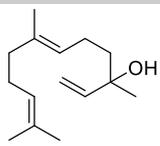
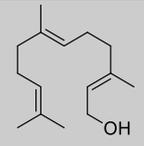
Tabelle 5: Retentionsindices RI und prozentuale Flächenprozent A[%] des Produktes PSP (**29**) bei Nutzung chromatographischer Säulen unterschiedlicher Polarität. Neben dem Mol- und Basispeak (MP, BP) sind charakteristische Fragmentierungen (m/z) nach sinkender Intensität aufgelistet. Weiterhin sind die berechnete und gefundene hochaufgelöste Masse (HR-GCMS) und die Ergebnisse der GC-Olfaktometrie (GCO) des Produktes aufgelistet.

Produkt	RI _{DB1}	A [%]	RI _{DB5}	A[%]	RI _{FFAP}	A[%]
 (29)	1585	79.3	1623	79.6	2084	77.2
	MP	BP	m/z-Fragmentierungsmuster			
	222	119	91, 189, 105, 133, 147, 161, 204, 175, 207, 69, 79			
	HR-GCMS			GC-O		
	berechnet:	222.1984 [M^+]		kein sensorisches Profil		
gefunden:	204.1879 [$M - H_2O$] ⁺					

3.5.2 Qualitative Bestimmung von Nebenkomponenten durch GC-MS-Analyse

Durch einen Vergleich der RI zweier Säulen unterschiedlicher Polarität (DB1, FFAP) sowie den MS-Spektren der Verbindungen mit Datenbanken¹⁰ ist es möglich gewesen, erstmals Nebenprodukte der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**) qualitativ zu identifizieren (**Tabelle 6**). Durchgeführte Mutagenesestudien ermöglichten zudem eine zusätzliche Identifikation weiterer Nebenkomponenten der Biosynthese (siehe Kap. 3.15).

Tabelle 6: Identifizierte Nebenprodukte der Biotransformation BcBOT2 mit FPP (**12**). Die Identifikation erfolgte durch einen Vergleich der RI zweier Säulen und MS-Spektren mit Datenbanken. Neben der Bezeichnung und der Strukturformel der Verbindungen sind die Retentionsindices (RI) prozentualen Flächenprozent (A[%]) für die DB-1 und FFAP-Säule angegeben. Eine Trennung der Caryophyllenoxid Diastereomere (**100**) gelang durch eine säulenchromatographische Trennung mit einer FFAP-Säule.

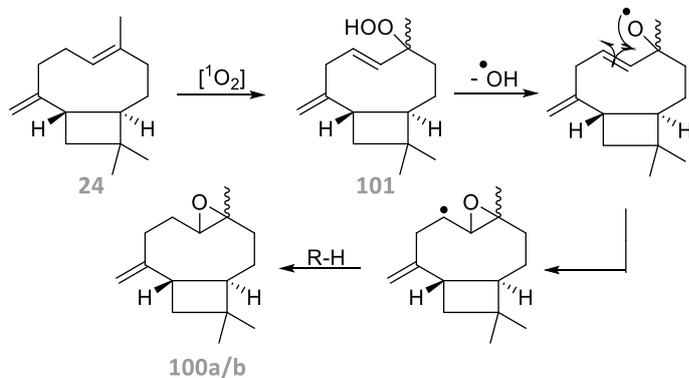
Verbindung	Strukturformel	RI _{FFAP}	A[%] _{FFAP}	RI _{DB1}	A[%] _{DB1}
Presilhiperfol-7-en (98)		1422	0.2	1340	0.1
β-Caryophyllen (24)		1615	0.4	1423	0.3
(E)-β-Farnesen (99)		1714	0.3	1449	0.3
Germacren A (62)		1754	3.3	1497	2.5
Caryophyllenoxid (100a/b)		2016 2027	0.8 1.5	1568	1.6
(E)-Nerolidol (97)		2041	1.2	1551	1.6
(E,E)-Farnesol (96)		2363	1.9	1703	0.9

Neben dem Hydrolyseprodukt (*E,E*)-Farnesol (**96**) konnten insgesamt sechs Biosyntheseprodukte auf beiden Säulen identifiziert werden (**Tabelle 6**). Analog zu dem Hauptprodukt PSP (**29**) weist das Produkt Presilhiperfol-7-en (**98**) ein kompaktes Tricyclo[5.3.1.0]undecan-Grundgerüst auf und

¹⁰ Nutzung der Datenbanken der Symrise AG.

kann somit ebenfalls der Strukturgruppe der Presilphiperfoliane zugeordnet werden. Folglich fungiert das kationische Intermediat **30** auch als Vorläufer für das Nebenprodukt **98**.^[34,53] Anstelle einer nucleophilen Addition an **30** erfolgt eine Deprotonierung an Position 10, die zu einer Beendigung der kationischen Reaktionskaskade und zur Ausbildung von Presilphiperfol-7-en (**98**) führt (Schema 9, Weg d).

Die detektierten Diastereomere des Caryophyllenoxids (**100a/b**) können hingegen kein direktes Produkt der Biosynthese sein, sondern wurden durch Luftsauerstoffeintrag während der Biotransformation, infolge von Schütteln des Reaktionsansatzes, aus β -Caryophyllen (**24**) gebildet. Studien von SKÖLD zeigten bereits, dass eine spontane Autoxidation des β -Caryophyllen (**24**) in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Caryophyllenoxid (**100**) als Hauptprodukt führen.^[141] Für den autoxidativen Prozess wird eine Reaktion eines Singulett-Sauerstoffs mit der endozyklischen Doppelbindung angenommen, wobei Hydroperoxid **101** als ein primäres Oxidationsprodukt erzeugt wird. Durch die substituierte Alkylgruppe wird hierbei die Reaktivität der beteiligten Doppelbindung



Schema 8: Postulierter Mechanismus für die Bildung des Caryophyllenoxids (**100a/b**) aus β -Caryophyllen (**24**) durch einen autoxidativen Prozess. Als primäres Oxidationsprodukt wird das Hydroperoxid **101** angenommen.^[141]

erhöht.^[142] Das instabile Hydroperoxid **101** reagiert anschließend in einem radikalischen Prozess direkt zum stabileren und weniger reaktiven sekundären Oxidationsprodukt Caryophyllenoxid (**100a/b**) (Schema 8).^[141] Da die Bildung des Hydroperoxids sowohl über die *re*- wie auch die *si*-Seite erfolgen kann, werden im Falle der Autoxidation beide Diastereomere des Caryophyllenoxids (**100**) ausgebildet, was durch Detektion auf der FFAP Trennsäule auch bestätigt werden konnte. Das Biosyntheseprodukt β -Caryophyllen (**24**) wird hingegen durch die STC BcBOT2 durch eine 11,1-Zyklisierung und einer sich anschließenden Deprotonierung mit Beendigung der Reaktionskaskade erhalten (Schema 9, Weg e). Durch die Identifikation von **24** werden zudem die postulierten Reaktionsmechanismen zur Bildung des PSP (**29**) nach HANSON (Weg a) und TANTILLO (Weg c) unterstützt, während die Biosynthese über das 2-*epi*-Caryophyllen (Weg b, s. Kap. 1.3.3) nicht bestätigt werden kann.^[57,59,61]

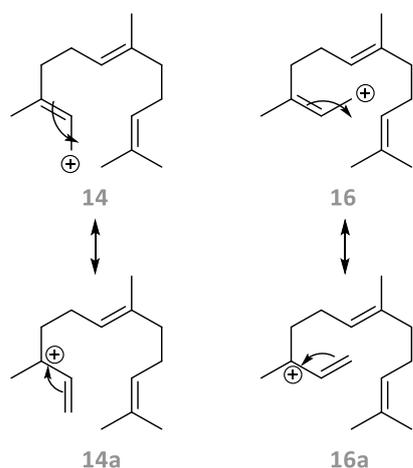


Abbildung 35: mesomere Grenzstrukturen **14a** und **16a** des Farnesyl (**14**)- und Nerolidylkations (**16**).

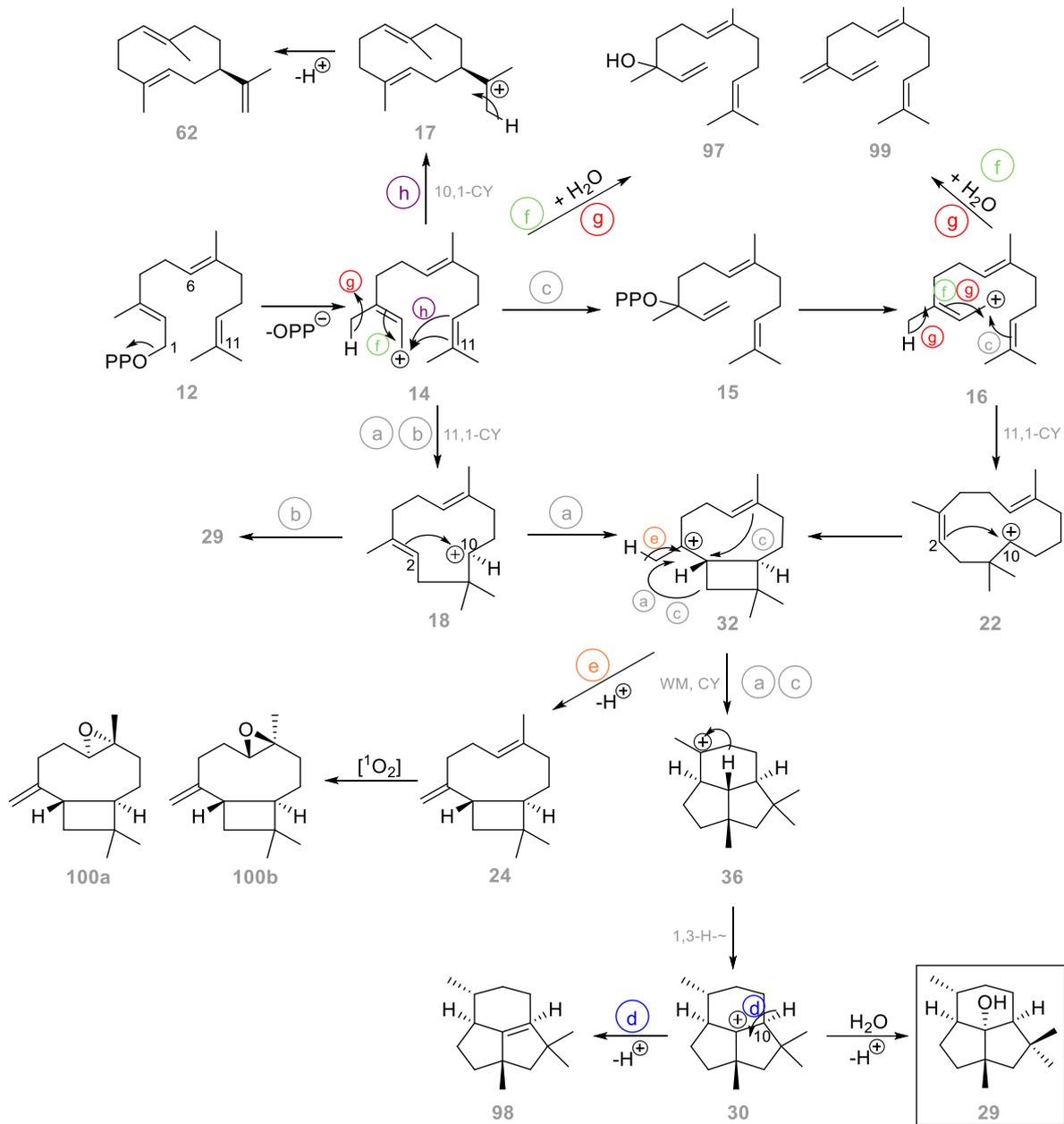
Da (*E*)-Nerolidol (**97**) und (*E*)- β -Farnesen (**99**) nicht Bestandteil der Negativkontrolle sind, können die Verbindungen ebenfalls der BcBOT2-Biosynthese zugeordnet werden. Beide Produkte können ausgehend vom Farnesylkation (**14**) oder dem Nerolidylkation (**16**) gebildet werden (**Schema 9**, Weg f und g).^[29,143] Während (*E*)- β -Farnesen (**99**) durch Deprotonierung an der Methylgruppe gebildet wird, kann das (*E*)-Nerolidol (**97**) durch Addition von Wasser an die tertiären Carbokationen **14a** und **16a** entstehen (**Abbildung 35**). Ob der nucleophile Angriff zur Bildung von **97** oberhalb bzw. unterhalb der Molekülebene erfolgt, wird durch die AS-Seitenketten in der aktiven Tasche und der konformativen Faltung des Substrates bestimmt.^[39] Da jedoch der Mechanismus der BcBOT2-Biosynthese nicht vollständig geklärt ist, sind keine Aussagen zur Konfiguration des stereogenen Zentrums im (*E*)-Nerolidol (**97**) möglich. Da der prozentuale Flächenanteil des hydroxylierten Produktes **97** im Vergleich zum Produkt PSP (**29**) sehr gering ist, scheint die STC BcBOT2 ebenso wie weitere Terpensynthasen über eine präzise Steuerung der in der aktiven Tasche gebundenen Wassermoleküle¹¹ zu verfügen, um so einen vorzeitigen Zyklisierungsabbruch nahezu vollständig zu unterbinden.^[144]

Das detektierte Germacren A (**62**) wird biosynthetisch über eine 10,1-Zyklisierung des Farnesylkations (**14**) und einer sich anschließenden Deprotonierung der Isopropylgruppe erzeugt.^[104] Zudem wurde die Verbindung durch die Verwendung unnatürlicher Substrate als neutrales Intermediat in der Zyklisierungskaskade von TEAS, PR-AS und Gdols identifiziert.^[97,100] Im Falle der STC BcBOT2 ist das Germacren A (**62**) weder ein neutrales Intermediat der Reaktionskaskade noch ein Reaktionsprodukt der stattfindenden 11,1-Zyklisierung. Stattdessen scheint die STC BcBOT2 über eine katalytische Promiskuität zu verfügen, sodass ein weiterer Reaktionspfad in Form einer 10,1-Zyklisierung ermöglicht wird (**Schema 9**, Weg h). Da auch das Germacren A (**62**) nur in einem geringen prozentualen Anteil im Produktspektrum enthalten ist, ist die Stabilisierung der 11,1-carbokationischen Zyklisierungskaskade durch die Kontur der aktiven Tasche allerdings stark begünstigt.

Anhand der Nebenkomponenten konnten weitere Anhaltspunkte zum möglichen Biosyntheseweg der BcBOT2 erhalten werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die STC neben einer Produktpromiskuität auch über eine katalytische Promiskuität verfügt. Die promiskuen Eigenschaften sind jedoch nur gering ausgeprägt, sodass die STC BcBOT2 weiterhin als ein hoch spezifisches Enzym angesehen werden kann. Dennoch bieten die promiskuen Aktivitäten einen guten Ansatzpunkt für Mutagenesestudien, um dem Enzym neue katalytische Funktionen zu verleihen und das Produktspektrum zu erweitern.

Anhand der Nebenkomponenten konnten weitere Anhaltspunkte zum möglichen Biosyntheseweg der BcBOT2 erhalten werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die STC neben einer Produktpromiskuität auch über eine katalytische Promiskuität verfügt. Die promiskuen Eigenschaften sind jedoch nur gering ausgeprägt, sodass die STC BcBOT2 weiterhin als ein hoch spezifisches Enzym angesehen werden kann. Dennoch bieten die promiskuen Aktivitäten einen guten Ansatzpunkt für Mutagenesestudien, um dem Enzym neue katalytische Funktionen zu verleihen und das Produktspektrum zu erweitern.

¹¹ Für BcBOT2 wurde bisher keine Kristallstruktur beschrieben, sodass lediglich die Annahme von gebundenen Wassermolekülen in der aktiven Tasche besteht.

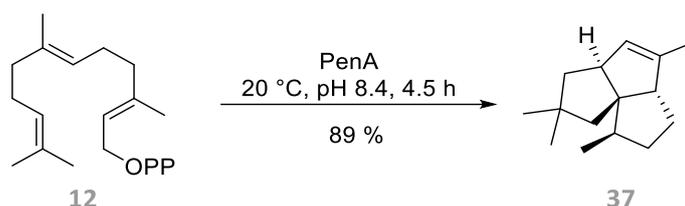


Schema 9: Postulierte Mechanismen zur Bildung der Nebenprodukte **24** und **97-101a/b** ausgehend von den postulierten Biosynthesewegen (HANSON; Weg a, CANE; Weg b, TANTILLO; Weg c, grau, Kap. 1.3.3) zur Bildung von PSP (**29**, umrandet) durch BcBOT2. Die postulierten Reaktionswege der Nebenprodukte sind farblich markiert (Wege d-h): **Weg d:** Bildung von Presilphiperfol-7-en (**98**), **Weg e:** Bildung von β Caryophyllen (**24**) sowie der nachfolgenden Autoxidation zu Caryophyllenoxid (**100a/b**), **Weg f:** Bildung von (*E*)-Nerolidol (**97**) nach erneuter Abspaltung des Diphosphats und Addition von Wasser zur vorzeitigen Beendigung der Reaktionskaskade, **Weg g:** Bildung von (*E*)- β -Farnesen (**99**) durch Deprotonierung, **Weg h:** 10-1-Zyklisierung zur Bildung des Germacradienylkations (**17**) und anschließender endständiger Deprotonierung zum Germacren A (**62**).

3.6 Semi-präparative Biotransformation von PenA mit FPP (**12**)

Zur Bestätigung des Biotransformationsproduktes Pentalenen (**37**) aus der Umsetzung der STC PenA mit FPP (**12**) wurde ein semi-präparativer Ansatz mit einer kontinuierlichen Substratzugabe durchgeführt. Entsprechend dem Stabilitätstest unter Kap. 3.4.5 wurde die Transformation bei einem pH-Wert von pH 8.4 durchgeführt, um eine stabile Enzymaktivität über die gesamte Inkubationsdauer zu gewährleisten. Durch die Entfernung des Lösemittels im Stickstoffstrom

konnte einer Verflüchtigung des Produkts, aufgrund der endothermen Verdampfungsenthalpie, entgegengewirkt werden. Das Rohprodukt wurde als hellgelbe Flüssigkeit in 89 % Ausbeute erhalten (**Schema 10**).



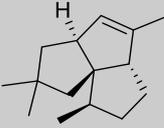
Schema 10: Semi-präparative Biotransformation von FPP (**12**) mit PenA zu dem literaturbekannten Produkt Pentalenen (**37**) in 89 % Ausbeute.

3.6.1 Strukturaufklärung und analytische Charakterisierung

Für die analytische Charakterisierung des Hauptproduktes **37** erfolgte eine GC-MS Analyse (**Tabelle 7**). Hierbei konnte für die Verbindung ein prozentualer Flächenanteil von 87.3 % für das Rohprodukt ermittelt werden. Größere Produktanteile auf den unpolaren Säulen können auf Produktüberlagerungen und abweichende Detektorsensitivitäten zurückgeführt werden. Die weiteren Flächenprozente verteilen sich auf Nebenprodukte sowie Verunreinigungen durch das eingesetzte Substrat und Lösemittel. Der Retentionsindex 1366 (RI_{DB5}) der Verbindung stimmt mit dem des analytischen Enzymtests überein, sodass thermische Zersetzungen oder Umlagerungen ausgeschlossen werden können. Die Messung einer hochaufgelösten Masse zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit der des Pentalenen (**37**). Eine olfaktorische Untersuchung konnte kein sensorisches Profil für das Produkt feststellen.

Anhand von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten erfolgte eine Strukturaufklärung des Hauptproduktes **37**. Das Grundgerüst der Verbindung wurde anhand von Kreuzkopplungen im COSY Spektrum und heteronuklearen Kopplungen im HMBC Spektrum bestimmt. Durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen in den 1H - und ^{13}C -NMR Spektren mit der Literatur konnte Pentalenen (**37**) als Produkt bestätigt werden.^[75] Da das Produkt bereits hinreichend stereochemisch untersucht wurde und eine Übereinstimmung der NMR-Daten vorliegt ist, erfolgte keine gesonderte Bestimmung der relativen Stereochemie.^[68–70]

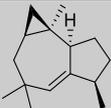
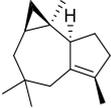
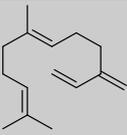
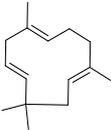
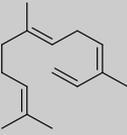
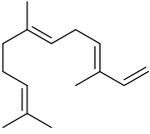
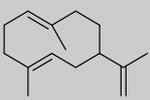
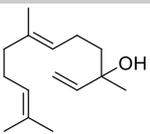
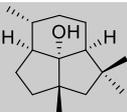
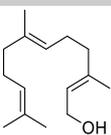
Tabelle 7: Retentionsindices RI und prozentuale Flächenprozent A[%] des Produktes Pentalenen (**37**) bei Nutzung chromatographischer Säulen unterschiedlicher Polarität (DB1, DB5, FFAP). Neben dem Mol- und Basispeak (MP, BP) sind charakteristische Fragmentierungen (m/z) nach sinkender Intensität aufgelistet. Weiterhin sind die berechnete und gefundene hochaufgelöste Masse (HR-GCMS) und die Ergebnisse der GC-Olfaktometrie (GCO) des Produktes dargestellt.

Produkt	RI_{DB1}	A [%]	RI_{DB5}	A [%]	RI_{FFAP}	A [%]
 (37)	1351	89.7	1366	90.0	1476	87.3
	MP	BP	m/z-Fragmentierungsmuster			
	204	105	91, 147, 106, 119, 189, 161, 133, 77, 175			
	HR-GCMS			GC-O		
	berechnet:	204.1878 [M] ⁺		kein sensorisches Profil		
gefunden:	204.1881 [M] ⁺					

3.6.2 Qualitative Bestimmung von Nebenkomponenten durch GCMS-Analyse

Durch die Vermessung des Rohproduktes mittels GC-MS und zweier chromatographischer Säulen unterschiedlicher Polarität wurden auch für die STC PenA Nebenprodukte über Datenbanken identifiziert, die durch einen Vergleich mit Negativkontrollen eindeutig der Biotransformation zugeordnet konnten. Trotz der geringen prozentualen Flächenanteile wurde für alle in der **Tabelle 8** angegebenen Verbindungen ein aussagekräftiges Massenspektrum erzeugt.

Tabelle 8: Identifizierte Nebenprodukte der Biotransformation PenA mit FPP (12). Die Identifikation erfolgte durch einen Vergleich der RI zweier Säulen und MS-Spektren mit Datenbanken. Neben der Bezeichnung und der Strukturformel der Verbindungen sind die Retentionsindices (RI) prozentualen Flächenprozent (A[%]) für die DB-1 und FFAP-Säule angegeben.

Verbindung	Strukturformel	RI _{FFAP}	A[%] _{FFAP}	RI _{DB1}	A[%] _{DB1}
African-1-en (102)		1485	0.3	1359	0.3
African-2-en (103)		1539	0.2	1391	0.3
(E)-β-Farnesen (99)		1715	0.6	1450	0.7
α-Humulen (95)		1691	0.1	1457	0.2
(Z,E)-α-Farnesen (104)		1725	0.2	1484	0.2
(E,E)-α-Farnesen (105)		1750	0.3	1490	0.2
Germacren A (62)		1755	0.4	1497	0.4
(E)-Nerolidol (97)		2042	1.5	1551	0.8
Presilphiperfolan-8β-ol (29)		2084	0.4	1585	0.3
(E,E)-Farnesol (96)		2365	5.3	1703	2.3

Hierbei wurden allerdings nur diejenigen Verbindungen als Nebenprodukte akzeptiert, die auf beiden Säulen eindeutig identifiziert wurden. Insgesamt zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der Nebenprodukte nur sehr gering ist, was auf die hohe Spezifität der STC PenA zurückgeführt werden kann. Dennoch kann dem Enzym anhand der identifizierten Nebenprodukte eine gering ausgeprägte Produktpromiskuität zugesprochen werden.

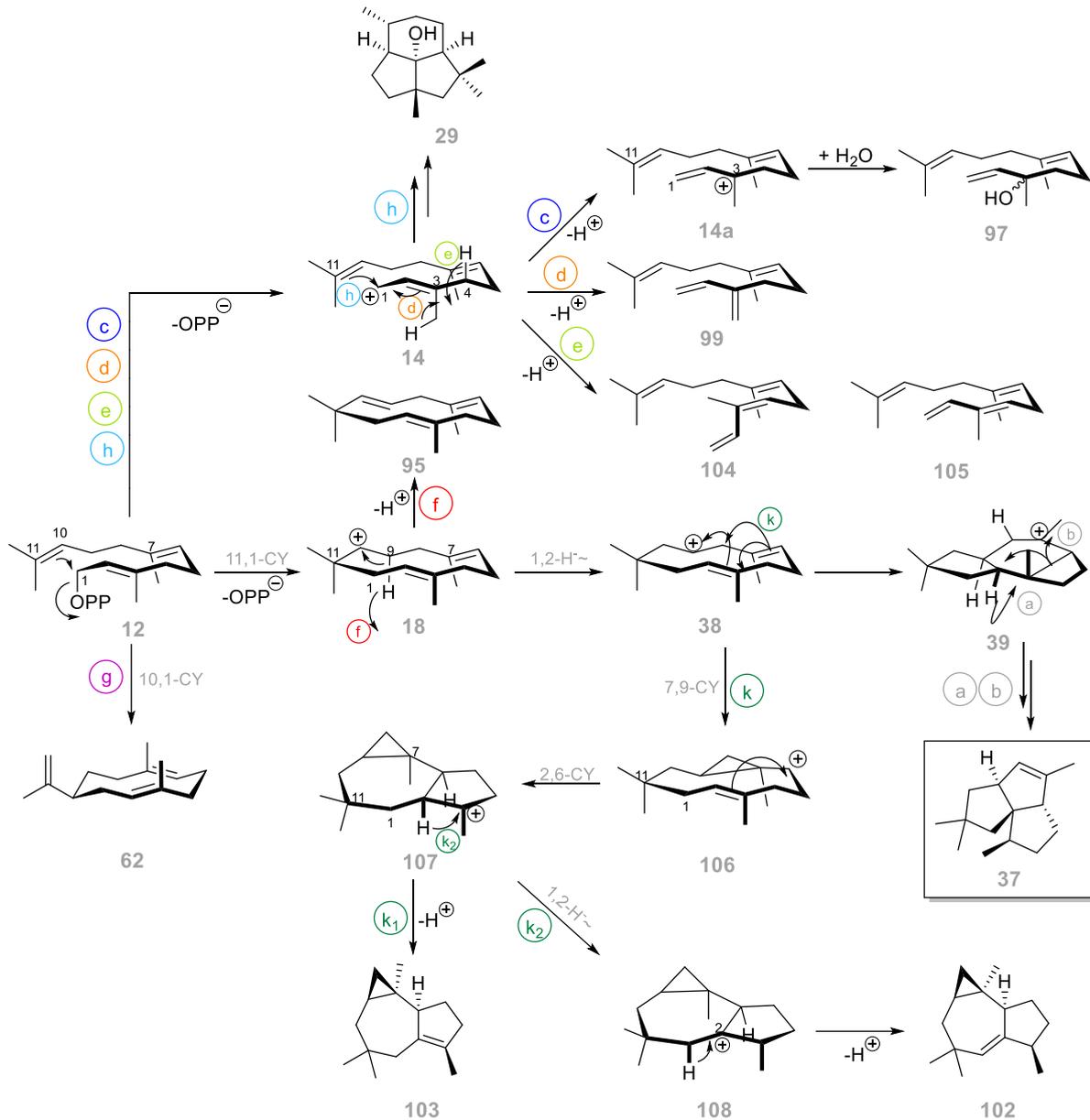
Neben den identifizierten Nebenprodukten der Biotransformation konnte erneut (*E,E*)-Farnesol (**96**) als Hydrolyseprodukt identifiziert werden. Zudem wurden analog zur Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**) die Produkte (*E*)- β -Farnesen (**99**) und (*E*)-Nerolidol (**97**) nachgewiesen (**Schema 11**, Weg c, d). Die Bildung der Produkte **97** und **99** könnte nach Abspaltung des Diphosphats durch eine initiale Deprotonierung des Farnesylkations (**14**) erzielt werden. Entsprechendes gilt für die unterschiedlich konfigurierten α -Farnesene **104** und **105**, die durch Deprotonierung des Farnesylkations (**14**) an der Position 4 entstehen könnten (Weg e). Die Konfiguration der entstehenden Doppelbindung ist durch die vorherige freie Drehbarkeit der C3-C4 Einfachbindung im Farnesylkation (**14**) bedingt. Das α -Humulen (**95**) könnte durch eine Deprotonierung des intermediären Humulylkations (**18**) gebildet werden (Weg f). Ebenso wie bei der STC BcBOT2 konnte Germacren A (**62**) als Nebenprodukt bestätigt werden (Weg g), sodass auch die STC PenA neben einer 11,1-Zyklisierung mit geringer katalytischer Promiskuität über eine 10,1-Zyklisierung verfügt.

Interessanterweise kann im Produktspektrum der STC PenA das Hauptprodukt PSP (**29**) der STC BcBOT2 nachgewiesen werden (**Schema 11**, Weg h). Obwohl die STCs unterschiedlicher Herkunft sind und lediglich eine Sequenzidentität von 27 %¹² aufweisen, scheinen sie dennoch in der Lage zu sein, einen identischen Reaktionspfad zu katalysieren. Dies kann als ein erster Hinweis auf eine miteinander verwandte katalytische und mechanistische Fähigkeit gedeutet werden, die auch dadurch unterstützt wird, dass beide STCs identische Nebenprodukte produzieren und zu Beginn der Reaktionskaskade eine 11,1-Zyklisierung katalysieren.

Die beiden trizyklischen Terpenoide African-1-en (**102**) und African-2-en (**103**) wurden neben Pentalenen (**37**) und Δ^6 -Protoilluden (**40**) bereits als Hauptprodukte in Kulturen von *Omphalotus olearius* identifiziert, sodass für die Africanene **102** und **103** ebenfalls eine Reaktionskaskade ausgehend von einer 11,1-Zyklisierung zum Humulylkation (**18**) angenommen wurde (**Schema 11**, Weg k).^[147] Ebenso wie bei der STC PenA wird durch einen 1,2-Hydridshift die Bildung des sehr hochkonjugierten sekundären Cyclopropylcarbinyl-Kation (**38**) als Zwischenprodukt postuliert. Während sich für die Bildung des Pentalenen (**37**) eine dyotrope Umlagerung zum Protoilludylkation (**39**) anschließt, werden bei der Bildung der Africanene **102** und **103** zwei Zyklisierungen zum Intermediat **107** vorgeschlagen. Ob die Zyklisierungen konzertiert ablaufen oder über das Intermediat **106**, ist nicht bekannt.^[147] Das African-2-en (**103**) kann durch Deprotonierung von **107** erhalten werden (Weg k₁). Für die Bildung des African-1-en (**102**) ist zunächst ein weiterer 1,2-Hydridshift zum tertiären Carbokation **108** wahrscheinlich, ehe auch hier eine Deprotonierung

¹² Zur Bestimmung der Sequenzidentität wurde das Programm BLAST verwendet.^[145,146]

zum gewünschten Produkt führt (Weg k_2). Da im Produktspektrum der STC PenA und in Kulturen von *O. olearius* identische Produkte identifiziert wurden, sollte der Stamm *O. olearius* im Genom über STCn verfügen, die eine mögliche katalytische und mechanistische Verwandtschaft zur STC PenA aufweisen. Durch die Identifikation von **102** und **103** als Nebenprodukte von PenA kann zudem der auf der STC PenA basierende Biosyntheseweg der Africanene unterstützt werden.



Schema 11: Postulierter Biosyntheseweg der PenA-Synthese über das zentrale Protoilludylkation (**39**) zum Pentalenen (**37**, umrandet). Die Bildung des Pentalenen aus **39** kann über die **Wege a** und **b** (grau) erfolgen und ist in Abschnitt 1.3.4 detailliert beschrieben. Die farbig hervorgehobenen postulierten Reaktionswege **c-k** beschreiben die Bildung der über GCMS identifizierte Nebenprodukte. **Weg c** (blau): Bildung des (*E*)-Nerolidol (**97**), **Weg d** (orange): Bildung von (*E*)- β -Farnesen (**99**), **Weg e** (grün): Bildung von (*E,Z*)- α -Farnesen (**104**) und (*E,E*)- α -Farnesen (**105**), **Weg f** (rot): Bildung von α -Humulen ausgehend vom Humulylkation **18**, **Weg g** (violett): 10,1-Zyklisierung zum Germacren A (**62**), **Weg h** (hellbau): Bildung des Presilphiperfolan-8 β -ol (**29**) ausgehend vom Farnesylkation (**14**). Der postulierte Biosyntheseweg des PSP (**29**) kann in Abschnitt 1.3.3 eingesehen werden, **Weg k** (dunkelgrün): postulierter Mechanismus für die Bildung von African-2-en (**103**, Weg k_1) und African-1-en (**102**, Weg k_2) ausgehend von **38**.

3.7 Analytische *in vitro* Enzymtests mit unnatürlichen Substraten

Als unnatürliche Farnesyldiphosphat-Derivate wurden insgesamt vier Substrate eingesetzt, die von SEIDEL und SCHRÖDER synthetisiert wurden.^[148] Das unnatürliche Substrat **78** weist im Gegensatz zum FPP (**12**) ein zusätzliches Sauerstoffatom im Grundgerüst auf, welches eine Isopreneinheit vom Diphosphat entfernt ist (**Abbildung 36**).^[108] Dadurch erfährt das Derivat **78** im Vergleich zum FPP eine Kettenverlängerung, wodurch Konformationsänderungen bei der Substratfaltung in der aktiven Tasche induziert werden könnten. Zudem bieten die freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms weitere Wechselwirkungsoptionen mit den AS-Seitenketten im aktiven Zentrum. Bei Akzeptanz des heteroatommodifizierten Substrats **78** durch die rekombinanten STCn BcBOT2 und PenA würden etherfunktionalisierte Terpenoide gebildet. Neben einigen Terpenkohlenwasserstoffen weisen insbesondere oxyfunktionalisierte Mono- und Sesquiterpene häufig olfaktorische Eigenschaften auf, die eine breite Anwendung in der Duftstoff- und Aromenindustrie haben.^[149,150]

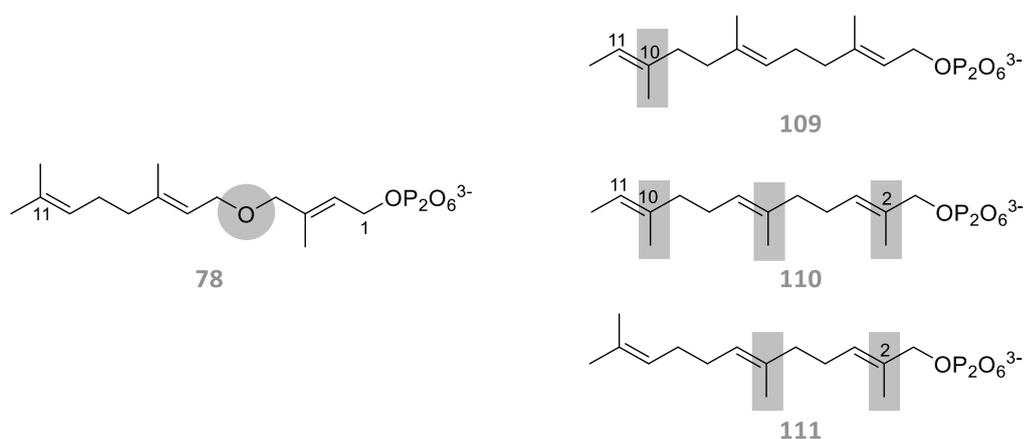


Abbildung 36: Unnatürliche Farnesyldiphosphat-Derivate **78** sowie **109** – **111**. Die Modifizierungen sind grau hinterlegt. Während es sich bei **78** um ein heteroatomfunktionalisiertes Substrat handelt, weisen die Derivate **109** – **111** ein von der Isopren-Regel abweichendes Grundgerüst auf.

Die unnatürlichen Substrate **109** – **111** weisen eine oder mehrere Methylgruppen auf, die um eine Position zum Diphosphatrest verschoben sind (**Abbildung 36**).^[151] Während das unnatürliche Substrat **109**, im Vergleich zum FPP (**12**), ein unterschiedliches Substitutionsmuster am terminalen Alkenanteil aufweist, wurde beim Derivat **111** die endständige Methylgruppe nicht verschoben, stattdessen aber die beiden Methylgruppen nahe des Diphosphatrests. Bei dem unnatürlichen Substrat **110** sind hingegen alle Methylgruppen um eine Position zum Diphosphat-Terminus verschoben. Vor allem die Substrate **110** und **111**, bei denen eine der Methylgruppen sich nun an Position 2 befindet, könnten zu einer sterischen Hinderung bei der initialen Isomerisierung und Zyklisierung beitragen. Durch die Identifikation von 2-Me-GPP (*2me-11*) als natürliches Substrat der 2-Methylisoborneol Synthase kann allerdings die sterische Hinderung durch eine Methylgruppe an Position 2 als vernachlässigbar angesehen werden.^[152] Weiterhin sollte das veränderte Substitutionsmuster am terminalen Alken zu einer Bevorzugung der 11,1-Zyklisierung führen, da im Gegensatz zum sekundären Humulylkation (**18**) ein stabileres tertiäres Carbokation ausgebildet wird. Zudem wird durch die fehlende Methylgruppe an Position 11 die sterische Hinderung

abgebaut. Bei einer 10,1-Zyklisierung tritt hingegen der gegenteilige Effekt auf. Statt des stabileren Germacradienylkations (**17**) wird ein sekundäres Carbokation gebildet. Ferner ist die Position 10 durch die zusätzliche Methylgruppe stärker sterisch gehindert. Werden die unnatürlichen Substrate **109** – **111** durch die STC BcBOT2 akzeptiert, so werden Sesquiterpenoide gebildet, die ein von der Isopren-Regel abweichendes Methylierungsmuster im Grundgerüst aufweisen sollten.

Die analytischen *in vitro* Enzymtests mit den unnatürlichen Substraten **78** und **109** – **111** wurden entsprechend der Aktivitätsbestimmungen der verwendeten STCn in einem 500 μ L Maßstab durchgeführt. Nach Zugabe von Enzym und Substrat sowie Aktivierung durch den Cofaktor wurden die Enzymtests unter definierten Reaktionsbedingungen inkubiert und die Produkte anschließend mittels *n*-Hexan extrahiert¹³. Zusätzlich wurden Negativkontrollen (NegK) durchgeführt, die neben dem Cofaktor entweder das Enzym oder das Substrat enthielten. Durch einen GC-MS Vergleich der Enzymtests mit den Negativkontrollen, können eingeschleppte Verunreinigungen sowie Hydrolyseprodukte der unnatürlichen Substrate eindeutig von biotransformierten Produkten unterschieden werden. Die biotransformierten Produkte wurden anschließend anhand von RI und MS-Spektrum charakterisiert. Zudem wurden die Ausbeuten der entstehenden Produkte semi-quantitativ bestimmt. Neben den prozentualen Flächenanteilen ermöglichen semi-quantitativ ermittelte Ausbeuten eine Einschätzung zur Auswahl von Biotransformationsprodukten, die in ausreichender Menge für eine Strukturaufklärung isoliert werden könnten. In den nachfolgenden Ergebnissen der analytischen *in vitro* Enzymtests werden nur jene Produkte näher betrachtet, die für eine Isolierung und anschließende Strukturaufklärung in Frage kommen. Weitere Nebenprodukte der Biotransformationen wurden bereits eingehend durch Coinjektionsexperimente von OBERHAUSER evaluiert und werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter vertieft.^[112]

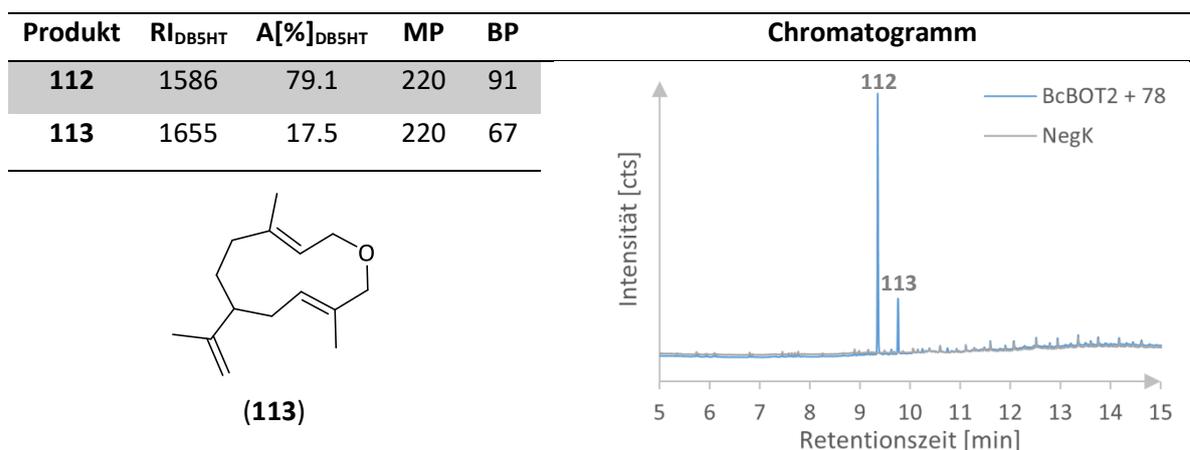
3.7.1 Analytische *in vitro* Enzymtests mit der STC BcBOT2

Für die Biotransformation des unnatürlichen Substrats **78** mit der STC BcBOT2 konnten zwei Produkte (**112**, **113**) detektiert werden, die in ausreichenden Mengen für eine Isolierung und Strukturaufklärung gebildet wurden (**Tabelle 9**). So weist das Hauptprodukt **112** einen prozentualen Flächenanteil von 79.1 % auf, während **113** mit einem Anteil von 17.5 % gebildet wird. Die restlichen 3.4 % verteilen sich auf weitere Nebenprodukte. Hinsichtlich der semi-quantitativen Bestimmung ergibt sich für **112** eine Ausbeute von 9.7 ± 0.8 %. Das Nebenprodukt **113** kann mit einer Ausbeute von 2.1 ± 0.2 % erhalten werden. Innerhalb des für jede Verbindung charakteristischen Fragmentierungsmusters ist der Fragmentenpeak mit der höchsten Intensität als Basispeak (BP) definiert und beschreibt das stabilste Fragment-Ion der Verbindungen. Im Fall des Nebenproduktes **113** könnte der Basispeak auf ein *iso*-Pentadienylkation ($C_5H_7^+$) zurückgeführt werden. Der Molpeak (MP) kann hingegen mit der Molmasse der Verbindungen gleichgesetzt werden, weshalb es sich bei den Verbindungen **112** und **113** um etherfunktionalisierte Terpenoide handelt, die keine weiteren

¹³ Die verwendeten Reaktionsbedingungen und Konzentrationen an Substrat, Cofaktor und Enzym (BcBOT2, PenA) sind in Abschnitt 10.5.3 hinterlegt.

oxidierten Funktionalitäten aufweisen. Durch Coinjektionsexperimente von OBERHAUSER konnte das Nebenprodukt **113** als *oxa*-Makrozyklus identifiziert werden, welches ebenfalls von weiteren STCs produziert wird.^[112] Eine direkte Isolierung des Nebenproduktes **113** aus der Umsetzung mit BcBOT2 zur Bestätigung der Coinjektion erfolgte bisher noch nicht. Diese scheint jedoch angebracht, da die Coinjektionen von OBERHAUSER nicht durch eine zweite chromatographische Trennung mit abweichender Polarität verifiziert worden sind.

Tabelle 9: Produkte **112** und **113** der Biotransformation von BcBOT2 mit dem heteroatommodifizierten Substrat **78**. Neben dem RI_{DB5HT} sind die prozentualen Flächenprozent sowie der Mol- und Basispeak (MP, BP) angegeben. Das charakteristische Fragmentierungsmuster der Verbindungen kann dem Anhang entnommen werden. Das Chromatogramm veranschaulicht die Detektion der Verbindungen **112** und **113** bei Vergleich mit einer Negativkontrolle ohne Zusatz des Enzyms BcBOT2.



Die Biotransformation der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **109**, bei dem eine der endständigen Methylgruppen verschoben ist, führte zur Bildung des Hauptproduktes **114** mit einem prozentualen Anteil von 97.6 % (**Tabelle 10**). Die restlichen 2.4 % verteilen sich auf die zwei weiteren Nebenprodukte **115** und **116**, deren Isolierung jedoch aufgrund der geringen Flächenanteile verwehrt bleibt. Für das Hauptprodukt **114** konnte semi-quantitativ eine Ausbeute von 5.9 ± 0.5 % ermittelt werden, sodass eine Isolierung der Verbindung aus einer semi-präparativen Umsetzung ausreichend Produkt für eine Strukturaufklärung liefern würde. Eine Quantifizierung der Nebenprodukte entfällt, da diese unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Da bei dem unnatürlichen Substrat **109** lediglich eine der Methylgruppen verschoben ist, weist das Derivat **109** eine identische Masse wie FPP (**12**) auf, weshalb für die Produkte ebenfalls Molpeaks von m/z 204 bzw. m/z 222 erwartet werden. Dies kann durch eine Betrachtung der Massenspektren bestätigt werden. Während das Hauptprodukt **114** und das Nebenprodukt **115** einen Molpeak von m/z 204 aufweisen und es sich demzufolge um Terpenkohlenwasserstoffe ohne Heteroatomfunktionalität handelt, beträgt der Molpeak des zweiten Nebenproduktes (**116**) m/z 222. Letzteres weist somit eine Hydroxygruppe im Kohlenstoffgrundgerüst auf. Dies kann zum einen durch einen Fragmentverlust von m/z 18 bestätigt werden und zum anderen durch den RI, der auf eine höhere Polarität der Verbindung hinweist. Der Basispeak des Hauptproduktes **114** weist weiterhin auf einen Fragmentverlust von m/z 97 hin, was durch eine Abspaltung eines Cycloheptanylkations ($C_7H_{13}^+$) hervorgerufen werden könnte.

Tabelle 10: Hauptprodukt **114** und zwei weitere Nebenprodukte (**115**, **116**) der Biotransformation von BcBOT2 mit dem methylverschobenen Derivat **109**. Neben den RI_{DB5} und den prozentualen Flächenprozenten A [%] sind der Mol- und Basispeak der jeweiligen Verbindungen aufgeführt. Im Chromatogramm ist zudem eine Überlagerung der Biotransformation mit einer Negativkontrolle ohne Enzym ersichtlich. Zudem ist der Hauptpeak gekennzeichnet. Aufgrund der geringen prozentualen Flächenanteile sowie einer nicht möglichen Isolierung wurde auf eine Kennzeichnung der Nebenprodukte (**115**: $t_R = 9.848$ min, **116**: $t_R = 10.709$ min) verzichtet.

Produkt	RI_{DB5}	A [%] _{DB5}	MP	BP	Chromatogramm
114	1518	97.6	204	107	
115	1543	1.1	204	107	
116	1689	1.3	222	110	

Bei dem unnatürlichen Substrat **110** wurden im Vergleich zum FPP (**12**) drei Methylgruppen um eine Position zum Diphosphatrest verschoben. Da die Molmasse von **110** jedoch weiterhin mit der des natürlichen FPP (**12**) übereinstimmt, werden auch in diesem Fall Produkte mit einem Molpeak von m/z 204 oder für hydroxylierte Produkte von m/z 222 erwartet. Durch einen Vergleich mit den Negativkontrollen konnten im Gegensatz zu den Beobachtungen von OBERHAUSER^[112] nur vier Biotransformationsprodukte eindeutig identifiziert werden, von denen **119** und **120** als Hauptprodukte der Transformation angesehen werden können (**Tabelle 11**). Das Produkt **120** ist mit einem Flächenanteil von 76.9 % im Produktspektrum vertreten, während 19.3 % auf die Verbindung **119** entfallen. Die restlichen 3.8 % verteilen sich auf die beiden Nebenprodukte **117** und **118**. Durch eine semi-quantitative Bestimmung konnten für die Hauptprodukte Ausbeuten von 3.3 ± 0.1 % für **119** und 7.2 ± 0.3 % für **120** ermittelt werden. Anhand des Chromatogramms und der RI wird jedoch ersichtlich, dass die Produkte **119** und **120** nicht vollständig bis zur Basislinie voneinander getrennt wurden. Durch einen Polaritätswechsel der stationären Phase konnte eine Verbesserung der Trennung (**119**: $RI_{WAX} = 1690$, **120**: $RI_{WAX} = 1701$) erzielt werden, sodass eine Isolierung der Verbindungen nach einer semi-präparativen Umsetzung durch eine pGC gewährleistet wäre. Die Hauptprodukte weisen wie die Nebenprodukte einen Molpeak von m/z 204 auf, sodass es sich um Terpenkohlenwasserstoffe handelt. Zusätzlich zu den Biotransformationsprodukten wurde ein Hydrolyseprodukt **121** mit einem RI_{DB5} von 1723 identifiziert. Anhand des Molpeaks (m/z 222) kann für diese Verbindung ein hydroxyliertes Produkt angenommen werden. Folglich sollte es sich bei der Verbindung **121** um das methylverschobene Pendant des (*E,E*)-Farnesol (**96**) handeln. Dies kann neben einer identischen Molmasse auch durch einen übereinstimmenden Basispeak von m/z 69 belegt werden. Die Detektion eines Hydrolyseprodukts bestätigt erneut die Instabilität der allylischen Diphosphate.^[131,135]

Tabelle 11: Hauptprodukte **119** und **120** sowie zwei weitere detektierte Nebenprodukte (**117**, **118**) der Biotransformation von BcBOT2 mit dem methylverschobenen Substrat **110**. Neben den R_{DB5} und den prozentualen Flächenprozenten $A[\%]$ sind die charakteristischen Mol- und Basispeaks angegeben. Das Chromatogramm zeigt eine Überlagerung der Biotransformation mit einer durchgeführten Negativkontrolle. Der Elutionsbereich der Hauptkomponenten **119** und **120** ist zur Veranschaulichung vergrößert dargestellt. Aufgrund der geringen prozentualen Flächenanteile wurde auf eine Kennzeichnung der Nebenprodukte (**117**: $t_R = 8.490$ min, **118**: $t_R = 8.569$ min) und des Hydrolyseprodukts **121** ($t_R = 10.195$ min) verzichtet. Das vorgeschlagene Hydrolyseprodukt **121** ist als Strukturformel angegeben.

Produkt	R_{DB5}	$A[\%]_{DB5}$	MP	BP	Chromatogramm
117	1441	1.8	204	107	
118	1454	2.0	204	107	
119	1520	19.3	204	107	
120	1528	76.9	204	107	

CC(=C)CC(C)CC(=C)CC(C)CC(=C)CO

(121)

Bei der Überprüfung der Substratazeptanz des unnatürlichen Substrates **111** mit der STC BcBOT2 konnte auf einer DB5-Säule ebenfalls eine Umsetzung detektiert werden. Allerdings wurde ein sehr breites und schlecht aufgelöstes Signal erhalten, sodass die Untersuchung auf einer stationären Phase mit abweichender Polarität wiederholt wurde. Hierbei konnten zwei Produktpeaks (**122**, **123**) ermittelt werden, die nicht Bestandteil der Negativkontrolle sind. Zwischen den beiden Peaks kann eine deutliche Anhebung der Basislinie beobachtet werden. Eine solche Ausbildung ist ein eindeutiger Hinweis auf eine thermische COPE-Umlagerung während der chromatographischen Trennung.^[153a,154,153b] Demzufolge sollte es sich lediglich bei einem der beiden Verbindungen um das biotransformierte Produkt handeln, während die weitere Verbindung durch thermische Prozesse gebildet wurde. Die in der **Tabelle 12** angegebenen prozentualen Flächenprozentanteile sind daher ein Maß für den Grad der stattfindenden Umlagerung. Durch die Nutzung einer Heißaufgabe mit einer Injektortemperatur von 250 °C konnte das Verhältnis der prozentualen Peakflächen nahezu vollständig zugunsten der Verbindung **122** verschoben werden, sodass Grund zur Annahme besteht, dass es sich bei **122** um das thermisch erzeugte Umlagerungsprodukt handelt. Durch eine Addition der semi-quantitativ ermittelten Ausbeuten des thermischen und biotransformierten Produkts konnte für die Biotransformation eine Gesamtausbeute von 2.9 ± 0.2 % ermittelt werden. Sowohl das thermische auch das biotransformierte Produkt weisen einem Molpeak von m/z 204 auf, sodass es sich bei den Verbindungen um Terpenkohlenwasserstoffe handelt, die keine oxidierten Funktionalitäten aufweisen.

Tabelle 12: Thermisch erzeugtes Produkt **122** und biotransformiertes Produkt **123** der Biotransformation von BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **111**. Die GCMS Analyse erfolgte mit einer polaren FFAP-Säule als stationäre Phase. Neben den R_{FFAP} sind die prozentualen Flächenprozentage angegeben. Letztere sind allerdings nur ein Maß für die thermische Umlagerung. Zusätzlich sind die Mol- und Basispeaks des thermischen und biotransformierten Produkts angegeben. Im Chromatogramm ist die Anhebung der Basislinie zwischen den beiden Peaks deutlich erkennbar.

Produkt	R_{FFAP}	$A[\%]_{FFAP}$	MP	BP	Chromatogramm
122	1602	55.9	204	93	
123	1778	44.1	204	107	

Zusammenfassend kann der STC BcBOT2 aufgrund der Substratakzeptanz der unnatürlichen Derivate **78** und **109 – 111** eine Substratpromiskuität zugeschrieben werden. Da bei den unnatürlichen Substraten **78** und **110** zudem zwei Hauptprodukte identifiziert wurden, weist die STC BcBOT2 eine Produktpromiskuität auf, die mit FPP (**12**) in dem Ausmaß nicht beobachtet werden konnte. Folglich führen eine Kettenverlängerung oder eine Veränderung des Methylierungsmusters in allen drei Isopreneinheiten zu einer Konformationsänderung des Substrates, durch die unterschiedliche Reaktionspfade in der aktiven Tasche ermöglicht werden können. Mit den unnatürlichen Substraten **109** und **111** wird hingegen analog zum FPP (**12**) nur ein Hauptprodukt gebildet, sodass in diesem Fall weiterhin ein Reaktionspfad stark begünstigt ist. Coinjektionsexperimente von OBERHAUSER zeigten zudem, dass die Umsetzung der Substrate **109** und **111** mit der STC PenA zu identischen Hauptprodukten führt, wodurch die Annahme einer mechanistischen und katalytischen Verwandtschaft der STCn BcBOT2 und PenA weiter unterstützt wird.

3.7.2 Analytische *in vitro* Enzymtests mit der STC PenA

Analytische *in vitro* Enzymtests der STC PenA wurden mit dem unnatürlichen Substrat **78** durchgeführt. Durch eine chromatographische Trennung auf einer DB5_{HT}-Säule konnten insgesamt sechs Verbindungen identifiziert werden (**Tabelle 14**). Die Produkte **124**, **125** und **127** weisen dabei prozentuale Flächenprozentage zwischen 24.4 % und 32.3 % auf. Das Produkt **126** ist mit einem Anteil von 9.4 % in dem Produktspektrum enthalten, während sich die restlichen 6.4 % auf die Nebenprodukte **113** und **128** verteilen. Der Produktpeak **127** kann im chromatographischen Lauf nicht vollständig von einer aus der Negativkontrolle stammenden Verunreinigung abgetrennt werden, sodass die Peakfläche nicht einwandfrei ermittelt werden konnte. Die weiteren Verbindungen werden durch gaußförmige Signale abgebildet, sodass eine Coelution optisch ausgeschlossen werden kann. Auch das Fragmentierungsmuster der Verbindungen zeigt innerhalb des Retentionsbereiches der Peaks keine Abweichungen. Allerdings schafft nur eine weitere

chromatographische Trennung mit einer stationären Phase abweichender Polarität endgültige Gewissheit. Anhand einer semi-quantitativen Bestimmung mit (*E,E*)-Farnesol (**96**) als internen Standard wurden die Ausbeuten für die Produkte **124** – **127** ermittelt (**Tabelle 13**). Die Peakflächen der Nebenprodukte **113** und **128** liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze, sodass eine quantitative Analyse nicht durchgeführt wurde. Die Molpeaks der biotransformierten Produkte belaufen sich auf m/z 220, sodass ausschließlich etherfunktionalisierte Kohlenwasserstoffe gebildet wurden. Ein Vergleich mit dem Produktspektrum von BcBOT2 und dem unnatürlichen Substrat **78** zeigt für die Verbindungen **112** und **124** einen übereinstimmenden Retentionsindex auf der verwendeten DB5_{HT}-Säule. Allerdings unterscheiden sich die Massenspektren signifikant voneinander, sodass von verschiedenen Produkten ausgegangen werden kann. Das Produkt **113** wurde bereits durch Coinjektionen von OBERHAUSER auch im Produktspektrum der STC PenA nachgewiesen.^[112] Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit durch einen Abgleich von RI und MS-Spektren bestätigt werden. Eine Isolierung von **113** und **128** aus dem Biotransformationsansatz konnte jedoch aufgrund zu geringer Ausbeuten nicht erfolgen.

Tabelle 13: Semi-quantitativ ermittelte Ausbeuten für die Produkte **124** – **127** anhand von (*E,E*)-Farnesol (**96**) als internen Standard.

Produkt	Ausbeute [%]
124	4.6 ± 0.6
125	3.9 ± 0.5
126	1.2 ± 0.2
127	3.3 ± 0.4

Tabelle 14: Biotransformationsprodukte **124** – **128** und **113** aus der Umsetzung von PenA mit dem unnatürlichen Substrat **78**. Neben den Retentionsindices (RI) sind die prozentualen Flächenprozent sowie die Mol- und Basispeaks der Verbindungen angegeben. Im Chromatogramm wurde der Elutionsbereich der Verbindungen zur besseren Veranschaulichung vergrößert abgebildet.

Produkt	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}	MP	BP	Chromatogramm
124	1586	32.3	119	220	
125	1593	27.5	107	220	
126	1638	9.4	119	220	
127	1649	24.4	107	220	
113	1654	3.7	68	220	
128	1677	2.7	136	220	

Neben den biotransformierten Produkten wurden zudem weitere Verbindungen detektiert, die anhand der Negativkontrollen auf das eingesetzte Substrat zurückgeführt werden konnten und ebenfalls bei der Biotransformation von BcBOT2 und **78** beobachtet wurden (s. Kap. 3.9.3). Die Verbindungen eluieren vor den biotransformierten Produkten und weisen Retentionsindices zwischen 1300 und 1500 auf. Mit Molpeaks von m/z 154 und m/z 152 handelt es sich bei den Produkten um hydroxylierte und carbonylierte Monoterpene, die vermutlich durch eine Spaltung der allylischen Etherfunktionalität im unnatürlichen Substrats **78** entstehen. Weiterhin finden sich

auch Verbindungen mit einem Molpeak von m/z 136, sodass ebenfalls Monoterpene ohne Sauerstoff-Funktionalität vorliegen.

Ebenso wie für die STC BcBOT2 akzeptiert auch PenA das unnatürliche Substrat **78**, weshalb auch PenA über eine Substratpromiskuität verfügt. Zudem wird mit dem unnatürlichen Substrat **78** im Gegensatz zu der Umsetzung mit dem natürlichen Substrat FPP (**12**) ein Multiproduktspektrum erhalten. Dies deutet erneut daraufhin, dass durch die Kettenverlängerung des eingebauten Sauerstoffatoms die Faltung des Substrates in der aktiven Tasche beeinflusst wird. Dadurch können neue Interaktionen zwischen den AS-Seitenketten und dem Substrat ausgebildet werden, die weitere Reaktionspfade in der Biosynthese eröffnen und dem Enzym PenA zu einer Produktpromiskuität verhelfen.

3.8 Vorarbeiten für semi-präparative Umsetzungen mit unnatürlichen Substraten

Für die Biotransformationen mit den unnatürlichen Substraten **78** und **109 – 111** wurde zunächst der Einfluss von Substratzugabe und Aufarbeitung durch semi-präparative Umsetzungen der STC BcBOT2 mit dem Substrat **78** evaluiert. Zudem erfolgte eine Temperatur-Optimierung der STCn BcBOT2 und PenA mit den unnatürlichen Derivaten, um die Substratazeptanz und Produktausbeuten zu erhöhen. Insbesondere eine Steigerung der Produktausbeute ist von entscheidendem Interesse, um ausreichende Mengen für eine Strukturaufklärung zu erzielen.

3.8.1 Optimierung von Substratzugabe und Aufarbeitung

Für die semi-präparative Umsetzung mit den unnatürlichen Substraten wurde anhand des Derivats **78** der Einfluss einer diskontinuierlichen und einer kontinuierlichen Substratzugabe untersucht. Insbesondere bei einer diskontinuierlichen Zugabe können sich punktuelle Substratmaxima ausbilden, die zu einer unkompetitiven Hemmung führen könnten und infolgedessen zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms. Weiterhin wurde im Rahmen der Aufarbeitung neben einem Extraktionsvorgang auch die Adsorption der gebildeten Terpenoide an ein hydrophobes Amberlite®XAD-4 Adsorberharz betrachtet. Da es sich bei dem Adsorber um ein quervernetztes Copolymer aus Styren-Divinylbenzen handelt, beruhen die Interaktionen von Produkt und Adsorberharz auf nicht-kovalenten Van-der-Waals-Kräften und π - π -Wechselwirkungen. FRISTER konnte bereits zeigen, dass Sesquiterpenoide erfolgreich an Amberlite®XAD-4 adsorbiert wurden.^[155] Für den Extraktionsvorgang wurde der Ansatz nach Beendigung der Biotransformation mit *n*-Pentan überschichtet. Bereits in analytischen Enzymtests konnte gezeigt werden, dass ein Zweiphasensystem zu keiner Ausbeutesteigerung infolge einer Gleichgewichtverschiebung beiträgt. Stattdessen überwiegte eine Denaturierung der eingesetzten Enzyme (s. Kap. 3.4.2), sodass ein Einphasensystem beibehalten wurde. Dementsprechend wurde auch das Adsorberharz erst nach erfolgter Transformation zugesetzt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Zudem kann so eine Adsorption des wasserlöslichen Substrates **78** an den Adsorber vermieden werden.

Für die Bewertung wurden drei parallele Umsetzungen der STC BcBOT2 mit **78** durchgeführt und die Ausbeute an Rohprodukt sowie die prozentualen Flächenanteile der Produkte **112** und **113**

begutachtet. Die vollständige Extraktion bzw. Adsorption der Terpenoide **112** und **113** konnte durch eine Untersuchung der wässrigen Phase auf mögliche Rückstände bestätigt werden. Anhand der **Tabelle 15** zeigt sich, dass die Rohproduktausbeute bei der diskontinuierlichen (Ansatz 1) und der kontinuierlichen Zugabe (Ansatz 2) keine signifikante Abweichung aufweist. Auch bei den prozentualen Flächenanteilen konnten für die Produkten **112** und **113** annähernd identische Verhältnisse erzielt werden. Daher kann aufgrund vergleichbarer Ausbeuten und Produktzusammensetzung eine Substrathemmung durch eine diskontinuierliche Zugabe ausgeschlossen werden. Ursächlich ist eine ständige Homogenisierung der Ansätze, sodass bei einer diskontinuierlichen Zugabe nur kurzzeitige punktuelle Maxima ausgebildet werden. Da die Substrathemmung ein Sonderfall der unkompetitiven Hemmung ist, handelt es sich hierbei um eine reversible Inhibierung.^[4,125] Folglich wird die Enzymaktivität nur bei Fortbestehen der Substratmaxima negativ beeinflusst. Da die kontinuierliche Substratzugabe allerdings automatisiert durchgeführt werden konnte, wird diese für die semi-präparativen Umsetzungen eingesetzt. Der Vergleich von Extraktion und Adsorption als Aufarbeitungsmethoden zeigte, dass die Nutzung des Adsorberharzes mit etwa 50 % Ausbeuteeinbußen einhergeht. Da jedoch durch die Analyse der wässrigen Phase eine vollständige Adsorption der Terpenoide nachgewiesen wurde, kann der Produktverlust auf eine unzureichende Desorption zurückgeführt werden. Daher müsste für jedes Produkt der Desorptionsvorgang durch Ermittlung eines entsprechenden Eluenten angepasst werden. Dies gestaltet sich jedoch problematisch, da es sich um unbekannte Verbindungen handelt, deren Polaritäten nur anhand von RI und abgeleiteten funktionellen Gruppen aus dem Fragmentierungsmuster abgeschätzt werden können. Anhand der prozentualen Flächenprozentage wird zudem ersichtlich, dass das Produkt **113** gegenüber **112** bevorzugt desorbiert wird, sodass eine stärkere Affinität zwischen Adsorber und dem Produkt **112** vorliegt. Zusätzlich zeigt ein Vergleich der Chromatogramme, dass auch bei Nutzung des Adsorbers weiterhin Verunreinigungen im Rohprodukt enthalten sind. Insgesamt ist eine Aufarbeitung mittels des Adsorberharzes XAD-4® daher nicht zu empfehlen, sodass eine mehrstufige Extraktion mit *n*-Pentan beibehalten wird.

Tabelle 15: Rohproduktausbeute sowie prozentuale Flächenprozentage A[%] der Produkte **112** und **113** der Biotransformation von BcBOT2 mit **78**. Es wurden drei parallele Ansätze (1-3) durchgeführt, die sich in ihrer Substratzugabe (Ansatz 1 und 2) bzw. in ihrer Aufarbeitung (Ansatz 2 und 3) unterscheiden.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Zugabe	diskontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich
Aufarbeitung	Extraktion	Extraktion	Amberlite®XAD-4
Rohprodukt	31.2 %	30.9 %	15.9 %
112	A[%]: 85.4	A[%]: 84.3	A[%]: 81.0
113	A[%]: 14.6	A[%]: 15.7	A[%]: 19.0

3.8.2 Temperaturoptimierung der unnatürlichen Substrate

Neben der Substratzugabe und der Aufarbeitung wurde zudem anhand von analytischen *in vitro* Enzymtests der Einfluss der Temperatur auf die Substratazeptanz der unnatürlichen Substrate überprüft. Hierzu wurde eine semi-quantitative Bestimmung mittels eines internen Standards in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Insbesondere die Temperatur stellt einen wichtigen Parameter für die Akzeptanz der unnatürlichen Substrate dar. So wird mit steigender Temperatur zum einen die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung erhöht und zum anderen durch Veränderungen der Proteinkonformation die Flexibilität des Enzyms und folglich auch die der aktiven Tasche gesteigert.^[156] Durch eine Aufweitung der aktiven Tasche ist es möglich, dass auch größere Substrate, wie das heteroatommodifizierte Derivat **78** oder Substrate mit einem abweichenden Methylierungsmuster (**109 – 111**) leichter in die aktive Tasche diffundieren. Neben dem Enzym gewinnt auch das Substrat mit steigender Temperatur an Flexibilität, wodurch Konformationsänderungen bei der Faltung des Substrates erleichtert werden.^[80] Dadurch kann neben einer verbesserten Substratazeptanz auch das Produktspektrum beeinflusst werden. So konnte bereits für Cop4 aus *Coprinus cinereus* und für die *epi*-Aristolochensynthese eine Veränderung des Produktspektrums bei steigender Temperatur beobachtet werden.^[80,157] Bei der Wahl der Temperatur ist jedoch auf einen Kompromiss zwischen Enzymstabilität und struktureller Flexibilität zu achten, um eine angemessene Substratazeptanz und Enzymaktivität zu gewährleisten.^[158]

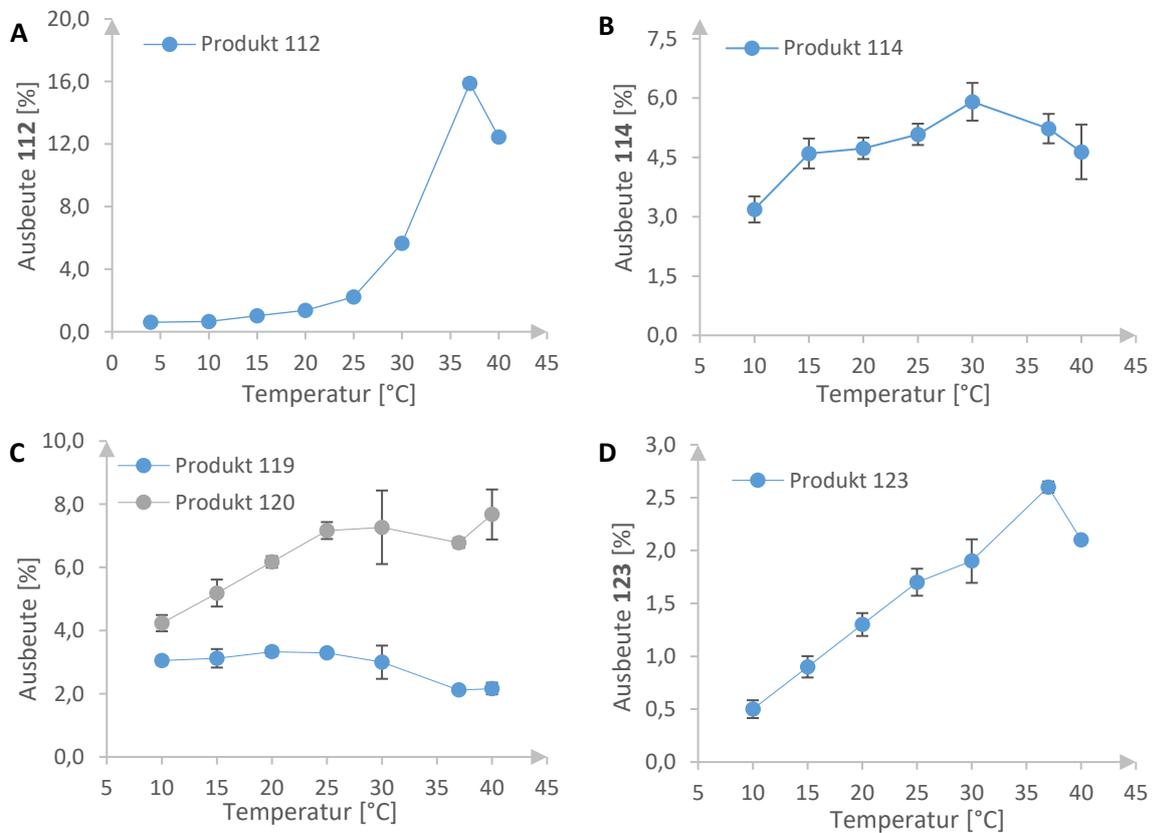


Abbildung 37: Temperaturoptimierung der STC BcBOT2 mit den unnatürlichen Substraten: A) **78**, B) **109**, C) **110** und D) **111**.

Für alle Hauptprodukte, die durch die Umsetzung der STC BcBOT2 mit den unnatürlichen Substraten **78** und **109 – 111** gebildet worden sind, kann im Vergleich zum natürlichen Substrat FPP (**12**) ein höheres Temperaturoptimum festgestellt werden (**Abbildung 37, A-D**). So zeigen insbesondere die Umsetzungen von **78 (A)** und **111 (D)** zu den Produkten **112** und **123** ein ausgeprägtes Maximum bei 37 °C. Hierbei kann für **123** bis zum Erreichen des Optimums ein nahezu linearer Anstieg entsprechend der VAN'T HOFF'schen RGT-Regel beobachtet werden. Bei dem Hauptprodukt **112** deutet sich hingegen ein exponentieller Anstieg an, sodass beim unnatürlichen Substrat **78** die Temperatur einen bedeutenden Einfluss auf die Substratakzeptanz nimmt, indem die Flexibilität von Enzym und Substrat erhöht wird. Sowohl bei **112** als auch bei **123** kann oberhalb von 37 °C ein Aktivitätsverlust beobachtet werden, der sich indirekt in dem Ausbeuteverlust widerspiegelt. Bei den unnatürlichen Substraten **109 (B)** und **110 (C)** kann ebenfalls ein Maximum identifiziert werden, welches sich für das Hauptprodukt **114** auf 30 °C beläuft und für die beiden Produkte **119** und **120** auf 25 – 30 °C. Folglich scheint für diese Substrate bereits eine geringere Flexibilität ausreichend zu sein, damit die Substrate von dem Enzym akzeptiert werden und die Faltung in der aktiven Tasche ermöglicht wird. Im Fall des unnatürlichen Substrats **110** weisen die Produkte **119** und **120** eine Veränderung des Produktverhältnisses in Abhängigkeit von der Temperatur auf. Eine Einflussnahme der Temperatur auf das Produktspektrum kann allerdings für keine der Biotransformationen beobachtet werden.

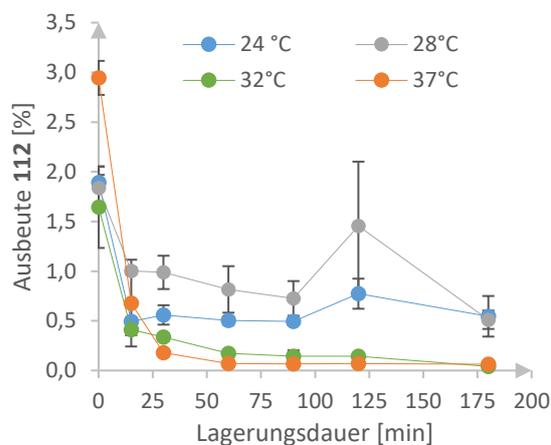


Abbildung 38: Stabilitätstest der STC BcBOT2 bei unterschiedlichen Temperaturen (24 – 37 °C) anhand der Biotransformation mit dem unnatürlichen Substrat **78**. Die Enzymstabilität wurde indirekt über die Ausbeute des Produktes **112** bestimmt.

Da für die Umsetzungen mit den unnatürlichen Substraten **78** und **111** ein deutlich erhöhtes Temperaturmaximum ermittelt werden konnte, wurde anhand des Derivats **78** die Stabilität der STC BcBOT2 bei unterschiedlichen Temperaturen überprüft (**Abbildung 38**). Hierbei konnte insbesondere bei dem Temperaturoptimum von 37 °C ein annähernd exponentieller Abfall der Enzymaktivität beobachtet werden. Folglich ermöglicht die erhöhte Temperatur zwar eine verbesserte Flexibilität, gleichzeitig nehmen jedoch auch zeitliche Denaturierungsprozesse zu, die zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust führen. Auch bei den weiteren

überprüften Temperaturen kann eine zeitabhängige Denaturierung beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen der Temperaturoptimierung (s. Kap. 3.4.3), wonach denaturierende Prozesse bereits oberhalb von 20 °C beginnen. Da insbesondere bei semi-präparativen Umsetzungen die Langzeitstabilität des Enzyms von entscheidender Bedeutung ist, sollten geringere Temperaturen für die Biotransformationen gewählt werden, sodass ein akzeptabler Kompromiss zwischen Enzymstabilität und Produktausbeute erzielt werden kann. Dies wird im Fall der Umsetzung von BcBOT2 mit dem Derivat **78** bei 28 °C erreicht. Bei dieser Temperatur überwiegen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratakzeptanz gegenüber den

zeitabhängigen Denaturierungsprozessen, sodass die höchsten Ausbeuten an **112** erzielt werden können.

Für die Biotransformation der STC PenA mit dem unnatürlichen Substrat **78** wurde ebenfalls eine Temperaturoptimierung durchgeführt (**Abbildung 39**). Hierbei konnte für alle vier Hauptprodukte **124 – 127** ein Maximum bei 30 °C ermittelt werden. Dementsprechend kann auch für die STC PenA eine Verschiebung des Optimums zu höherer Temperatur mit dem unnatürlichen Substrat **78** beobachtet werden. Oberhalb von 30 °C überwiegt die Denaturierung der STC, die sich im dem Ausbeuteverlust widerspiegelt. Ebenso wie bei der STC BcBOT2 kann auch für PenA keine Veränderung des Produktspektrums beobachtet werden. Auch die Verhältnisse der Hauptprodukte bleiben über den untersuchten Temperaturbereich konstant.

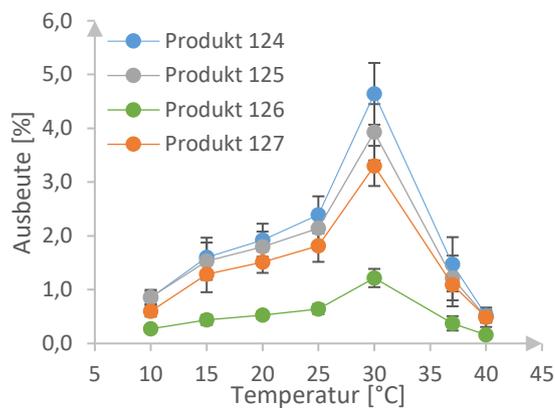
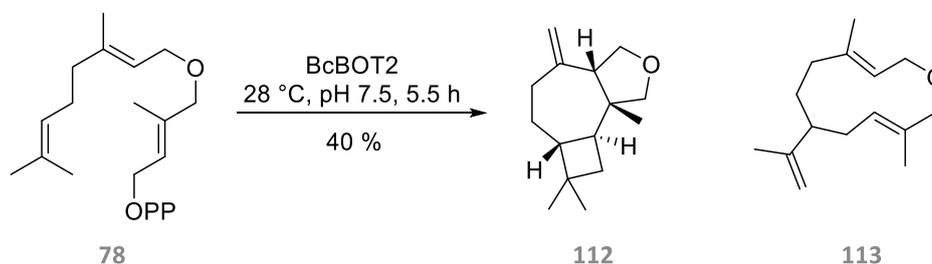


Abbildung 39: Temperaturoptimierung der Biotransformation von PenA mit dem unnatürlichen Derivat **78** anhand der vier Hauptprodukte **124 – 127**.

3.9 Semi-präparativer Ansatz der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **78**

Für die Isolierung und Strukturaufklärung der Verbindungen **112** und **113** wurde ein semi-präparativer Ansatz mit dem unnatürlichen Substrat **78** und der STC BcBOT2 in Form eines Fed-Batch durchgeführt. Als Rohprodukt konnte eine gelbliche Flüssigkeit in 40 % Ausbeute erhalten werden (**Schema 12**). Das sensorische Profil des Rohproduktes konnte als grün, frisch, würzig und geranienartig beschrieben werden.



Schema 12: Semi-präparative Biotransformation des unnatürlichen Derivats **78** mit BcBOT2 zu den Produkten **112** und **113**.

3.9.1 Analytische Charakterisierung und Strukturaufklärung

Die analytische Charakterisierung der Produkte **112** und **113** erfolgte mittels der GC-MS Analysemethode (**Tabelle 16**). So konnten neben den Retentionsindices auch die Reinheiten der Verbindungen über die Flächenprozentage bestimmt werden. Das Hauptprodukt **112** ist demnach mit einem prozentualen Anteil von 65.3 % in dem Rohprodukt enthalten, während für das Produkt **113** ein Anteil von 7.8 % ermittelt werden konnte. Abweichungen hinsichtlich der Flächenprozentage bei Nutzung verschiedener chromatographischer Systeme sind durch Überlagerungen von Verbindungen und Sensitivitätsunterschiede bei den Detektoren bedingt. Die weiteren prozentualen Flächenanteile verteilen sich auf Produkte, die nachweislich aus dem Substrat **78** stammen (s. Kap. 3.9.3), sowie auf mitextrahierte Verunreinigungen und Weichmacher. Auch die gefundenen hochaufgelösten Massen stimmen sehr gut mit den berechneten überein. Im Massenspektrum des Hauptproduktes **112** können zudem charakteristische Fragmentierungsverluste vom m/z 15 und m/z 14 beobachtet werden, die von aliphatischen Methyl- und Methylengruppen stammen. Zudem kann ein Verlust von m/z 31 identifiziert werden, der auf das Vorhandensein eines Sauerstoffatoms hindeutet, das in Form eines $[\text{CH}_3\text{O}]^+$ - oder eines $[\text{CH}_2\text{OH}]^+$ -Ions fragmentiert wird. Mittels einer GC-Olfaktometrie wurde dem Hauptprodukt **112** ein pfeffriger, etherischer und campherartiger Geruch zugeordnet. Die Geruchsintensität kann als moderat klassifiziert werden. Die pfeffrige Note ähnelt dabei der des Sesquiterpenoids Rotundon (**129**), dessen Kohlenstoffgrundgerüst ebenso wie das trizyklische Hauptprodukt **112** über ein bicyklisches Ringsystem verfügt, das der Gruppe der Hydroazulene zugeordnet werden kann (**Abbildung 40**).^[108] Rotundon selbst ist Bestandteil vieler etherischer Öle, wie Patchouli oder Pfefferölen, und ist außerdem in würzigen Weinen enthalten.^[108,159] Zudem stellt Rotundon die bisher einzige bekannte Verbindung dar, die über ein ausgeprägtes pfeffriges Aroma verfügt.^[160] Durch die Biotransformation von BcBOT2 mit dem Derivat **78** ist es gelungen ein weiteres Terpenoid (**112**) zu erzeugen, das ebenfalls eine pfeffrige Note aufweist. Das Produkt **113** besitzt hingegen kein sensorisches Profil. Der zuvor beschriebene Geruchseindruck des Rohprodukts kann auf das Monoterpen Geraniol (**141**) zurückgeführt werden, bei dem es sich um ein Spaltprodukt des eingesetzten Substrates **78** handelt (s. Kap. 3.9.3).

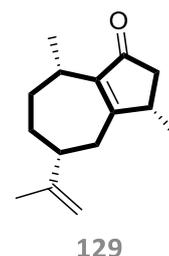
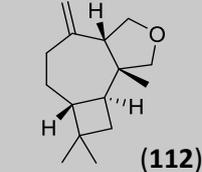
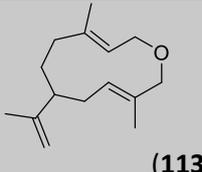


Abbildung 40: Strukturverwandtes Sesquiterpen Rotundon (**129**). Das bicyklische Ringsystem, das ebenfalls im Hauptprodukt **112** enthalten ist, wurde hervorgehoben.

Tabelle 16: Analytische Charakterisierung der Biotransformationsprodukte **112** und **113**. Neben den RI und Flächenprozenten auf einer polaren (FFAP) und einer unpolaren (DB_{5HT}) Säule sind die gefundenen hochaufgelösten Massen der Verbindungen sowie das sensorische Profil zusammengefasst.

 (112)	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}	RI _{FFAP}	A[%] _{FFAP}
	1586	71.0	1933	65.3
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1822 [M] ⁺	pfeffrig, etherisch, campherartig	
 (113)	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}	RI _{FFAP}	A[%] _{FFAP}
	1655	7.8	2060	11.0
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1824 [M] ⁺	kein sensorisches Profil	

Aufgrund weiterer Nebenprodukte aus dem Substrat **78** sowie weiterer Verunreinigungen und Weichmachern im Rohprodukt, wurden die Produkte **112** und **113** durch eine präparative GC (pGC) isoliert. Für das Hauptprodukt **112** wurde dabei eine pGC mit einer polaren Säule ausgewählt, während bei dem Produkt **113** eine unpolare Säule genutzt wurde. Hintergrund ist eine mögliche Coelution mit weiteren Verbindungen bei Verwendung einer chromatographischen Säule entgegengesetzter Polarität, wodurch die abweichenden Flächenprozentage in der **Tabelle 16** bedingt sind. Von den Produkten **112** und **113** wurde jeweils 1 mg über pGC isoliert und dieses anschließend für eine Rechromatographie und Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie genutzt. Die Rechromatographie ist dabei von entscheidender Bedeutung, um eine thermische Umlagerung oder Zersetzung der Produkte während der pGC¹⁴ auszuschließen und um die Reinheit der isolierten Verbindungen zu bestimmen. Letztere konnte für das Produkt **112** auf 98.8 % und für das Produkt **113** auf 78.2 % gesteigert werden. Da zudem eine Übereinstimmung der RI vorliegt, kann eine Thermolabilität der Verbindungen ausgeschlossen werden (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Rechromatographie auf DB_{5HT} nach erfolgreicher Isolierung der Verbindungen über pGC.

Produkt	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}	Produkt	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}
112	1586	98.8	113	1655	78.2

Für die Strukturaufklärung des unbekanntes etherfunktionalisierten Terpenoids **112** wurden neben eindimensionalen auch zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt. Anhand des ¹³C-NMR Spektrums wurden insgesamt 15 Kohlenstoffatome identifiziert, weshalb es sich um ein Sesquiterpen handelt. Über das HSQC konnten weiterhin drei Methyl- und sechs Methylengruppen bestimmt werden. Zudem enthält das Molekül drei CH-Gruppen und drei quaternäre Kohlenstoffatome, sodass sich insgesamt unter Einbezug der hochaufgelösten Masse eine Summenformel von C₁₅H₂₄O ergibt. Das DBÄ beläuft sich auf vier. Anhand des COSY-Spektrums

¹⁴ Für die pGC wurde als Injektor ein Heißaufgabesystem verwendet, wodurch die Produkte einer stärkeren thermischen Belastung ausgesetzt sind.

konnte über Kreuzkopplungen die direkte Nachbarschaft der Protonen H-9 mit H-8 und H10 nachgewiesen werden (**Abbildung 41, A**). Des Weiteren zeigte das Proton an H-2 ebenfalls eine Kreuzkopplung mit H-10 und eine weitere mit H-1. Eine weitere $^3J(\text{H,H})$ -Kopplung konnte zwischen H-6 und H-5 beobachtet werden. Da die drei Methylgruppen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als Multiplizität ein Singulett aufweisen, sollten diese alle an ein quartäres Kohlenstoffatom gebunden sein. Über die chemischen Verschiebungen im ^1H - und $^{13}\text{C-NMR}$ Experiment konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich die CH_2 -Gruppen an Position 4 und 5 direkt neben dem Sauerstoffatom befinden, woraus sich die Etherfunktionalität des Moleküls ergibt. Ferner konnte über die chemische Verschiebung vom $\delta(^{13}\text{C}) = 111.9$ ppm eine *exo*-Methylengruppe (C-14) identifiziert werden, die an das quartäre Kohlenstoffatom C-7 gebunden ist. Da sich keine weiteren Protonen im olefinischen Bereich befinden, sollte das Molekül entsprechend des DBÄ über eine trizyklische Struktur verfügen. Die Verknüpfung der Gerüstbausteine erfolgte über $^{2,3}J(\text{C,H})$ -Kopplungen im HMBC-Spektrum, die zusammenfassend in der **Abbildung 41** angegeben sind.

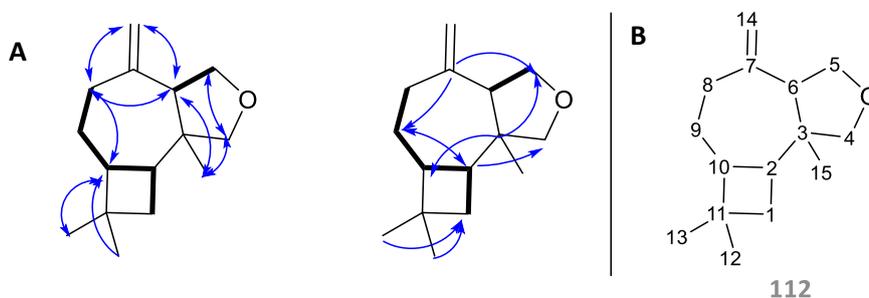


Abbildung 41: Strukturaufklärung der Verbindung **112**. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**) zur Verknüpfung, **B:** Nummerierung der Verbindung **112** entsprechend dem Diphosphat-Derivat **78**.

Zur Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **112** sowie der Verknüpfung des Tetrahydrofuran- und des Cyclobutanringes, wurden 1D-NOE-Experimente durchgeführt (**Abbildung 42, A**). Hierbei konnte ein dipolare Kopplung von H-6 auf H-15 beobachtet werden, sodass der Tetrahydrofuranring *syn* an den Cycloheptanring anelliert ist. Da ebenfalls ein Magnetisierungstransfer von H-6 zu H-10 auftritt, sollten sowohl H-6 als auch H-15 und H-10 in die gleiche Richtung ausgerichtet sein. Ein geringfügiger Kopplungseffekt zwischen H-2 und H-10 ist hingegen wenig aussagekräftig, da der Abstand der beiden Protonen sowohl bei *syn*- als auch bei *anti*-Ausrichtung geringer als 5 Å ist. Stattdessen kann die *anti*-Anordnung des Cyclobutanringes durch eine Magnetisierung von H-12 auf H-2 sowie einem Transfer von H-13 auf H-10 belegt werden. Da H-2 zudem keinen Magnetisierungstransfer mit den *syn*-anellierten Proton H-6 und der Methylgruppe C-15 aufweist, sollte das genannte Proton in die entgegengesetzte Richtung weisen, wodurch sich die relative Stereochemie in **Abbildung 42 (B)** für das Produkt **112** ergibt. Die relative Stereochemie wird außerdem durch weitere Magnetisierungstransfers der Methylengruppen 12 und 13 unterstützt.

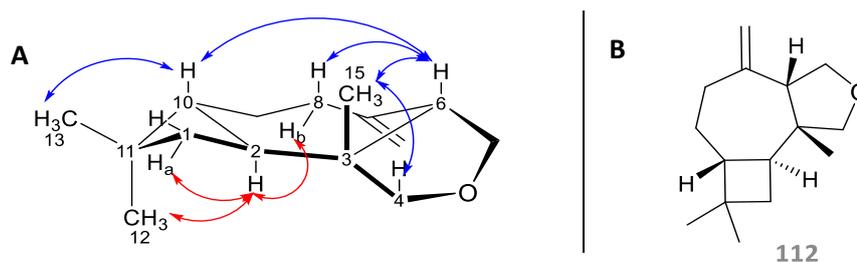
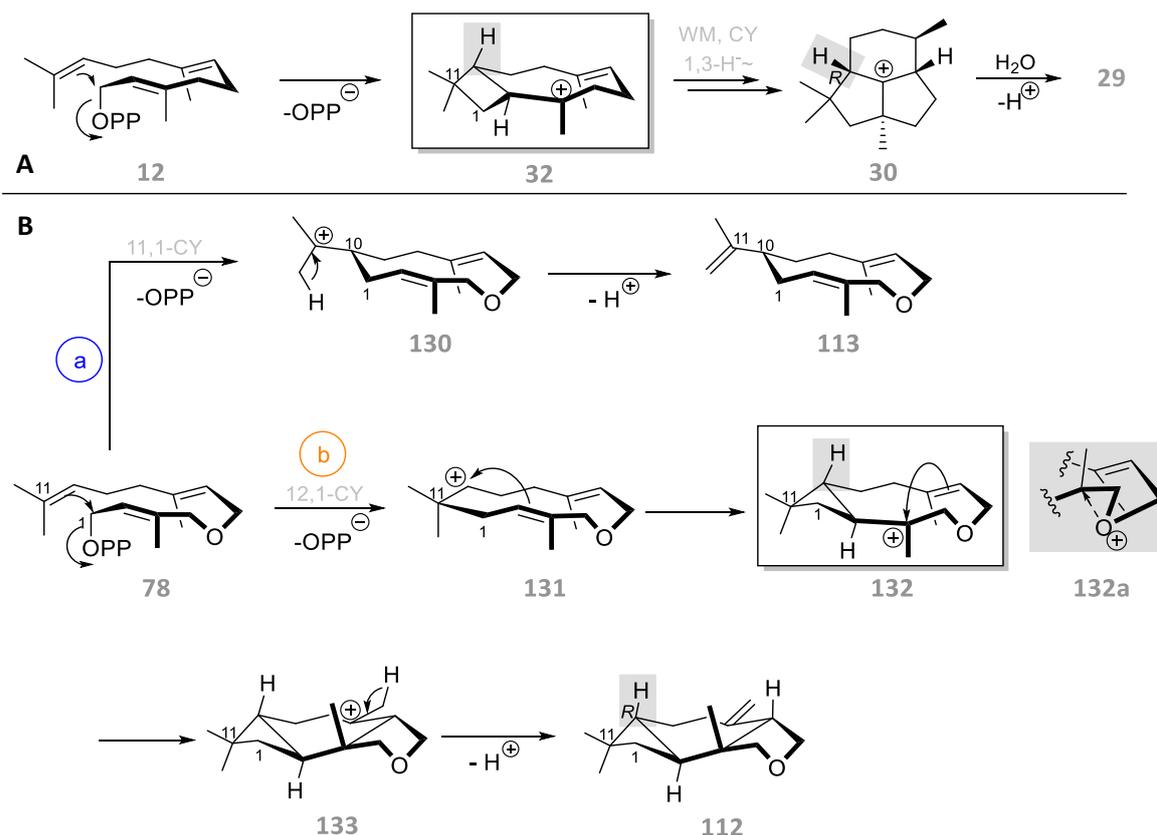


Abbildung 42: Aufklärung der relativen Stereochemie der Verbindung **112**. **A:** Ausgewählte 1D-NOE-Magnetisierungstransfers. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben. **B:** resultierende relative Stereochemie für das Produkt **112** der Biotransformation von BcBOT2 mit **78**.

Die über Coinjektionen postulierte Struktur von OBERHAUSER für das Produkt **113** konnte durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren bestätigt werden. Infolgedessen wurde keine erneute Auswertung der Verbindung anhand von 2D-Experimenten vorgenommen.

3.9.2 Postulierter Mechanismus zur Biosynthese der Produkte **112** und **113**

Trotz der strukturellen Unterschiede von **112** und **113** gegenüber dem natürlichen Produkt Presilphiperfolan- 8β -ol (**29**) wurden, auf Basis der Biosynthese von **29**, mechanistische Überlegungen zur Bildung der unnatürlichen Produkte angestellt (**Schema 13, B**). So könnte die Entstehung des Produktes **113** über einen für STCn typischen Mechanismus ablaufen, bei dem nach Abspaltung des Diphosphatrests eine 11,1-Zyklisierung zum Intermediat **130** erfolgt (**Schema 13, Weg a**). Durch die Kettenverlängerung infolge des zusätzlichen Sauerstoffatoms in **78** wird die für das natürliche Produkt stattfindende 11,1-Zyklisierung beibehalten, wobei der Ringschluss nun zwischen C1 und C10 entsteht. Die carbokationische Reaktionskaskade wird anschließend durch Deprotonierung und Ausbildung eines Isopropenylrestes beendet, sodass **113** erhalten wird. Die Bildung des trizyklischen Produkts **112** beginnt ebenso wie beim natürlichen Substrat nach Abspaltung des Diphosphats mit einem Ringschluss zwischen C1 und C11 zum Kation **131**. Durch die Kettenverlängerung liegt beim unnatürlichen Substrat **78** allerdings eine 12,1-Zyklisierung vor. Ein sich anschließender Ringschluss führt zum kationischen Cyclobutanintermediat **132**, welches ein Analogon zu dem mit FPP erzeugten Intermediat **32** bildet. Nachfolgend kommt es zu einer Abweichung der postulierten Mechanismen. Anstelle einer WAGNER-MEERWEIN Umlagerung, wie es beim FPP (**12**) der Fall ist, wird das Kation **132** durch die verbliebende Doppelbindung abgefangen.^[108] Das resultierende Kation **133** liefert anschließend durch Deprotonierung und Ausbildung einer *exo*-Methylengruppe das Produkt **112** (**Schema 13, Weg b**). Das carbokationische Zwischenprodukt **132** nimmt somit eine Schlüsselfunktion ein. Neben einer durch das Sauerstoffatom bedingten abweichenden Substratfaltung, kann das Kation **132** zudem durch die Bildung eines Oxiran-1-ium-Kations (**132a**) anchimer stabilisiert werden. Dadurch könnte eine Konformationsänderung des Substrates erzeugt werden, wodurch ein neuer Reaktionspfad eröffnet wird, bei dem die verbliebende Doppelbindung als Nucleophil fungiert und einen neuen finalen Ringschluss induziert.^[108]



Schema 13: A: Postulierte Biosynthese für die Bildung von PSP (**29**) durch Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**)^[51,57,61], B: Postulierte Mechanismen für die Bildung der Produkte **112** (Weg b) und **113** (Weg a) durch Katalyse mit BcBOT2 und **78** als unnatürliches Substrat.^[108] Das grau hinterlegte Stereozentrum dient als Referenz zur Bestimmung der absoluten Stereochemie.

Aussagen zur möglichen absoluten Stereochemie des Produktes **112** können anhand der mechanistischen Überlegungen getroffen werden. Da der postulierte Mechanismus der Biosynthesewege von FPP (**12**) und dem Derivat **78** bis zum kationischen Intermediat **32** bzw. **132** unverändert abläuft, wird in beiden Fällen in analoger Weise das in grau markierte stereogene Zentrum während des Cyclobutanringschlusses ausgebildet (**Schema 13, A/B**). Dies trifft sowohl für die postulierten Mechanismen von HANSON und TANTILLO zu, die eine *anti*-Verknüpfung des Cyclobutanringes **32** annehmen, als auch auf die Studien von CANE, der eine *syn*-Anellierung des Rings postulierte.^[51,57,59,61] Da das trizyklische Produkt **112** ebenfalls eine *anti*-Anordnung des Cyclobutanrings aufweist, kann dies allerdings als weiterer Anhaltspunkt für eine Reaktionskaskade über das Intermediat **32** gewertet werden. Die relative und absolute Stereochemie des natürlichen Produktes PSP (**29**) wurde bereits durch Isotopenmarkierungsstudien, einer Derivatisierung zu Silphiperfol-6-en, einer kristallographischen Analyse in Form von *p*-Nitrobenzoat und über eine Totalsynthese eindeutig ermittelt.^[52,62,63] Daher ist anzunehmen, dass das grau hinterlegte Stereozentrum im Produkt **112** (*R*)-konfiguriert ist. Das genannte Zentrum kann somit als stereogener Anker fungieren, sodass auch die Konfigurationen der weiteren Stereozentren bestimmt werden können. Da es sich bei der NMR-Spektroskopie um eine relative Methode handelt, kann die Bildung eines Enantiomerenpaares jedoch nicht ausgeschlossen werden. Allerdings deuten durchgeführte chromatographische Analysen des Produktes **112** mit chiralen Trennsäulen

auf das Vorliegen eines Enantiomers hin, da in keinem Fall eine Auftrennung in zwei Signale beobachtet werden konnte. Diese Annahme wird ferner dadurch unterstützt, dass Enzyme aus *L*-Aminosäuren aufgebaut sind und normalerweise als chirale Katalysatoren mit ausgeprägter Chemo-, Regio- und Enantioselektivität agieren.^[9]

Sowohl **112** als auch **113** besitzen natürlich vorkommende Analoga, die sich lediglich durch das im Produkt befindliche zusätzliche Sauerstoffatom unterscheiden (**Abbildung 43**). So finden sich in der Natur mehrere Sesquiterpenoide die wie das Produkt **112** über einen trizyklischen Kern verfügen, der auf einem Cycloheptanring basiert, an dem zwei Cyclobutanringe fusioniert sind. FITJER konnte bereits nachweisen, dass die triczyklischen Sesquiterpenoide eine enge Verwandtschaft mit dem Dizyklus β -Caryophyllen (**24**) aufweisen, welches sich unter sauren Bedingungen zu den trizyklischen Verbindungen umlagert. Als ein Produkt konnte das trizyklische Alken **134** neben weiteren Konstitutionsisomeren identifiziert werden, welches ein identisches Kohlenstoffgrundgerüst wie das Produkt **112** aufweist und überdies die gleiche relative Stereochemie besitzt.^[161] Auch die bekannten epimeren 5,8-Cyclocaryophyllen-4-ole **135a** und **135b** sowie das Koraiol (**136**) weisen eine vergleichbare Kernstruktur wie **112** auf.^[161–163] Koraiol **136** wurde zudem neben weiteren trizyklischen Caryophyllenderivaten als Produkt in der reispfadenpathogenen Ascomycete *Fusarium fujikuroi* IMI58289 identifiziert und erstmals vollständig charakterisiert.^[164] Das unnatürliche Produkt **113** zeigt hingegen, mit Ausnahme des Sauerstoffatoms, eine gleiche Kernstruktur wie das natürlich vorkommende Germacren A (**62**).^[104] Letzteres wurde zudem bereits als Nebenprodukt der enzymatischen Katalyse von BcBOT2 mit FPP (**12**) über GCMS qualitativ bestimmt (s. Kap. 3.5.2).

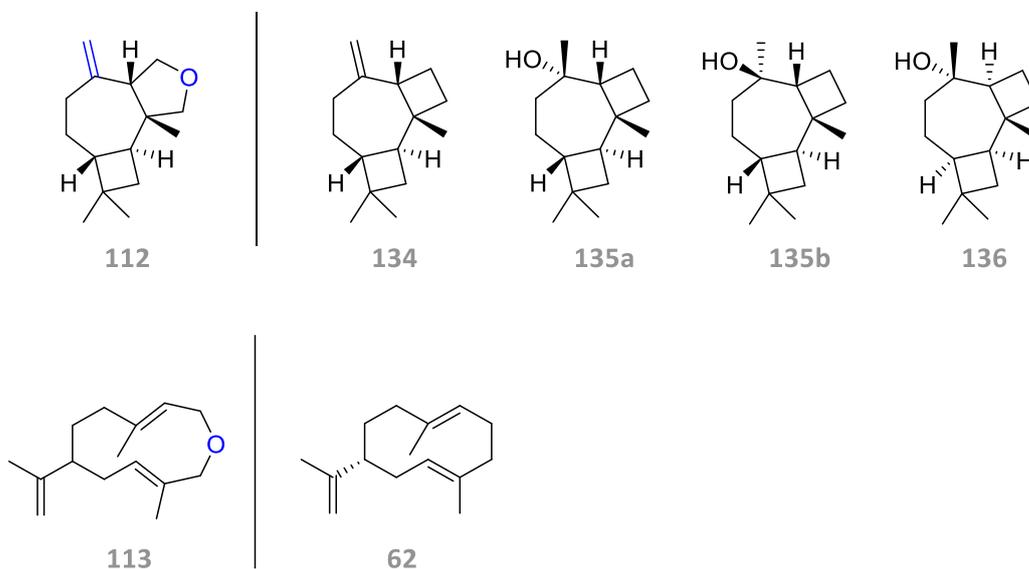
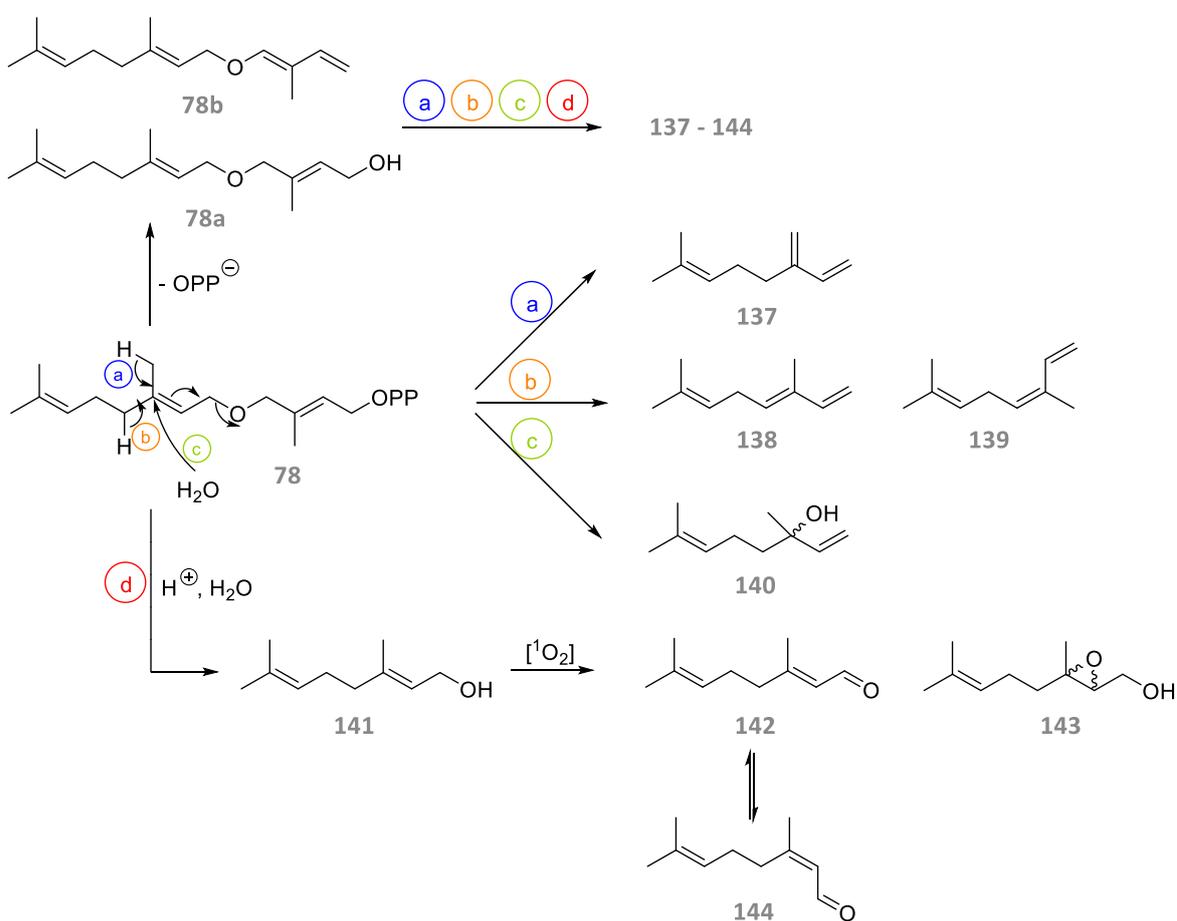


Abbildung 43: Strukturverwandte natürlich vorkommende Sesquiterpenoide der Biotransformationsprodukte **112** und **113**. Neben dem trizyklischen Alken **134** weisen auch 5,8-Cyclocaryophyllen-4 α -ol (**135a**) und 5,8-Cyclocaryophyllen-4 β -ol (**135b**) eine übereinstimmende relative Stereochemie mit den stereogenen Zentren von **112** auf. Koraiol (**136**) zeigt hingegen eine übereinstimmende Kernstruktur aber eine abweichende relative Stereochemie. Das Produkt **113** weist eine Übereinstimmung mit dem natürlich vorkommenden Germacren A (**62**) auf. Abweichende Kernfragmente der Verbindungen **112** und **113** sind farblich (blau) hervorgehoben.

3.9.3 Qualitative Bestimmung von Monoterpenoiden

Auch bei der Biotransformation von BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **78** können durch eine massenspektrometrische Analyse Monoterpenoide identifiziert werden. Durch eine Coinjektion und einen Vergleich der Massenspektren zeigte sich, dass mit der STC PenA und dem Derivat **78** identische Monoterpene gebildet wurden, sodass der Ursprung der Terpene eindeutig auf das eingesetzte Substrat **78** zurückgeführt werden konnte. Demzufolge sollte es sich bei den Verbindungen um Zersetzungs- bzw. Hydrolyseprodukte des Derivats **78** handeln. Durch einen Datenbankabgleich konnten einige der Monoterpene identifiziert werden. Anhand der **Schema 14** zeigt sich, dass β -Myrcen (**137**), (*Z*)- β -Ocimen (**138**), (*E*)- β -Ocimen (**139**) sowie die oxidierten Monoterpene Linalool (**140**) und Geraniol (**141**) durch eine Spaltung des Allylethers erzeugt werden können. Die Monoterpene Geranial (**142**) sowie auch 2,3-Geraniolepid (**143**) können durch autoxidative Prozesse, analog dem des β -Caryophyllen, aus **141** gebildet werden.^[141] **142** kann anschließend wiederum über Keto-Enol-Tautomerie reversibel zum Neral (**144**) isomerisieren.^[165]

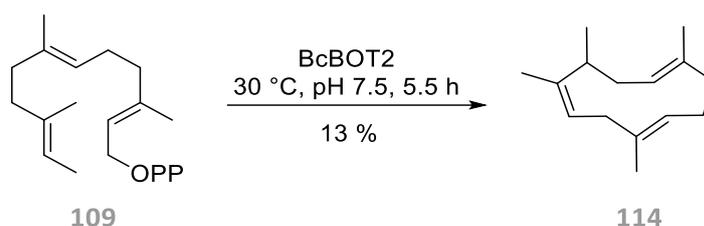


Schema 14: Postulierte Bildung der Monoterpenoide **137** – **144** aus dem unnatürlichen Derivat **78**. Eine Bildung der Monoterpene über die Sesquiterpenoide **78a** und **78b** nach Abspaltung des Diphosphatrests kann ebenfalls in Betracht gezogen werden. Die Sesquiterpenoide **78a** und **78b** stellen exemplarische Beispiele von möglichen Produkten dar. Eine Autoxidation von Geraniol (**141**) ermöglicht die Bildung der Produkte Geranial (**142**) und 2,3-Geraniolepid (**143**). Neral (**144**) wird abschließend durch eine Keto-Enol-Tautomerie des Geranials (**142**) und Isomerisierung gebildet. Die stereogenen Zentren wurden nicht näher untersucht, da die GCMS Messung mit einer achiralen Säule durchgeführt wurde.

Die identifizierten Monoterpene zeigen, dass beim Derivat **78** neben einer Hydrolyse des Diphosphats auch eine Spaltung des Allylethers dazu führen kann, dass das eingesetzte Substrat der enzymatischen Reaktion entzogen wird. Ob die Monoterpene direkt aus dem unnatürlichen Derivat **78** gebildet wurden oder erst nach Abspaltung des Diphosphatrests (**78a**, **78b**) ist nicht bekannt. Da allerdings keine aus dem Substrat stammenden Produkte mit einem Molpeak von m/z 238 (**78a**) oder m/z 220 (**78b**) beobachtet werden konnten, deutet sich eine direkte Bildung aus dem Derivat **78** an.

3.10 Semi-präparativer Ansatz der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat 109

Die semi-präparative Umsetzung des methylverschobenen Substrates **109** mit dem Enzym BcBOT2 wurde ebenfalls mit einer kontinuierlichen Substratzugabe durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 1.5 mM von dem Derivat **109** eingesetzt. Das Rohprodukt wurde als hellgelbe ölige Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 13 % erhalten (**Schema 15**). Die vergleichsweise geringe Ausbeute kann einerseits auf eine mangelnde Substratazeptanz zurückgeführt werden, andererseits wurde der semi-präparative Ansatz bei dem zuvor ermittelten Temperaturoptimum (30 °C) durchgeführt. Daher ist ein zeitabhängiger Aktivitätsverlust, infolge einer unzureichenden Enzymstabilität bei der gewählten Temperatur anzunehmen (s. Kap. 3.8).

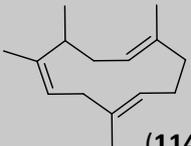


Schema 15: Biotransformation des methylverschobenen Substrats **109** mit der STC BcBOT2 zum Produkt **114**.

3.10.1 Analytische Charakterisierung und Strukturaufklärung

Das Hauptprodukt **114** wurde zunächst mittels GC-MS charakterisiert (**Tabelle 18**). Hierbei konnte ermittelt werden, dass das Hauptprodukt **114** mit einem Anteil von 69.9 % in dem Rohprodukt enthalten ist. Die weiteren Flächenprozentanteile verteilen sich auf die Nebenprodukte **115** und **116** sowie auf mitextrahierte Verunreinigungen. Durch eine pGC zur Isolierung des Hauptproduktes, konnte die Reinheit der Verbindung **114** auf 93.1 % gesteigert werden. Die olfaktorische Untersuchung zeigte einen intensiven würzigen und pfeffrigen Geruch für die Verbindung **114**. Die pfeffrige Note weist erneut eine Ähnlichkeit zu dem Sesquiterpen Rotundon (**129**) auf.

Tabelle 18: Analytische Charakterisierung des Biotransformationsproduktes **114**.

 (114)	RI_{DB5}	A[%]_{DB5}	RI_{FFAP}	A[%]_{FFAP}
	1518	70.9	1718	69.9
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
gefunden:	204.1877 [M] ⁺	würzig, pfeffrig, intensiv		

Da polare stationäre Phasen sich durch eine Trennung nach Polarität¹⁵ auszeichnen, weist der R_{FFAP} von 1718 bereits auf ein unpolares Terpenoid ohne Sauerstoffunktionalität hin. Dies kann durch die gefundene hochaufgelöste Masse von m/z 204.1877 $[\text{M}]^+$ bestätigt werden, sodass sich für die Verbindung **114** eine Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ und ein DBÄ von vier ergibt. Die Summenformel kann weiterhin durch das HSQC bestätigt werden, wonach sich das Molekülgrundgerüst aus vier Methyl- und Methylengruppen sowie vier CH-Gruppen und drei quaternären Kohlenstoffatomen zusammensetzt (**Abbildung 44**). Durch die sehr ähnliche chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome C-8 und C-11 konnte die Multiplizität der Gruppen erst durch ein DEPT135 aufgeklärt werden. Die Methylgruppe C-12 weist im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum ein Dublett auf, weshalb diese Methylgruppe an die CH-Gruppe C-11 gebunden ist. Die weiteren drei CH-Gruppen weisen aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung eindeutig olefinischen Charakter auf, sodass es sich bei dem Molekül um einen Monozyklus mit drei endozyklischen Doppelbindungen handelt, an die über die quartären Kohlenstoffatome die weiteren drei Methylgruppen C-13, C-14 und C-15 gebunden sind. Durch die Kopplungskonstanten im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum sowie dem COSY Spektrum wurde das Grundgerüst mit Ausnahme der quaternären Kohlenstoffatome bestimmt. Letztere wurden anschließend zusammen mit den gebundenen Methylgruppen durch $^{2,3}\text{J}(\text{C,H})$ -Kopplungen im HMBC-Spektrum zugeordnet.

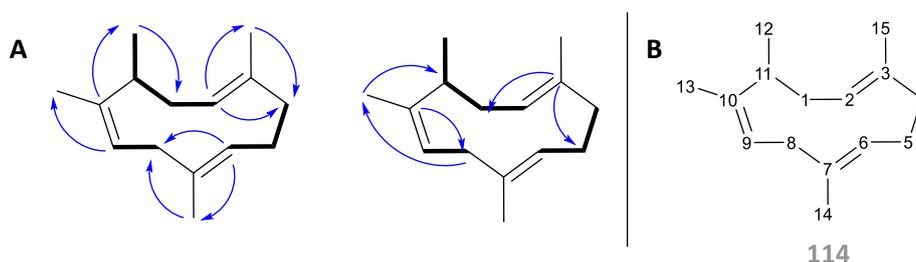
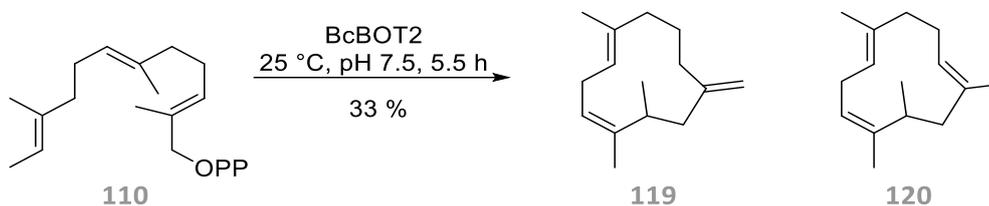


Abbildung 44: Strukturaufklärung der Verbindung **114**. **A:** Durch das COSY Spektrum und skalare Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Nummerierung der Verbindung **114** entsprechend dem Diphosphat-Derivat **109**.

Bezüglich der Konfiguration konnten anhand der Magnetisierungstransfers im 1D-NOE-Spektrum zwei (*E*)- sowie eine (*Z*)-orientierte Doppelbindung identifiziert werden (**Abbildung 45**). Die (*Z*)-Doppelbindung wurde durch eine Magnetisierung von H-13 mit H-9 nachgewiesen, während bei den (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen keine dipolaren Kopplungen zwischen den olefinischen Protonen und den jeweiligen Methylgruppen beobachtet wurde. Weiterhin zeigten die 1D-NOE Experimente, dass die Methylgruppen 14 und 15 in entgegengesetzte Richtungen weisen, was durch eine Magnetisierungsübertragung von H-14 auf H-2 und von H-15 zu H-6 bestätigt werden kann. Die Methylgruppe C-12 des stereogenen Zentrums sollte aufgrund der Kopplung von H-11 mit H-6 und H-15 in die entgegengesetzte Richtung wie die Methylgruppe 15 weisen. Durch weitere Magnetisierungstransfers innerhalb des Moleküls kann die in der **Abbildung 45** vorgeschlagene Konformation des Hauptproduktes **114** angenommen werden. Da die NMR-Spektroskopie

¹⁵ Je höher die Polarität einer Verbindung, desto später erfolgt die Elution von der polaren Trennsäule.

in einem geringeren Anteil im Produktspektrum vertreten ist als **120**, sind ausreichende Mengen an Rohprodukt notwendig. Zur Gewährleistung von Enzymstabilität und Substratakzeptanz wurde die Biotransformation bei 25 °C durchgeführt. Das Rohprodukt wurde als hellgelbe ölige Flüssigkeit in 33 % Ausbeute erhalten (**Schema 17**).

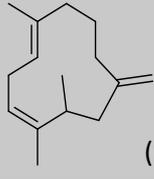
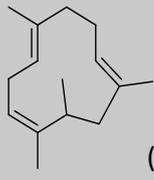


Schema 17: Biotransformation von **110** mit der STC BcBOT2 zu den unnatürlichen Produkten **119** und **120**.

3.11.1 Analytische Charakterisierung und Strukturaufklärung

Für die analytische Charakterisierung der Produkte **119** und **120** wurden GCMS und GC-Olfaktometrie Messungen durchgeführt (**Tabelle 19**). Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Produkt **119** mit einem Anteil von 14.6 % in dem Rohprodukt enthalten ist und das Produkt **120** mit 49.8 %. Die weiteren Flächenprozentanteile verteilen sich auf mitextrahierte Verunreinigungen und die Nebenprodukte **116** und **117** (s. Kap. 3.7.1). Letztere sind allerdings in einem zu geringeren Anteil in dem Rohprodukt enthalten, sodass eine Isolierung und Strukturaufklärung der Verbindungen nicht zielführend ist. Daher wurden mittels pGC lediglich die Produkte **119** und **120** isoliert, wodurch eine Steigerung der Reinheit für die Produkte erzielt werden konnte. Ein Vergleich der RI bestätigte zudem, dass während der Isolierung keine thermische Umlagerung der Produkte eintrat. Eine GC-Olfaktometrie zur Ermittlung des sensorischen Profils ergab für beide Terpenoide keinen wahrnehmbaren Geruchseindruck.

Tabelle 19: Analytische Charakterisierung der Produkte **119** und **120** sowie RI und prozentuale Flächenanteile der isolierten Verbindungen nach der pGC (Rechromatographie).

 (119)	RI_{DB5}	A[%]_{DB5}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1520	18.9	1695	14.6
	HR-GCMS gefunden: 204.1877 [M] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
 (120)	RI_{DB5}	A[%]_{DB5}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1528	53.0	1706	49.8
	HR-GCMS gefunden: 204.1879 [M] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
Rechromatographie	RI_{DB5}	A[%]_{DB5}		
119	1520	85.8		
120	1528	97.0		

Anhand der Massenspektren konnte für beide Produkte eine Summenformel von $C_{15}H_{24}$ bestimmt werden, sodass die Verbindungen keine oxidierten Funktionalitäten aufweisen. Für beide Verbindungen ergibt sich weiterhin ein DBÄ von vier. Eine durchgeführte GC-IR Messung ermöglichte zudem die Identifikation einer *exo*-Methylengruppe für die Verbindung **119** durch eine ausgeprägte Bande bei 3078 cm^{-1} . Die Strukturaufklärung der Produkte **119** und **120** erfolgte anhand von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten.

Durch ein DEPT 135 sowie dem HSQC konnten für die Verbindung **119** drei Methyl- und sechs Methylengruppen ermittelt werden (**Abbildung 46**). Weiterhin weist das Molekül drei CH-Gruppen sowie drei quaternäre Kohlenstoffatome auf. Durch die skalaren Kopplungskonstanten im ^1H -NMR Spektrum sowie Kreuzkopplungen im COSY Spektrum wurden erste Verknüpfungen des Kohlenstoffgrundgerüsts bestimmt. Eine Triplet-Aufspaltung bei zwei an quartäre Kohlenstoffatome gebundene Methylgruppen kann auf *long-range* Kopplungen zurückgeführt werden. Die verbliebene Methylgruppe 14 zeigt hingegen ein Dublett, sodass diese direkt an eine CH-Gruppe gebunden ist. Die bereits durch IR-Messungen identifizierte *exo*-Methylengruppe konnte durch eine charakteristische chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 109.7\text{ ppm}$ im ^{13}C -NMR Spektrum bestätigt werden. Anhand der chemischen Verschiebungen der Protonen H-2 und H-4 sowie der quartären Kohlenstoffatome, können diese eindeutig als Bestandteil von olefinischen Doppelbindungen identifiziert werden. Insgesamt weist das Molekül somit drei Doppelbindungen auf, weshalb ein Ringschluss zur Erfüllung des DBÄ verbleibt. Die Verknüpfung der Gerüstbausteine erfolgte unter Einbezug von $^{2,3}J(\text{C,H})$ -Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum.

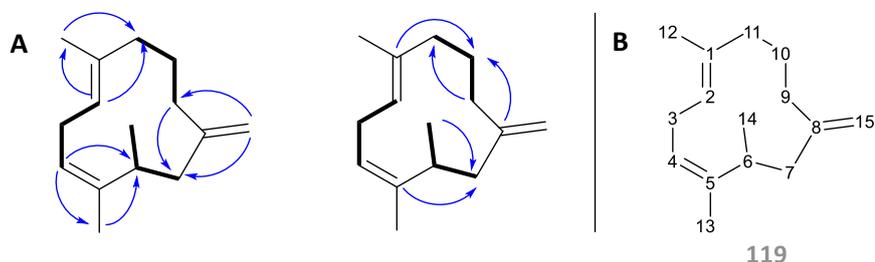


Abbildung 46: Strukturaufklärung der Verbindung **119**. **A:** Durch das COSY-Spektrum und skalare Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **119** erfolgte nicht in Analogie zu der des eingesetzten Substrates **110**.

Durch das NOESY Experiment konnten weiterhin die Konfigurationen der beiden endozyklischen Doppelbindungen ermittelt werden. Während zwischen H-4 und der Methylgruppe 13 eindeutig ein Magnetisierungstransfer vorhanden ist und dementsprechend eine *cis*-Konfiguration vorliegt, kann zwischen H-2 und H-12 keine dipolare Kopplung beobachtet werden. Folglich weisen das Proton und die Methylgruppe in diesem Fall in entgegengesetzte Richtungen, wodurch sich eine *trans*-Konfiguration der Doppelbindung ergibt (**Abbildung 47**).

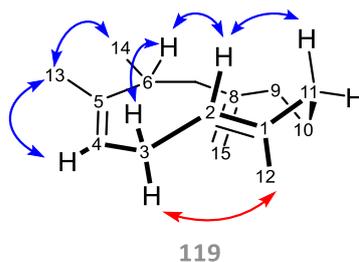


Abbildung 47: Aufklärung der Doppelbindungskonfiguration der Verbindung **119**. Ausgewählte NOESY Magnetisierungs-transfers. In blau (Pfeile) sind Wechselwirkungen zwischen Protonen oberhalb (blau) und unterhalb (rot) der Molekülebene angegeben.

Über ein HSCQ-Spektrum konnten insgesamt jeweils vier Methyl-, Methylen- und CH-Gruppen für die Verbindung **120** identifiziert werden (**Abbildung 48**). Weiterhin verfügt das Molekül über drei quartäre Kohlenstoffatome. Die quartären Kohlenstoffatome sowie drei der vier vorhandenen CH-Gruppen, die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine chemische Verschiebung im olefinischen Bereich aufweisen, sind Bestandteil von drei endozyklischen Doppelbindungen. Folglich handelt es sich auch bei der Verbindung **120** aufgrund des DBÄ um einen Monozyklus. Mittels COSY konnten anschließend direkte Nachbarn durch $^3J(\text{H,H})$ -Kopplungen identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass an die verbleibende CH-Gruppe die Methylgruppe 14 gebunden ist. Dies konnte durch eine Dublett-Aufspaltung der entsprechenden Methylgruppe im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt werden. Auffällig bei der Verbindung **120** ist die erhöhte Anzahl an auftretenden *long-range*-Kopplungen im COSY- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Diese werden durch die weiteren Methylgruppen hervorgerufen, die direkt an eine der Doppelbindungen über das quartäre Kohlenstoffatom gebunden sind. Über das HMBC-Spektrum kann anschließend die Struktur des Moleküls vollständig aufgeklärt werden. Hierbei tragen vor allem die $^{2,3}J(\text{C,H})$ -Kopplungen der quartären Kohlenstoffatome entscheidend zur Strukturaufklärung bei.

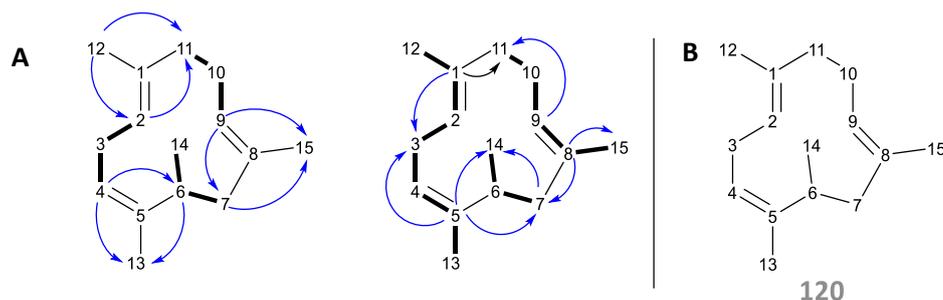


Abbildung 48: Strukturaufklärung der Verbindung **120**. **A:** Durch das COSY-Spektrum und skalare Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **120** erfolgte nicht in Analogie zu der des eingesetzten Substrates **110**.

Die Konfiguration der Doppelbindungen wurde anhand eines NOESY-Experiments aufgeklärt. Während zwischen der Methylgruppe 13 und dem olefinischen Proton H-4 eine Magnetisierung beobachtet wurde und somit eine *cis*-Konfiguration vorliegt, wurden für die weiteren Doppelbindungen keine Magnetisierungen der beteiligten Methylgruppen und den olefinischen Protonen beobachtet, sodass es sich hierbei um *trans*-konfigurierte Doppelbindungen handelt. Durch weitere dipolare Kopplungen der Methylgruppen 12 und 15 zeigte sich zudem, dass die

Methylgruppen in die gleiche Richtung weisen, wodurch sich die in der **Abbildung 49** angegebene Konfiguration für das Produkt **120** ergibt.

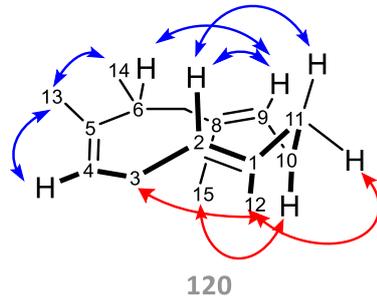
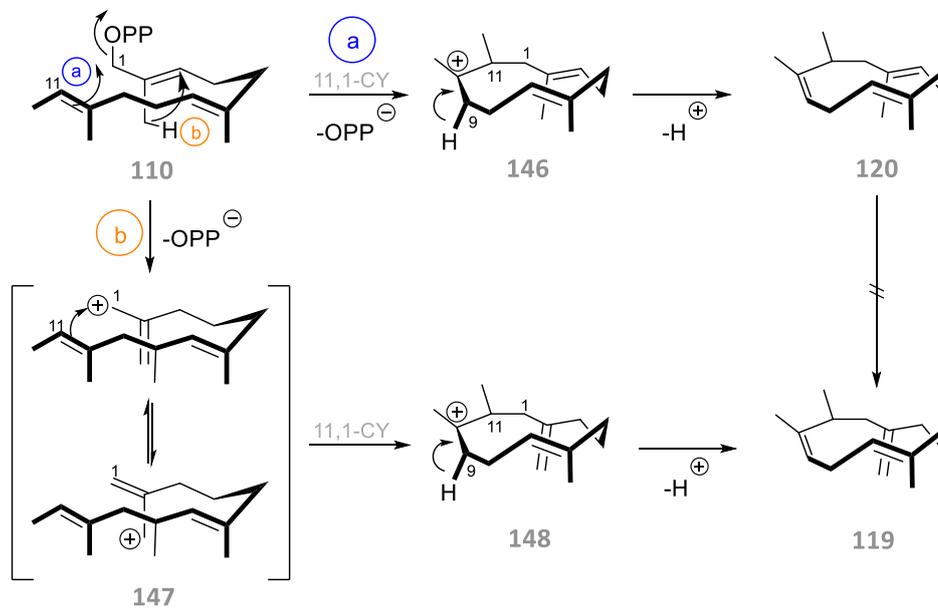


Abbildung 49: Aufklärung der Doppelbindungskonfiguration der Verbindung **120**. Ausgewählte NOESY Magnetisierungs-transfers. In blau (Pfeile) sind Wechselwirkungen zwischen Protonen oberhalb (blau) und unterhalb (rot) der Molekülebene angegeben.

3.11.2 Postulierter Mechanismus für die Biosynthese der Produkte **119** und **120**

Die beiden isolierten Produkte **119** und **120** der Biotransformation der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **110** unterschieden sich lediglich durch die Position der an C-2 befindlichen Doppelbindung. Während in **119** eine exozyklische Doppelbindung vorliegt, weist die Verbindung **120** an der Position eine endozyklische Doppelbindung auf. Der postulierte Mechanismus zur Bildung des Produktes **120** beginnt, in Analogie zum natürlichen Substrat FPP (**12**), ebenfalls mit einer 11,1-Zyklisierung zum carbokationischen Intermediat **146**. Anschließend findet eine Deprotonierung an C-9 statt, wodurch das Produkt **120** entsteht (**Schema 18**, Weg a).^[151]



Schema 18: Postulierter Mechanismus für die Umsetzung des Derivats **110** zu den Produkten **119** und **120** durch enzymatische Katalyse mit der STC BcBOT2. Durch Inkubation von **120** mit der STC BcBOT2 konnte die Bildung von **119** aus der Verbindung **120** ausgeschlossen werden. **Weg a:** Bildung des Produkts **120**, **Weg b:** postulierte Bildung von **119** durch einen zu Beginn stattfindenden Hydridtransfer.

Das Produkt **119** könnte hingegen durch einen monoprotonischen intramolekularen Wasserstofftransfer gebildet werden, der entweder direkt zu Beginn oder ausgehend von der Verbindung **120** stattfinden könnte. Letzteres würde bedeuten, dass es sich bei **120** um ein neutrales Intermediat handelt, welches innerhalb des Reaktionspfades zur Bildung von **119** auftritt. Neutrale Intermediate innerhalb der Reaktionskaskade sind dabei nicht unüblich für TCn. So wurde beispielsweise Germacren A (**62**) als neutrales Zwischenprodukt in den Reaktionskaskaden der (+)-Aristolochen Synthesen (PR-AS, AT-AS)¹⁶ und der *Tabacco* 5-*epi*-Aristolochen Synthese (TEAS) durch die Verwendung von fluorierten Substraten nachgewiesen.^[95,97,100,101] Auch für die Bildung der Sesquiterpene (-)-Neomeranol und (+)-Intermedeol konnten Bicyclogermacren bzw. Germacren A (**62**), durch Isotopenmarkierungsexperimente, als neutrale Zwischenprodukte der carbokationischen Kaskade identifiziert werden.^[166] Ob es sich bei **120** ebenfalls um ein neutrales Intermediat von **119** handelt, wurde durch eine Inkubation des isolierten Produkts **120** mit der STC BcBOT2 überprüft. Durch eine GC-MS-Analyse konnte die Bildung von **119** nicht nachgewiesen werden, sodass der postulierte Hydridtransfer bereits zu Beginn des Mechanismus stattfinden sollte. Demzufolge werden die beiden Produkte **119** und **120** durch unterschiedliche Reaktionspfade gebildet und **120** agiert nicht als neutrales Zwischenprodukt innerhalb der Reaktionskaskade zur Bildung von **119**.^[151] Das Auftreten eines intramolekularen Hydridtransfers wurde bereits für die Diterpentaxadiensynthese beschrieben.^[167] Nach erfolgtem Hydridtransfer und Bildung des durch Mesomerie stabilisierten Kations **147** findet, analog zur Bildung der Verbindung **120**, ebenfalls ein 11,1-Zyklisierungsschritt (**148**) und eine Deprotonierung an C-9 zur Bildung des Produktes **119** statt (**Schema 18**, Weg b). Folglich unterscheiden sich die postulierten Mechanismen lediglich durch den bei **119** zusätzlich auftretenden Hydridtransfer. Aufgrund des höheren prozentualen Anteils von **120** im Rohprodukt, wird jedoch der Reaktionspfad ohne Hydridtransfer von der STC BcBOT2 bevorzugt.

Ebenso wie bei den unnatürlichen Substraten **78** und **109** kann auch bei dem Derivat **110** nach einer 11,1-Zyklisierung eine frühzeitige Freisetzung der Produkte aus der aktiven Tasche beobachtet werden, wobei der Abbruch der Reaktionskaskade durch eine Deprotonierung hervorgerufen wird. Demzufolge scheinen die gebildeten 11,1-Zyklisierungsintermediate eine abweichende Konformation anzunehmen, wodurch die Bildung eines Cyclobutanintermediats nicht mehr genügend durch das Enzym stabilisiert werden kann. Die stattdessen freigesetzten Produkte **114**, **119** und **120** weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem natürlich vorkommenden α -Humulen (**95**) auf, wobei sie sich lediglich durch das verschobene Methylmuster sowie der *cis*-Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 unterscheiden (**Abbildung 50**).

¹⁶ PR-AS: (+)-Aristolochen Synthase aus *Penicillium roquefortii*, AT-AS: (+)-Aristolochen Synthase aus *Aspergillus terreus*

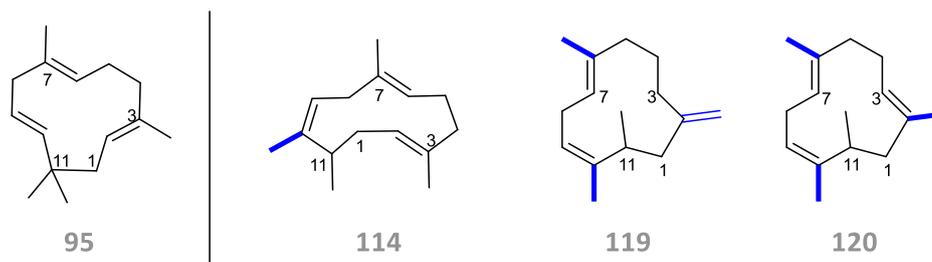
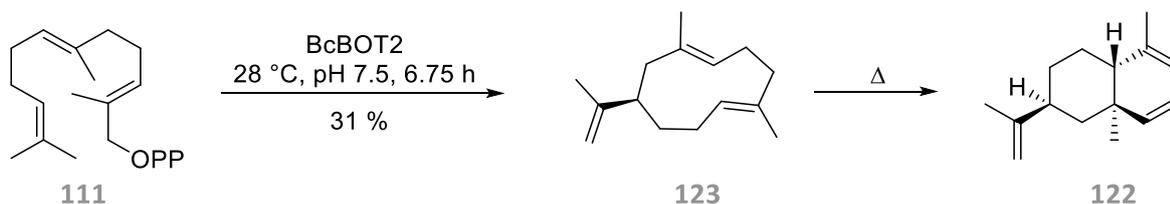


Abbildung 50: Vergleich der unnatürlichen Produkte **114**, **119** und **120** mit dem natürlich vorkommenden α -Humulon (**95**). Die Nummerierung entspricht der des FPP (**12**). Die verschobenen Methylgruppen sind farblich (blau) hervorgehoben.

3.12 Semi-präparativer Ansatz der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **111**

Für die Umsetzung mit dem unnatürlichen Substrat **111**, bei dem die zentrale und die nahe des Diphosphatrests befindliche Methylgruppe verschoben sind, wurde ebenfalls ein Fed-Batch Prozess mit kontinuierlicher Substratzugabe gewählt. Aufgrund der geringen semi-quantitativ bestimmten Ausbeute des biotransformierten Produkts **123** in den analytischen Enzymtests, wurden insgesamt 120 mg Substrat **111** eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 28 °C inkubiert, um einerseits eine ausreichende Enzymstabilität zu gewährleisten und andererseits die thermische Belastung des entstehenden Produkts **123** gering zu halten. Als Rohprodukt wurde eine hellgelbe, ölige Flüssigkeit in 31 % Ausbeute erhalten (**Schema 19**).



Schema 19: Umsetzung des unnatürlichen Derivats **111** durch Katalyse mit der STC BcBOT2 zu dem biotransformierten Produkt **123**, welches sich unter thermischer Belastung zu dem Produkt **122** umlagert. Es sind die relativen stereochemischen Beziehungen angegeben.

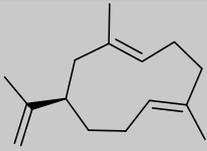
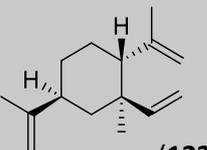
3.12.1 Analytische Charakterisierung der Produkte **122** und **123**

Für die analytische Betrachtung der Produkte **122** und **123** wurden chromatographische und massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Da das Produkt **122** durch die bei der chromatographischen Trennung herrschenden Bedingungen erzeugt wurde, konnte die Reinheit des biotransformierten Produkts **123** durch Addition der beiden Produktpeaks ermittelt werden. Das thermische Produkt **122** wurde anschließend durch eine präparative GC mit Heißaufgabe separat isoliert, analytisch charakterisiert und die Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt.

Für das biotransformierte Produkt **123** konnte ein prozentualer Anteil von 91.7 % am Rohprodukt auf einer unpolaren Trennsäule ermittelt werden (**Tabelle 20**). Anhand des RI der polaren stationären Phase zeigt sich bereits, dass die Verbindung keine Sauerstofffunktionalität aufweist. Dies kann durch die gefundene hochaufgelöste Masse von m/z 204.1876 $[M]^+$ bestätigt werden, sodass sich die Summenformel der Verbindung **123** auf $C_{15}H_{24}$ beläuft. Das DBÄ des Moleküls entspricht somit vier. Eine GC-Olfaktometrie offenbarte für das biotransformierte Produkt einen

citrisch, ozonigen und fruchtigen Geruchseindruck. Das thermische Produkt **122** konnte durch die Isolierung in einer Reinheit von 99.8 % erhalten werden. In Analogie zum biotransformierten Produkt handelt es sich um ein Molekül ohne oxidierte Funktionalität mit einer Summenformel von $C_{15}H_{24}$. Eine sensorische Begutachtung zeigte, dass auch das thermische Produkt **122** einen ozonigen und citrischen Geruch aufweist. Dieser ist allerdings weniger stark ausgeprägt als beim biotransformierten Produkt **123**.

Tabelle 20: Analytische Charakterisierung des biotransformierten Produkts **123** und des thermischen Produkts **122**. Die für das Produkt **122** angegebenen prozentualen Flächenanteile wurden nach Isolierung mittels pGC erhalten.

 (123)	RI_{DB1}	A[%]_{DB1}	RI_{FFAP}	A[%]_{FFAP}
	1515	91.7	1778	92.0
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	204.1876 [M] ⁺	citrisch, ozonig, fruchtig	
 (122)	RI_{DB5}	A[%]_{DB5}	RI_{FFAP}	A[%]_{FFAP}
	1417	100.0	1603	99.8
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	204.1878 [M] ⁺	ozonig, citrisch	

3.12.2 Strukturaufklärung des biotransformierten Produkts **123**

Die Strukturaufklärung des biotransformierten Produkts **123** erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente. Hierbei wurden bei Raumtemperatur in den ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren breite und schlecht aufgelöste Signale erhalten, die auf das Vorliegen von mehreren Konformeren hindeuteten. Durch die Senkung der Temperatur auf 255 K wurden drei gut aufgelöste Signalsätze erhalten, die in einem Verhältnis von 10: 6: 5 (**123a** – **123c**) vorlagen. Die Anzahl der vorliegenden Konformere konnte dabei anhand der olefinischen Protonen und Methylgruppen bestimmt werden. Die Strukturformel der Verbindung **123** wurde zunächst anhand des Hauptkonformers **123a** ermittelt (**Abbildung 51**). Hierbei wurden sichtbare Kreuzkopplungen im COSY-Spektrum sowie $^{2,3}\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen im HMBC genutzt. Die Identifikation der zugehörigen Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum konnte anhand der Signalintensitäten sowie einem Abgleich mit dem bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren erzielt werden. Eine exakte Zuordnung der dazugehörigen Protonen erfolgte über das HSQC-Spektrum. Eine vorhandene *exo*-Methylengruppe konnte durch eine charakteristische chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 108.1$ ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum identifiziert werden. Durch die skalaren Kopplungskonstanten der entsprechenden CH_2 -Gruppe im ^1H -NMR-Spektrum konnte zudem eine *long-range*-Kopplung zu der Methylgruppe 13 identifiziert werden, sodass das Molekül über eine Isopropenylgruppe in seinem Grundgerüst verfügt. Durch ^1H -chemische Verschiebung konnten zudem zwei weitere olefinische Protonen nachgewiesen werden, die aufgrund der Tieffeldverschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum, jeweils zusammen mit einem quartären Kohlenstoffatom eine endozyklische Doppelbindung ausbilden. Entsprechend dem DBÄ handelt es sich bei dem vorliegenden Molekül folglich um einen

Monozyklus. Durch die Kreuzkopplungen im COSY-Spektrum kann die Grundgerüststruktur nahezu vollständig aufgeklärt werden. Auftretende *long-range* Kopplungen zwischen den Methylgruppen 14 und 15 mit den olefinischen Protonen H-7 und H-3 ermöglichten eine Zuordnung der Methylgruppen zum Ringsystem. Unter Einbezug des HMBC-Spektrums konnte anschließend eindeutig die Strukturformel der Konformere bestimmt werden. Die verbliebenden Protonen und Kohlenstoffatome wurden in Analogie den beiden weiteren Konformeren **123b** und **123c** zugeordnet. Einzig die Kohlenstoffatome an der Position C-4 in den Konformeren **123b** und **123c** konnten nicht einwandfrei zugeordnet werden, da sie lediglich einen Unterschied von $\Delta(\delta^{13}\text{C}) = 0.1$ ppm in der chemischen Verschiebung aufweisen. Eines der gebundenen Protonen an der CH₂-Gruppe verhielt sich zudem chemisch äquivalent. Das weitere Proton wies hingegen eine abweichende chemische Verschiebung auf, sodass dieses anhand der Kreuzkopplung im COSY-Spektrum eindeutig den jeweiligen Nebenkonformeren zugeordnet werden konnte.

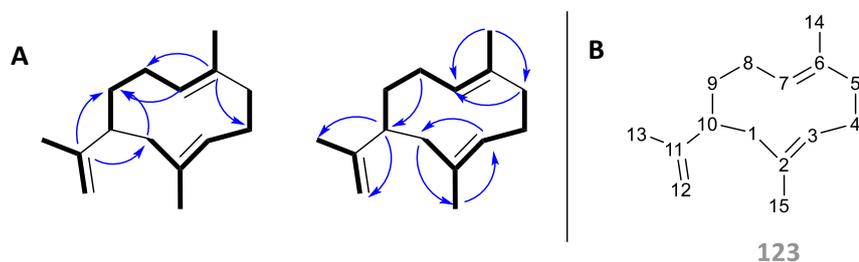


Abbildung 51: Strukturaufklärung der Verbindung **123** am Beispiel des Hauptkonformers. **A:** Durch das COSY Spektrum und skalare Kopplungen im ¹H-NMR Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dicke**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **123** erfolgte entsprechend des eingesetzten Substrats **111**.

Ein Vergleich des Grundgerüsts von **123** zeigte, dass mit Ausnahme der beiden verschobenen Methylgruppen, eine Übereinstimmung mit dem natürlich vorkommenden Germacren A (**62**) vorliegt (**Abbildung 52, A**). Die (*E,E*)-Germacrene weisen ein flexibles cyclodeca-1(10),4(5)-dien Ringsystem auf, weshalb sie als ineinander überführbare Konformationsisomere in Lösung existieren können.^[103,168] Während der Cyclodecandienkern über eine Flexibilität verfügt, ist die Konformation der Isopropenylgruppe in einer äquatorialen bzw. pseudo-äquatorialen Position dominierend.^[103,169] Eine axiale Orientierung ist hingegen aufgrund sterischer Faktoren energetisch ungünstig.^[154] Dadurch ergeben sich für Cyclodecadiene vier verschiedene Konformationen die als DD, UD, DU und UU¹⁷ bezeichnet werden. Die Konformationen werden dabei in eine parallele oder gekreuzte Beziehung der Doppelbindungen unterteilt (**Abbildung 52, B**).^[168] Durch Drehung der Doppelbindungen sowie einer Inversion des C7-C9-Segments können die Konformere ineinander überführt werden.^[100] Breite Signale in der NMR-Spektroskopie sind bereits ein Indiz für ein konformatives Gleichgewicht in Lösung. Durch eine Senkung der Temperatur wird die Rotation der Konformere verlangsamt, sodass gut voneinander getrennte Signalsätze der einzelnen Konformere erhalten werden können.^[168]

¹⁷ In Bezug auf die Orientierung der an die Doppelbindung gebundenen Methylgruppen bezeichnet D = unten und U = oben.

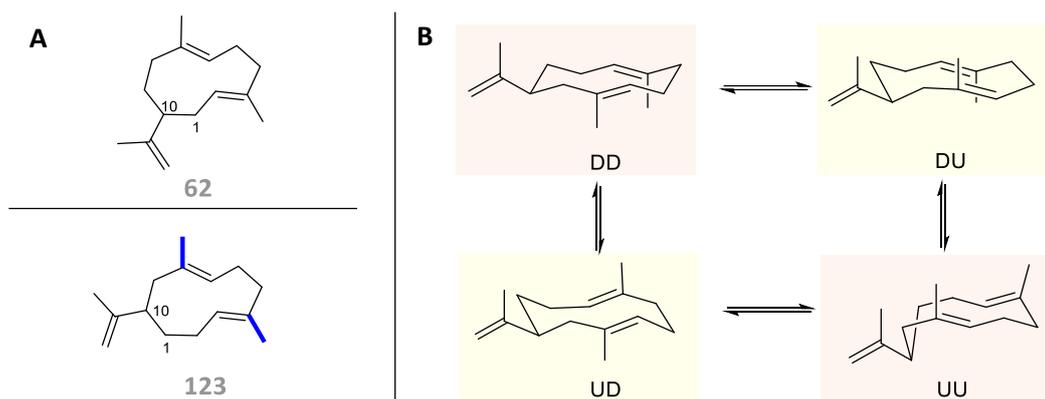


Abbildung 52: A: Vergleich des biotransformierten Produktes **123** mit dem natürlich vorkommenden Germacren A (**62**). B: Mögliche Konformationen DD, DU, UD und UU des Produktes **123**. In gelb hinterlegt sind die parallelen Konformationen und in orange hinterlegt die gekreuzten Konformationen ersichtlich.

Für das (*E,E*)-Germacren A (**62**) wurden bereits drei ineinander überführbare Konformere mit einem Verhältnis von 5: 3: 2 bei Raumtemperatur bestimmt, wobei der Anteil an parallelen und gekreuzter Konformationen nahezu gleich verteilt ist.^[168] Die Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffatome zu den jeweiligen Konformeren gelang DICKSCHAT durch die Verwendung von ¹³C-markierten Isotopomeren.^[170] Auch für methylierte und fluorierte Germacren A Derivate wurde das Vorliegen verschiedenster Konformationen in Lösung nachgewiesen.^[97,100,104,171] Eine Untersuchung der Konformationsdynamik des (*E,E*)-Germacradien-6-ols zeigte, dass auch dieses Molekül in Form von zwei Konformeren vorliegt.^[172] Das (*E,Z*)-konfigurierte Helminthogermacren A tritt hingegen nur in einer bevorzugten Konformation auf.^[103,173]

Zur Bestimmung der vorliegenden Konformationen der Verbindung **123** wurden 1-D-NOE Experimente bei 255 K durchgeführt. Die Auswertung wurde teilweise dadurch erschwert, dass trotz eigenständiger Signalsätze, weiterhin eine langsame Rotation beobachtet werden konnte, die zu einem konformationsübergreifenden Sättigungstransfer führte. Dies konnte allerdings genutzt werden, um die weniger populierten Konformere **123b** und **123c** eindeutig zu verifizieren.^[168] Die relative Orientierung des Protons an der Position 10 wurde von dem thermischen Produkt **122** übernommen, da das chirale Zentrum an der stattfindenden Umlagerung nicht beteiligt ist (s. Kap. 3.12.4). Durch die (pseudo-) äquatoriale Anordnung der ebenfalls an dem Kohlenstoffatom gebundenen Isopropenylgruppe, sollte das Proton H-10 zudem axial angeordnet sein. Bei dem Hauptkonformer **123a** kann neben weiteren Magnetisierungstransfers eine Wechselwirkung zwischen den Protonen H-10 und denen der Methylgruppe 15 beobachtet werden (**Abbildung 53, A**). Letztere weist zudem einen dipolaren Effekt mit der zweiten Methylgruppe 14 auf, sodass beide Methylgruppen in die gleiche Richtung weisen und zudem, wie das Proton H-10 orientiert sind. Dadurch konnte für das Hauptkonformer **123a** eine DD-Konformation ermittelt werden. Durch eine fehlende Kopplung der olefinischen Protonen H-3 und H-7 mit den gebundenen Methylgruppen handelt es sich um (*E*)-konfigurierte Doppelbindungen. Die Verbindung **123** kann daher als (*E,E*)-*iso*-Germacren A bezeichnet werden.

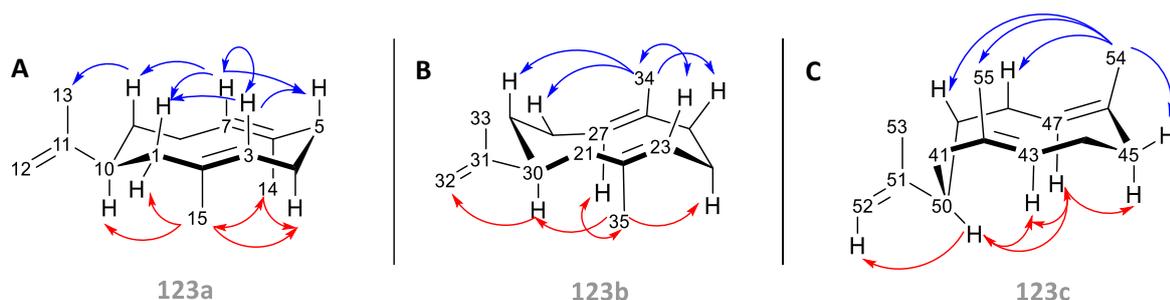
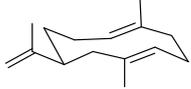
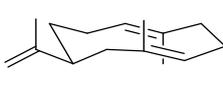


Abbildung 53: A: Ausgewählte 1D-NOE Magnetisierungstransfers für das DD-Hauptkonformer **123a**, B: 1D-NOE Wechselwirkungen des UD-Nebenkonformers **123b**, C: Magnetisierungstransfers zur Ermittlung der relativen Stereochemie des UU-Konformers **123c**. Die 1-D-NOE Messungen erfolgten in dem Lösemittel Toluol bei 255 K.

Bei dem Nebenkonformer **123b** konnten anhand der NOEs der Methylgruppen gezeigt werden, dass diese aufgrund eines fehlenden Magnetisierungstransfers untereinander in entgegengesetzte Richtungen weisen (**Abbildung 53, B**). Auch bei dem Nebenkonformer kann eindeutig eine (*E*)-Konfiguration der endozyklischen Doppelbindungen ermittelt werden. Eine entgegengesetzte Orientierung der Methylgruppen wird weiterhin dadurch unterstützt, dass diese jeweils mit dem gegenüberliegenden olefinischen Protonen dipolar koppeln. Da sowohl das olefinische Proton H-27 als auch die Methylgruppe 35 mit dem zuvor über das thermische Produkt festgelegten Proton H-30 einen Kopplungseffekt zeigen, weisen diese Gruppen in eine gemeinsame Richtung. Die Methylgruppe 34 weist hingegen dipolare Kopplungen mit den Protonen H-25, H-28 und H-29 auf, sodass diese Gruppe nach oben weist. Folglich verfügt das Konformer **123b** über eine parallele UD-Konformation. Für das weitere Nebenkonformer **123c** konnte erneut eine gekreuzte Konformation in Form einer UU-Anordnung der Methylgruppen bestimmt werden (**Abbildung 53, C**). Dies kann insbesondere durch die dipolare Wechselwirkung des festgelegten Protons H-50 mit den olefinischen Protonen H-43 und H-47 begründet werden, wodurch die Methylgruppen aufgrund der vorliegenden (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen in die entgegengesetzte Richtung weisen. Insgesamt konnten für die Verbindung **123** somit drei Konformere ermittelt werden, von denen zwei als gekreuzte (71.4 %) und eine als parallele (28.6 %) Konformation vorliegen. Im Gegensatz zur (*E,E*)-Germacren A (**62**) liegt somit keine Gleichverteilung der gekreuzten und parallelen Konformationen vor.

Die Präferenz für die ermittelten Konformationen wurden durch MM3-Kraftfeldberechnungen bei 300 K und 255 K überprüft.^[151] Diese erfolgten mit dem Programm SCHRÖDINGER unter Zuhilfenahme des MacroModels OPLS_2005 sowie einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 2.4 \text{ C}\cdot\text{Vm}^{-1}$ für das eingesetzte Lösemittel Toluol. Insgesamt konnten 33 Konformationen ermittelt werden, die auf 18.000 mögliche Besetzungszahlen verteilt wurden. Die 15 Konformationen mit der höchsten Besetzungswahrscheinlichkeit wurden anschließend den vier möglichen Grundkonformationen bei einer (pseudo)-äquatorialen Anordnung der *iso*-Propenylgruppe zugeordnet (**Tabelle 21**). Die Berechnung der Besetzungsanteile erfolgte anhand der Formel zur Berechnung der freien Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_r G^\ominus$) und Umstellung auf die thermodynamische Gleichgewichtskonstante *k* (s. Kap. 10.7.3).

Tabelle 21: Besetzungsverteilung [%] der möglichen vier Konformere des Produkts **123**. Die Berechnung erfolgte anhand von MM3-Kraftfeldberechnungen und einer Dielektrizitätskonstante von $2.4 \text{ C}\cdot\text{Vm}^{-1}$ für Toluol bei 300 K und 255 K.

				
	DD (123a)	UD (123b)	UU (123c)	DU
300 K	90.7 %	7.0 %	2.0 %	0.4 %
255 K	94.4 %	4.5 %	1.0 %	0.1 %

Hierbei zeigte sich, dass die Besetzungsverhältnisse bei der Berechnung deutlicher zugunsten des Hauptkonformers DD ausfallen und diese mit sinkender Temperatur weiter zunehmen. Hinsichtlich der Häufigkeit der Besetzungsverteilung, konnte eine Übereinstimmung mit den über NOE-Experimenten ermittelten Konformeren **123a** – **123c** festgestellt werden. So konnte in beiden Fällen das Konformer DD (**123a**) als Hauptkonformer bestätigt werden, während das zweithäufigste Konformer als UD (**123b**) identifiziert wurde. Das Konformer **123c** wurde wie bei den Kraftfeldberechnungen mittels NMR-Spektroskopie als dritthäufigstes Konformer bestimmt. Das Konformer DU mit der geringsten Besetzungswahrscheinlichkeit konnte über NMR-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden. In der nachfolgenden **Abbildung 54** sind die Grundkonformationen mit den höchsten Besetzungsanteilen aufgezeigt. Hierbei wurde neben der Orientierung der Methylgruppen auch die Positionierung der *iso*-Propenylgruppe mit einbezogen. Es zeigte sich, dass bezüglich der *iso*-Propenylgruppe die *exo*-Methylengruppe jeweils nach unten weist. Auch die vom thermischen Produkt **122** abgeleitete relative Konfiguration des Protons an C-10 wird durch die Kraftfeldberechnungen unterstützt.

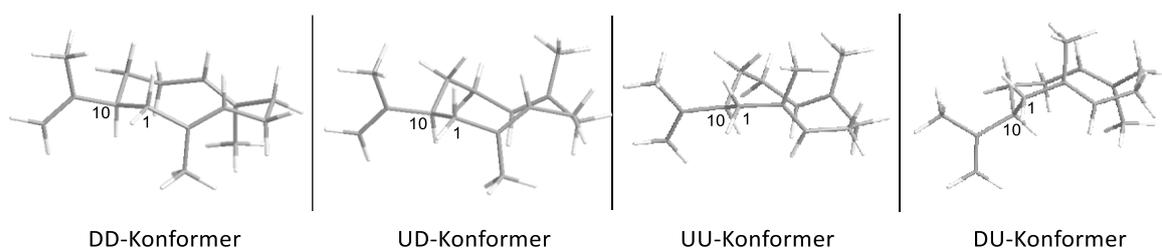


Abbildung 54: Mittels MM3-Kraftfeldberechnungen ermittelte Grundkonformationen (DD, UD, UU und DU) mit den jeweils höchsten Besetzungsanteil.

3.12.3 Isolierung und Strukturaufklärung des thermischen Produkts **122**

Die Isolierung des thermischen Produkts **122** erfolgte durch eine präparative GC mit Heißaufgabe. Dadurch konnte das biotransformierte Produkt **123** nahezu vollständig in das thermische Produkt **122** überführt werden. Anschließend wurde neben der analytischen Charakterisierung auch eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Hierbei konnten bereits anhand der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren drei *exo*-Methylengruppen bestätigt werden. Aufgrund des DBÄ verbleibt somit ein Äquivalent für einen Ringschluss. Des Weiteren konnten drei Methylgruppen sowie drei weitere aliphatische CH_2 -Gruppen und CH -Gruppen bestimmt werden. Zudem verfügt das Molekül über drei quartäre Kohlenstoffatome, von denen zwei anhand der chemischen

Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum den *exo*-Methylengruppen zugeordnet werden konnten. Die verbliebende *exo*-zyklische Doppelbindung wird zwischen einer Methylengruppe und einer tieffeldverschobenen CH-Gruppe ausgebildet. Anhand des COSY-Spektrums konnten erste Gerüstfragmente ermittelt werden. Zudem wurde anhand von $^4J(\text{H,H})$ -Kreuzkopplungen der olefinischen CH_2 -Gruppen nachgewiesen, dass die Methylgruppen 13 und 14 ebenfalls an die quartären Kohlenstoffatome der *exo*-Methylengruppen gebunden sind. Durch das HMBC-Spektrum konnten anhand von $^{2,3}J(\text{C,H})$ -Kopplungen die einzelnen Fragmentbausteine verknüpft und die quartären Kohlenstoffatome eindeutig zugeordnet werden (**Abbildung 55**).

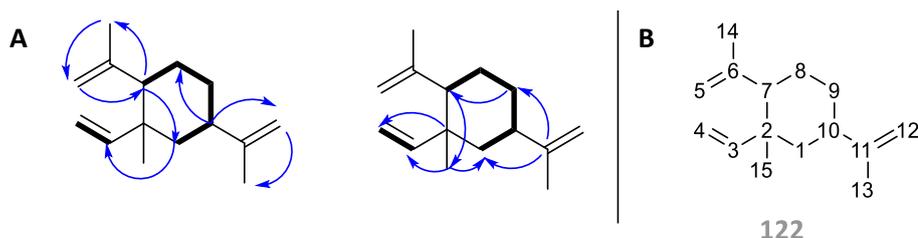


Abbildung 55: Strukturaufklärung der Verbindung **122**. **A:** Durch das COSY-Spektrum und skalare Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **122** erfolgte in Analogie zu dem biotransformierten Produkt **123**.

Aufgrund des vorliegenden Cyclohexanrings wurde die relative Stereochemie anhand des zweidimensionalen NOESY-Experiments und der skalaren Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum ermittelt (**Abbildung 56**). So zeigte sich bereits anhand einer skalaren Kopplung von 12.7 Hz, dass die Protonen H-1_{ax} , H-10 und H-9_{ax} axial zueinander angeordnet sind. Weiterhin wies das olefinische Proton H-3 mit den Protonen der *exo*-Methylengruppe H-4 skalare Kopplungen auf, wodurch H-3 und H-4_b *transoid* zueinanderstehen. Durch das NOESY konnte zudem nachgewiesen werden, dass alle drei Seitenketten in äquatorialer Position angeordnet sind, sodass sich eine energetisch günstige Konformation einstellt. Die ebenfalls an dem quartären Kohlenstoffatom (C-2) befindliche Methylgruppe 15 ist infolgedessen axial angeordnet. Da das Proton H-7 keinen Magnetisierungstransfer mit dem Proton H-10 zeigte, weisen die Protonen in entgegengesetzte Richtung. Die Methylgruppe 15 koppelt hingegen mit dem Proton H-10 , wodurch sich eine identische Orientierung ergibt. Dies wird zudem durch weitere dipolare Wechselwirkungen mit benachbarten Protonen unterstützt.

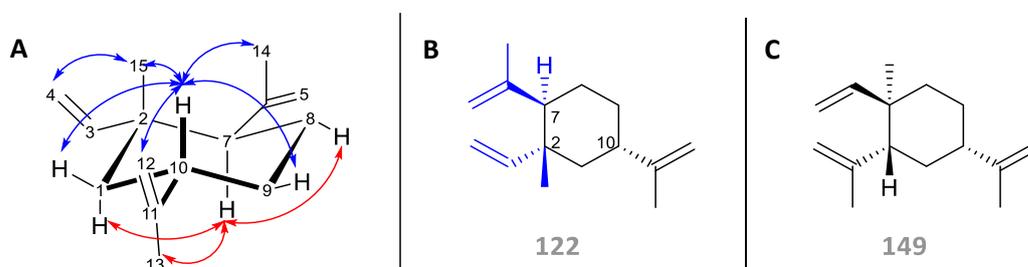
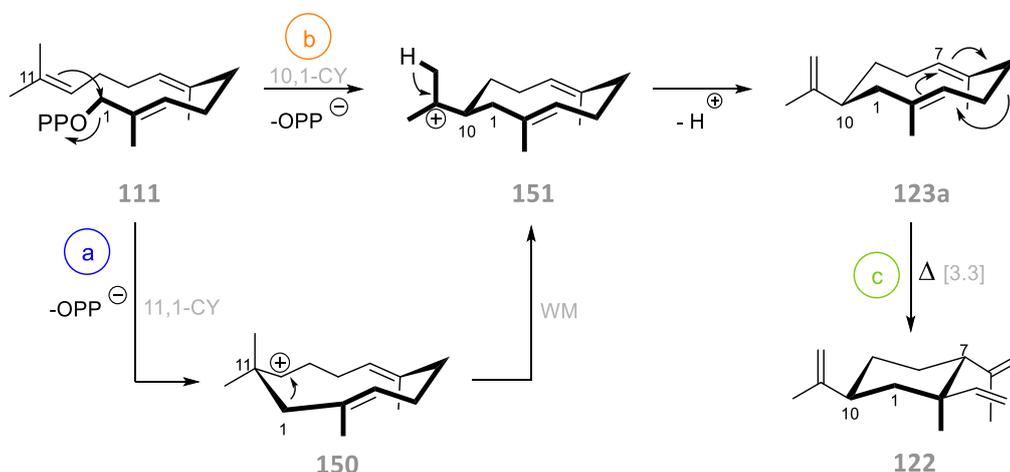


Abbildung 56: Aufklärung der relativen Stereochemie der Verbindung **122**. **A:** Ausgewählte 1D-NOE-Magnetisierungstransfers. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in Rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben. **B, C:** Resultierende relative Stereochemie für das thermische Produkt **122**. In blau gekennzeichnete Seitenkettenreste zeigen eine Abweichung zum natürlich vorkommenden β -Element (**149**).

Ein Vergleich mit den natürlich vorkommenden Terpenoiden zeigt, dass das thermische Produkt **122** eine strukturelle Ähnlichkeit zu β -Elemen (**149**) aufweist. Durch die verschobene zentrale und nahe des Diphosphatrests gelegene Methylgruppe sind die Seitenkettenreste an den Positionen C-2 und C-7 vertauscht, sodass die Verbindung **122** als *iso*- β -Elemen bezeichnet werden kann.

3.12.4 Postulierter Mechanismus zur Bildung der Produkte **122** und **123**

Die Biosynthese des Produkts **123** könnte auf zwei verschiedenen Reaktionspfaden (Schema 20, Weg a, b) ermöglicht werden. So kann in Analogie zum postulierten Reaktionsmechanismus des PSP (**29**) eine 11,1-Zyklisierung zum sekundären kationischen Intermediat **150** erfolgen. Ebenso wie bei dem Humulylkation (**18**) kann auch in diesem Fall das sekundäre Kation durch starke hyperkonjugative Wechselwirkungen stabilisiert werden.^[51] Eine anschließende WAGNER-MEERWEIN-Umlagerung zum Intermediat **151** sowie eine Deprotonierung zur Ausbildung der *exo*-Methylengruppe führen zum neutralen Produkt **123** (Weg a). Da bereits bei der Umsetzung des natürlichen FPP (**12**) als Nebenprodukt Germacren A (**62**) detektiert wurde, besitzt die STC BcBOT2 eine katalytische Promiskuität, die es dem Enzym ermöglicht einen weiteren Reaktionspfad in Form einer 10,1-Zyklisierung zu nutzen. Eine solche 10,1-Zyklisierung würde im Falle des unnatürlichen Produkts **111** direkt zum kationischen Intermediat **151** führen und wäre das erste Beispiel für ein unnatürliches Substrat das durch BcBOT2 in einen 10-gliedrigen Makrozyklus transformiert wird (Weg b).^[151] Sofern eine 10,1-Zyklisierung stattfindet, kann der Verschiebung der zentralen und der nahe des Diphosphatrests befindlichen Methylgruppe ein tiefgreifender Einfluss auf die Art der Zyklisierung zugeschrieben werden.^[151]



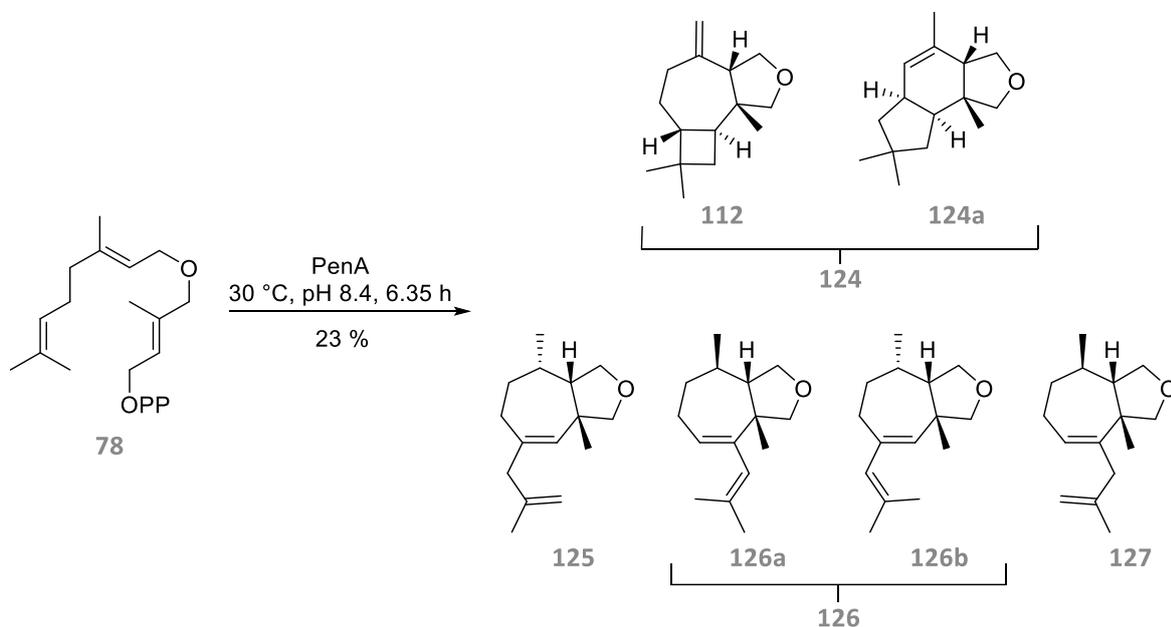
Schema 20: Postulierter Mechanismus zur Bildung des Produktes **123** aus dem unnatürlichen Derivat **111** durch Katalyse mit der STC BcBOT2. Neben einer 11,1-Zyklisierung (Weg a) ist ebenfalls eine 10,1-Zyklisierung (Weg b) denkbar. Ausgehend vom biotransformierten Produkt **123** findet durch thermische Belastung eine [3.3] sigmatrope COPE-Umlagerung zum thermischen Produkt statt (Weg c).

Die durch thermische Belastung induzierte Bildung des thermischen Produkts *iso*- β -Elemen (**122**) kann auf eine [3.3] sigmatrope COPE-Umlagerung (Schema 20, Weg c) zurückgeführt werden. Eine solche Umlagerung wurde bereits vielfach sowohl für (*E,E*)- als auch (*E,Z*)- Cyclodeca-1(10),4(5)-dien-Ringsysteme beschrieben.^[169,174] Die durch Hitze induzierte COPE-Umlagerung zeigt bei einer chromatographischen Analyse das für Germacrene charakteristischen scharfen Signal der von

einem breiteren Signal vorgelagert ist.^[103,154,169,174,175] Dieses Verhalten, wie es auch unter Kapitel 3.7.1 für die Produkte **122** und **123** beschrieben wurde, konnte erstmals 1987 von WICHTMAN und STAHL-BISKUP beobachtet werden.^[176] Die COPE-Umlagerung ist eine stereospezifische Reaktion, die über einen sesselartigen Übergangszustand verläuft.^[154] Im Falle des Germacren A (**62**) konnte durch stereospezifisch deuterierte Markierungsexperimente gezeigt werden, dass die Umlagerung über das Hauptkonformer erfolgt.^[170] Auch bei dem *iso*-Germacren A (**123**) geht die Bildung des einzigen *iso*- β -Elemen Diastereomers (**122**) aus der DD-Hauptkonformer (**123a**) des biotransformierten Produkts hervor. Da die Umlagerung zum *iso*- β -Elemen (**122**) mit einer Retention der Konfiguration an der Position 10 erfolgt, kann die relative Stereochemie auf das *iso*-Germacren A (**123**) übertragen werden. Daher wurde zur Überprüfung der Enantioselektivität der STC BcBOT2 eine Chromatographie des thermischen Produkts **122** mit einer chiralen heptakis(6*O*-TBDMS-2,3-di-*O*-methyl)- β -CD-Phase durchgeführt, mit der bereits erfolgreich die Enantiomere des β -Elemen (**149**) getrennt wurden.^[154] Hierbei wurde lediglich ein Signal erhalten, was auf die Anwesenheit eines Enantiomers hindeutet. Aufgrund der Stereospezifität der COPE-Umlagerung sollte folglich auch das *iso*-Germacren A (**123**) nur als ein Enantiomer gebildet worden sein, wodurch die Enantioselektivität der STC BcBOT2 unterstützt werden würde.

3.13 Semi-präparativer Ansatz der STC PenA mit dem unnatürlichen Substrat **78**

Das heteroatommodifizierte Substrat **78** wurde mit der STC PenA, in Analogie zur STC BcBOT2, in einem Fed-Batch Prozess mit kontinuierlicher Substratzugabe umgesetzt. Das Rohprodukt wurde als hellgelbe ölige Flüssigkeit in einer Ausbeute von 23 % erhalten (**Schema 21**).



Schema 21: Umsetzung des unnatürlichen Derivats **78** durch Katalyse mit der STC PenA zu dem biotransformierten Produkten **112** und **124-127**. Durch eine Rechromatographie mit polarer Trennsäule zeigte sich nach Isolierung der Verbindungen **124** und **126**, dass es sich jeweils um zwei Verbindungen (**112** und **124a** bzw. **126a** und **126b**) handelt, die auf einer unpolaren/ mittelpolaren Säule coeluierten (s. Kap. 3.13.1).

3.13.1 Analytische Charakterisierung und Isolierung der Produkte

Für die analytische Charakterisierung der Produkte wurde eine GC-MS-Analyse mit einer mittelpolaren DB5_{HT}-Säule durchgeführt, um die prozentualen Anteile der Verbindungen am Rohprodukt zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass die Verbindung **124** mit einem prozentualen Anteil von 19.7 % das Hauptprodukt darstellt. Die Verbindungen **125** und **127** sind mit Flächenanteilen von 16.9 % bzw. 15.7 % im Rohprodukt vertreten. Das Produkt **126** konnte hingegen mit einem prozentualen Anteil von 6.0 % nachgewiesen werden. Zur Isolierung der vier Verbindungen wurde anschließend eine pGC mit einer unpolaren Trennsäule durchgeführt. Die Anzahl der benötigten Injektionen für die Isolierung von 1 mg wurde dabei basierend auf den prozentualen Flächenanteilen der Verbindungen, der Massenkonzentration der Probelösung sowie dem Verlust durch den FID berechnet (**Gleichung 2**). Durch die Anpassung des Temperaturprogramms konnte dabei eine Trennung der Peaks bis zur Basislinie erzielt werden.

$$V = \#_{\text{Zyklen}} = \frac{1 \text{ mg}}{\beta \left[\frac{\text{mg}}{\mu\text{L}} \right] \cdot A[\%] \cdot (1 - \text{FID})}$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der notwendigen Injektionszyklen für die Isolierung von 1 mg Produkt. Das notwendige Volumen (V) der Probelösung zur Isolierung von 1 mg Produkt entspricht bei einem Injektionsvolumen von 1 μL der Anzahl an notwendigen Injektionszyklen ($\#_{\text{Zyklen}}$). Die Anzahl an Injektionszyklen ist reziprok abhängig von der Massenkonzentration β der eingesetzten Probelösung, dem prozentualen Flächenanteil A [%] der zu isolierenden Verbindung sowie dem Verlust durch den FID ($1 - \text{FID}$), der abhängig vom Trennsystem zwischen 10% - 30% liegen kann.

Die Rechromatographie der isolierten Fraktionen 1-4 erfolgte mittels zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität¹⁸. Bei der Verwendung einer unpolaren bzw. mittelpolaren stationären Phase konnten scharfe gaußförmige Peaks ohne Schulterausbildung detektiert werden, sodass die chromatographische Trennung zunächst nicht auf das Vorliegen mehrerer Verbindungen innerhalb einer Fraktion hindeutete. Erst durch die Nutzung der polaren stationären Phase wurde offenbart, dass die Fraktionen 1 und 3 jeweils zwei Verbindungen aufweisen (**112** und **124a** sowie **126a** und **126b**), die auf einer unpolaren und mittelpolaren Säule coeluierten (**Abbildung 57**).

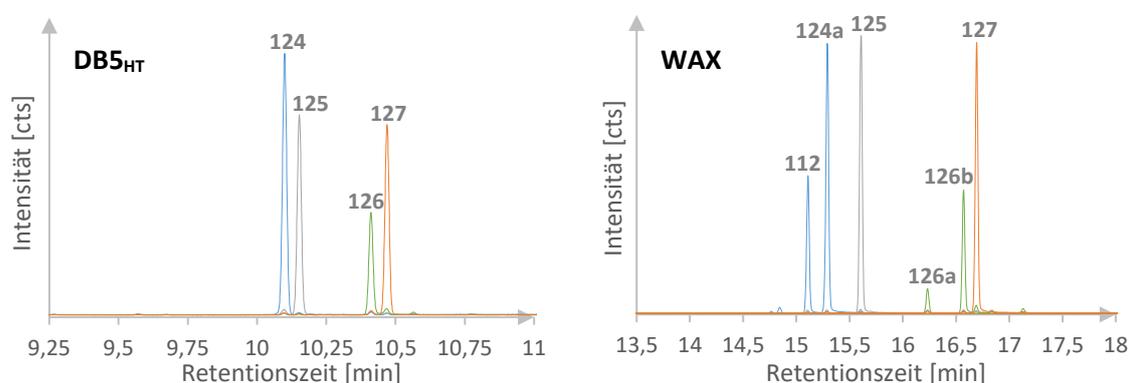
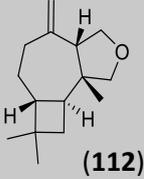
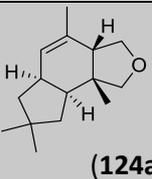
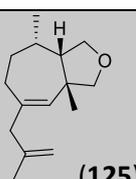
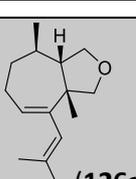
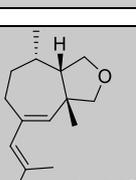
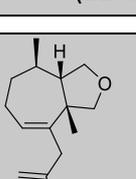


Abbildung 57: Chromatogramm der isolierten pGC-Fraktionen 1-4 auf einer DB5_{HT} (links) und einer polaren WAX-Trennsäule (rechts). Die Fraktionen sind farblich markiert (1: blau, 2: grau, 3: grün, 4: orange) und enthalten gemäß DB5_{HT}-Säule die vier zu isolierenden Verbindungen **124-127**. Erst mittels der polaren FFAP-Säule kann das Vorhandensein von jeweils zwei Verbindungen in den Fraktionen Fr. 1 und Fr.3 nachgewiesen werden.

¹⁸ Der Zugang zur polaren WAX-Trennsäule war erst nach Beendigung der pGC-Isolierung möglich.

Anhand der Rechromatographie konnten für die Verbindungen **112** sowie **124a-127** nach erfolgter Isolierung die in der **Tabelle 22** angegebenen Reinheiten ermittelt werden. Für die Produkte **112**, **124** sowie **126a** und **126b** sind aufgrund der Coelution die prozentualen Flächenanteile auf der polaren Trennsäule entscheidend. Dabei zeigte sich, dass die Produkte **124a** und **126b** als Hauptprodukte in der jeweiligen Fraktion klassifiziert werden können. Die Produkte **125** und **127** weisen durch die Isolierung Reinheiten oberhalb von 93% auf.

Tabelle 22: Retentionsindices, prozentuale Flächenanteile sowie hochaufgelöste Masse und sensorisches Profil der mittels pGC isolierten Verbindungen **112** und **124a-127**. Die Produkte **112** und **124a** sowie die Verbindungen **126a** und **126b** wurden aufgrund der Coelution mittels pGC zusammen in einer Fraktion isoliert. Die berechnete hochaufgelöste Masse beläuft sich bei allen sechs Konstitutionsisomeren auf $[M]^+ = 220.1827$.

 (112)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1586	93.1	1871	30.8
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1826 $[M]^+$	pfeffrig, campherartig, etherisch	
 (124a)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1586	93.1	1884	64.5
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1826 $[M]^+$	kein sensorisches Profil	
 (125)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1593	91.0	1908	93.5
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1828 $[M]^+$	leicht fruchtig	
 (126a)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1638	81.8	1958	15.0
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1828 $[M]^+$	kein sensorisches Profil	
 (126b)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1638	81.8	1985	73.1
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1828 $[M]^+$	kein sensorisches Profil	
 (127)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1649	92.0	1994	93.4
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	220.1827 $[M]^+$	kein sensorisches Profil	

Da bei der hochaufgelösten Masse ebenfalls ein unpolares Trennsystem vorgeschaltet ist, konnte diese nicht explizit einem der beiden coeluiierenden Konstitutionsisomeren zugeordnet werden. Eine GC-Olfaktometrie mittels polarer FFAP-Trennsäule konnte den pfeffrigen, campherartigen und

etherischen Geruchseindruck für die bereits unter 3.9 aufgeklärte Verbindung **122** bestätigt. Das Produkt **125** besitzt eine fruchtige Note, die allerdings nur gering ausgeprägt ist. Die weiteren Verbindungen **126a**, **126b** und **127** verfügen hingegen über kein sensorisch wahrnehmbares Profil.

3.13.2 Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen

Für die Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurden ein- und zweidimensionale NMR-spektroskopische Experimente durchgeführt. Anhand der Molpeaks von m/z 220 konnte für alle sechs Verbindungen eine Summenformel von $C_{15}H_{24}O$ nachgewiesen werden, sodass es sich bei den Verbindungen um Konstitutionsisomere handelt. Durch die Struktur des eingesetzten modifizierten Substrats **78** sollten die Produkte außerdem eine Etherfunktionalität aufweisen. Weitere funktionelle Gruppen können aufgrund der Molmasse ausgeschlossen werden.

Die Verbindung **112**, die bereits als Hauptprodukt bei der Biotransformation mit der STC BcBOT2 und dem unnatürlichen Substrat **78** aufgeklärt wurde, ist auch im Produktspektrum der STC PenA enthalten. Die Identifikation der Verbindung **112** als Bestandteil im Produktumfang der STC PenA erfolgte durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen in den 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren sowie den Multiplizitäten und skalaren Kopplungskonstanten. Das Vorliegen eines Diastereomers von **112** kann anhand der identischen Retentionsindices des Produktes bei Verwendung der beiden STCs BcBOT2 und PenA ausgeschlossen werden. Dies kann weiterhin durch 1D-NOE-Experimente belegt werden (**Abbildung 58**).

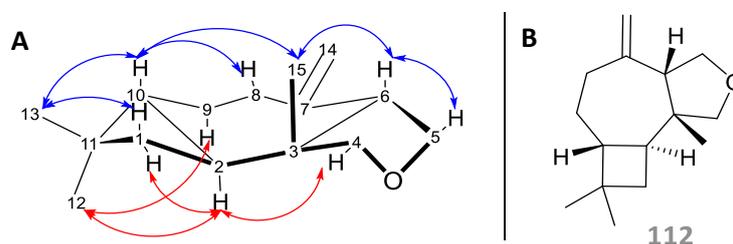


Abbildung 58: A: 1D-NOE Magnetisierungstransfers für das Produkt **112** aus der Biotransformation mit der STC PenA, B: relative Stereochemie der Verbindung **112**. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben.

Für die Verbindung **124a** konnte ein olefinisches Proton mit einer chemischen Verschiebung von $\delta(^1H) = 5.1$ ppm im 1H -NMR-Spektrum ermittelt werden. Das entsprechende quartäre Kohlenstoffatom, mit dem die endozyklische Doppelbindung ausgebildet wird, wurde anhand der Tieffeldverschiebung identifiziert. Infolgedessen verbleiben drei weitere Äquivalente für Ringschlüsse, sodass auch die Verbindung **124a** ein tricyclisches Kohlenstoffgerüst aufweist. Über DEPT 135- und ^{13}C -NMR-Spektren konnten insgesamt vier Methyl- und Methylengruppen sowie vier CH-Gruppen und drei quartäre Kohlenstoffatome bestimmt werden. Die Zuordnung der gebundenen Protonen erfolgte über das HSQC-Spektrum. Mittels des COSY-Spektrums wurden anschließend durch vorhandene Kreuzkopplungen zwei Grundgerüstbausteine identifiziert (**Abbildung 59**). Anhand einer *long-range* Kopplung zwischen den tieffeldverschobenen Protonen H-24 und H-25 konnte zudem die Etherfunktionalität nachgewiesen werden. Die an die quartären Kohlenstoffatome gebundenen Methylgruppen konnten ebenfalls bereits über $^4J(H,H)$ -

Kreuzkopplungen zugeordnet werden. Durch das HMBC-Spektrum wurden die Positionen der Methylgruppen verifiziert und das Kohlenstoffgerüst durch $^{2,3}J(\text{C,H})$ -Kopplungen vervollständig.

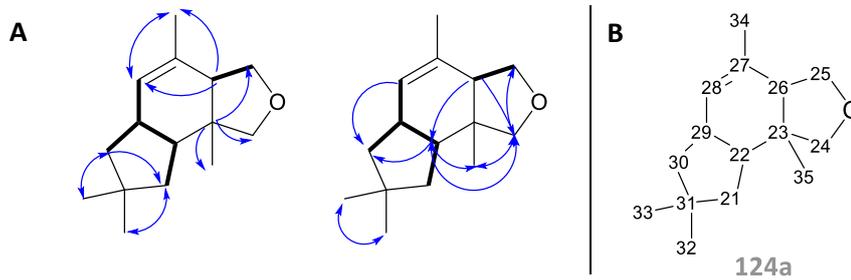


Abbildung 59: Strukturaufklärung der Verbindung **124a**. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **124a** erfolgte in Analogie zu dem biotransformierten Substrat **78**. Die Nummerierung beginnt mit der Nummer 21, da neben dem Produkt **124a** auch das Produkt **112** in der NMR-Probe enthalten ist.

Beobachtete Magnetisierungstransfers zwischen H-22 und H-29 sowie zwischen H-35 und H-26 ergeben eine *syn*-Anellierung des Cyclopentan- und Furanrings (**Abbildung 60**). Anhand von dipolaren Wechselwirkungen mit den benachbarten Protonen zeigte sich, dass die Protonen an der Cyclopentanverknüpfungsstelle in die entgegengesetzte Richtung wie das verbrückte Proton H-26 und die Methylgruppe 35 weisen. Durch einen Magnetisierungstransfer von H-28 auf die Methylgruppe 34 wurde zudem die *cis*-Konfiguration der Doppelbindung aufgeklärt. Die Orientierung der Methylgruppen an C-31 konnte zudem durch Wechselwirkungen mit den verbrückten Protonen H-22 und H-29 festgelegt werden.

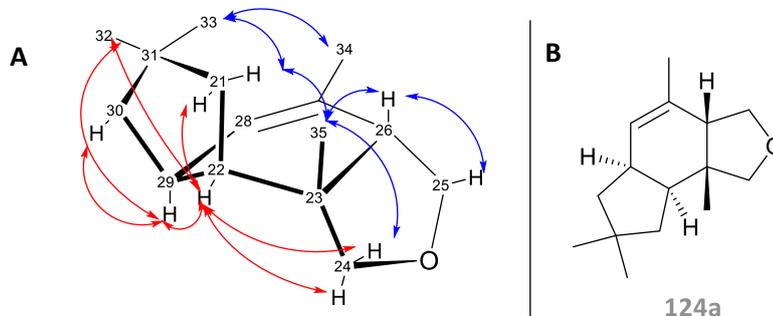


Abbildung 60: **A:** 1D-NOE Magnetisierungstransfers für das Produkt **124a**, **B:** Relative Stereochemie der Verbindung **124a**. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben.

Für das Produkt **125** konnten über das HSQC-Spektrum insgesamt drei Methylgruppen, sechs Methylengruppen, drei CH-Gruppen und ebenfalls drei quaternäre Kohlenstoffatome identifiziert werden. Durch die Tieffeldverschiebung zweier Methylengruppen, wurde zudem die aus dem Substrat **78** stammende Etherfunktionalität im Molekül nachgewiesen, sodass die postulierte Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ bestätigt werden konnte. Durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurden weiterhin drei olefinische Protonen verifiziert, von denen zwei einer *exo*-Methylengruppe zugeordnet werden konnten. Dies wird zudem durch eine chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 112.3$ ppm für die CH_2 -Gruppe belegt. Das weitere olefinische Proton ist Teil einer endozyklischen Doppelbindung, die ebenfalls zusammen mit einem quartären Kohlenstoffatom ausgebildet wird, welches dadurch eine Tieffeldverschiebung erfährt. In Bezug auf das DBÄ sollte

das Molekül dementsprechend über ein bicyclisches Ringsystem verfügen. Anhand des COSY-Spektrums wurden zudem erste Gerüstbausteine des Moleküls **125** erfasst, die anschließend über das HMBC-Spektrum erfolgreich verknüpft wurden und zu der Strukturformel in **Abbildung 61** führte.

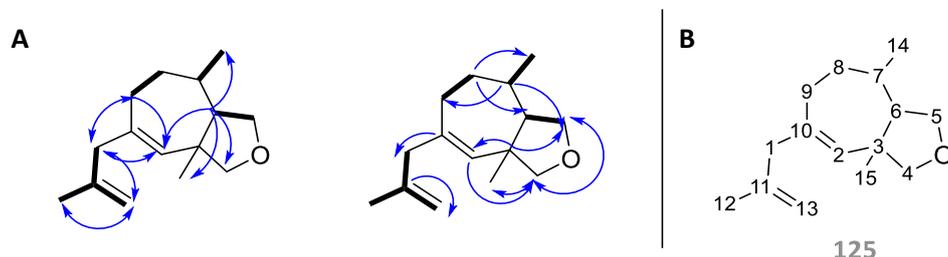


Abbildung 61: Strukturaufklärung der Verbindung **125**. **A:** Durch das COSY-Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Verbindung **125** erfolgte in Analogie zu dem biotransformierten Substrat **78**.

Die relative Stereochemie der Verbindung erfolgte anhand ausgewählter 1D-NOE Experimente. Magnetisierungsübertragungen von H-14 zu den Protonen der Methylengruppen C-5 und C-8 deuten darauf hin, dass sich die Methylgruppe 14 unterhalb der Molekülebene befindet (**Abbildung 62**). Die Methylgruppe 15 sowie das Proton H-6 weisen aufgrund von benachbarten Magnetisierungen in die entgegengesetzte Richtung. Durch eine direkte dipolare Wechselwirkung der Methylgruppe 15 mit dem Proton H-6 wird die *syn*-Verknüpfung des Furanrings nochmals bestätigt. Ein Magnetisierungstransfer zwischen dem olefinischen Proton H-2 und der Methylgruppe C-1 führt zudem zu einer (*Z*)-Konfiguration der endozyklischen Doppelbindung.

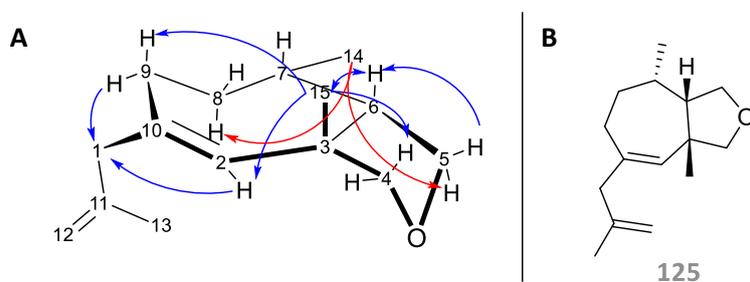


Abbildung 62: **A:** Ausgewählte 1D-NOE Magnetisierungstransfers für das Produkt **125**, **B:** resultierende relative Stereochemie der Verbindung **125**. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben.

Für das Produkt **126a** konnten anhand des HSQC-Spektrums jeweils vier Methyl-, Methylene- und CH-Gruppen identifiziert werden. Aufgrund des geringeren prozentualen Anteils (15 %) der Verbindung **126a** in der NMR-Probelösung, welche zudem auch das Produkt **126b** enthielt, waren die quaternären Kohlenstoffatome nicht im ^{13}C -NMR Spektrum nachweisbar. Allerdings wurden diese eindeutig durch Kopplungen im HMBC-Spektrum verifiziert, sodass deren Anzahl auf drei festgelegt werden konnte. Die Anzahl der bestätigten Kohlenstoffatome steht damit im Einklang mit der postulierten Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$. Die Etherfunktionalität konnte erneut durch eine Tieffeldverschiebung der direkt gebundenen Methylengruppen belegt werden. Zudem konnten zwei olefinische Protonen ermittelt werden, die unter Einbezug des ^{13}C -NMR Spektrums jeweils eine

Doppelbindung mit einem quartären Kohlenstoffatom ausbilden. Folglich handelt es sich bei dem Molekül **126a** ebenfalls um ein bicyklisches Ringsystem. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum wurden anhand der skalaren Kopplungskonstanten zudem $^4J(\text{H,H})$ -Kopplungen der gebundenen Methylgruppen festgestellt. Zusammen mit dem COSY-Spektrum wurden zwei Fragmentbausteine aufgeklärt, die durch Kopplungen im HMBC-Spektrum miteinander verknüpft wurden (**Abbildung 63**).

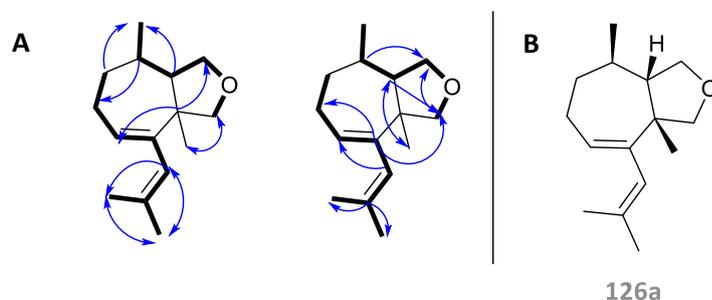


Abbildung 63: Strukturaufklärung des Nebenprodukts **126a**. **A:** Durch das COSY-Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**) zur Verknüpfung, **B:** Strukturformel der Verbindung **126a**. Die relative Stereochemie wurde aus dem postulierten Biosyntheseweg für die Bildung von **126a** sowie der relativen Stereochemie von **127** abgeleitet.

Infolge der geringen Produktmenge von **126a** konnte die relative Stereochemie nicht über NMR-Experimente bestimmt werden. Stattdessen erfolgte die Ermittlung auf Grundlage des isolierten Produkts **127** sowie den postulierten Biosynthesewegen, sodass die relative Stereochemie des Produkts **126a** in diesem Zusammenhang erst in Kapitel 3.13.3 näher erläutert wird.

Bei der Strukturaufklärung der Verbindung **126b** zeigte sich, dass dieses ein nahezu identisches Grundgerüst aufweist wie das Produkt **125**. Der entscheidende Unterschied ist die nicht vorhandene *exo*-Methylengruppe. Stattdessen weist das Produkt **126b**, wie das Produkt **126a**, eine olefinische Doppelbindung in der Seitenkette auf. Dadurch liegt ein konjugiertes System vor, was zu ausgeprägten *long-range* Kreuzkopplungen im COSY-Spektrum führt. So konnten Kreuzkopplungen der Methylgruppen 12 und 13 mit dem olefinischen Protonen H-2 und H-1 beobachtet werden, wodurch die Seitenkette der Verbindung eindeutig aufgeklärt werden konnte. Weiterhin konnte anhand von $^3J(\text{H,H})$ -Kreuzkopplungen ein weiterer Gerüstbaustein identifiziert werden, der sich von H-5 über H-7 bis zu H-9 erstreckt. Durch das HMBC-Spektrum erfolgte anschließend die Verknüpfung der beiden Fragmente (**Abbildung 64**).

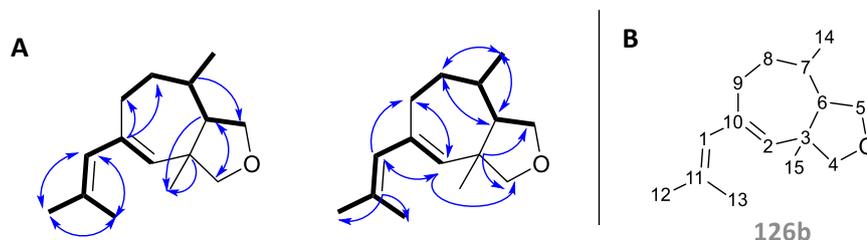


Abbildung 64: Strukturaufklärung der Verbindung **126b**. **A:** Durch das COSY-Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC-Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum eingesetzten unnatürlichen Substrat **78**.

Ausgewählte 1D-NOE Experimente führten zu der relativen Stereochemie in **Abbildung 65**. Ein Vergleich mit dem Produkt **125** zeigte, dass beide Produkte eine identische Stereochemie aufweisen. Dies steht auch im Einklang mit dem postulierten Biosyntheseweg der Verbindungen (s. Kap. 3.13.3), der sich lediglich durch die Position der finalen Deprotonierung unterscheidet. Auch für **126b** kann erneut eine *syn*-Anellierung des Furanrings aufgrund eines Magnetisierungstrfers zwischen H-15 und H-6 festgestellt werden sowie eine unterschiedliche Orientierung der Methylgruppen 14 und 15 durch dipolare Kopplung mit den benachbarten Protonen. Auch die *cis*-Konfiguration der Doppelbindung von **126b** kann in Analogie zu **125** durch einen Magnetisierungstrfer der olefinischen Protonen H-2 und H-1 bestätigt werden.

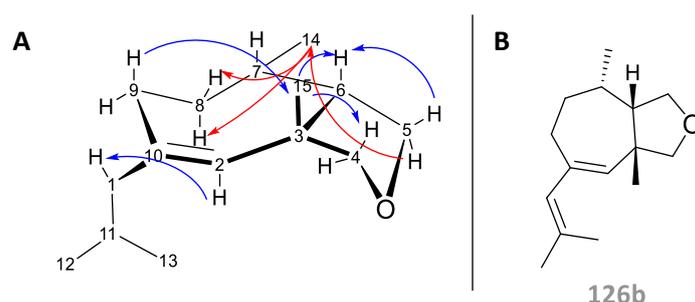


Abbildung 65: A: Ausgewählte 1D-NOE Magnetisierungstrfers, B: Resultierende relative Stereochemie des Produkts **126b**. In blau (Pfeile) sind Trfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben.

Die Strukturaufklärung des Produkts **127** zeigte, dass dieses die gleichen Strukturmerkmale wie das Produkt **125** aufweist. So konnte erneut eine *exo*-Methylengruppe anhand der charakteristischen Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 113.2$ ppm identifiziert werden. Lediglich die Positionierung des 2-Methylallylrestes befindet sich in Analogie zum Produkt **126a** an der Position 2. Die weitere endozyklische Doppelbindung wurde durch eine Tieffeldverschiebung des olefinischen Protons H-10 und der beiden beteiligten Kohlenstoffatome nachgewiesen. Mittels COSY Spektrum konnten für die Verbindung **127** insgesamt drei Fragmentbausteine identifiziert werden, die durch $^2,3\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen im HMBC verknüpft wurden (**Abbildung 66**).

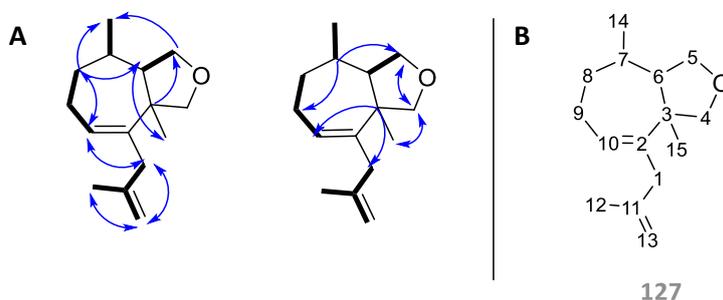


Abbildung 66: Strukturaufklärung des Produkts **127**. A: Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (dick) und Kopplungen im HMBC Spektrum (Pfeile), B: Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum eingesetzten unnatürlichen Substrat **78**.

1D-NOE Experimente von ausgewählten alleinstehenden Protonen offenbarten einen eindeutigen Magnetisierungstrfer zwischen dem Proton H-6 und den beiden benachbarten Methylgruppen 14 und 15, sodass diese in eine gemeinsame Richtung weisen (**Abbildung 67**). Dadurch konnte

erneut eine *syn*-Anellierung des Furanrings verifiziert werden. Die *cis*-Konfiguration wurde ebenfalls anhand dipolarer Kopplungen des olefinischen Protons H-10 mit den Protonen der Methylengruppe an Position 1 bestimmt.

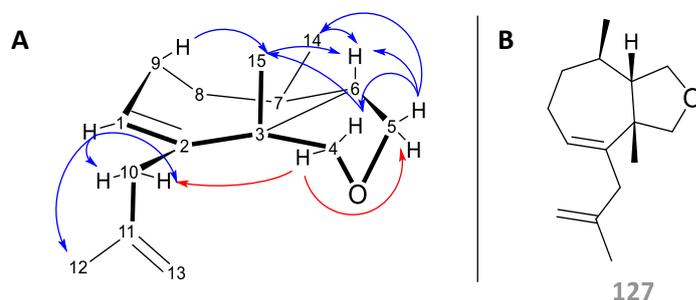


Abbildung 67: Ausgewählte 1D-NOE Magnetisierungstransfers der Verbindung **127**, **B:** resultierende relative Stereochemie des Produkts **127**. In blau (Pfeile) sind Transfers zwischen Protonen oberhalb und in rot (Pfeile) unterhalb der Molekülebene angegeben.

3.13.3 Postulierter Mechanismus zur Bildung der Produkte **112** und **124a-127**

Mechanistische Überlegungen zur Biosynthese der unnatürlichen Terpene **112** sowie **124a-127** offenbarten, dass ausschließlich das trizyklische Produkt **124a** in Analogie zu dem postulierten Mechanismus der PenA-Biosynthese gebildet werden könnte (**Schema 22**, Weg a). Nach einer 12,1-Zyklisierung und Abspaltung des Diphosphatrests zum Intermediat **131** schließt sich ein 1,2-Hydridshift zum hoch hyperkonjugierten sekundären Kation **153** an.^[48,72] In einer konzertierten Reaktion lagert sich dieses anschließend zum *oxa*-Protoilludylkation (**154**) um, welches vergleichbar dem Protoilludylkation (**39**) ist und als Schlüsselintermediat in der Biosynthese des Pentalenen fungiert (**Schema 22**, **B**). Eine Deprotonierung führt zur Beendigung der Reaktionskaskade und Ausbildung einer endozyklischen Doppelbindung, sodass das Terpenoid **124a** entsteht. Aufgrund des Verlaufs über das *oxa*-Protoilludylkation (**154**), weist das Molekül **124a** eine deutliche strukturelle Verwandtschaft mit dem Doppelbindungsisomer Δ^6 -Protoilluden (**40**) auf, dass im Rahmen von Mutagenesestudien als Nebenprodukt mit der Mutante H309A erzeugt wurde.^[73] Da sich die Bildung der Produkte **40** und **124a** lediglich durch die Position der finalen Deprotonierung unterscheiden, kann **124a** als ein weiterer Beleg für die PenA-Biosynthese über das Protoilludylkation (**39**) gewertet werden. Auch das natürlich vorkommende Δ^7 -Protoilluden (**152**), besitzt ein identisches Kohlenstoffgrundgerüst wie **124a** und wurde erstmals als Produkt zusammen mit Spuren von Pentalenen durch die Terpensynthase *DdTPS6* aus der sozialen Amöbe *Dictyostellium discoideum* gewonnen (**Abbildung 68**).^[177]

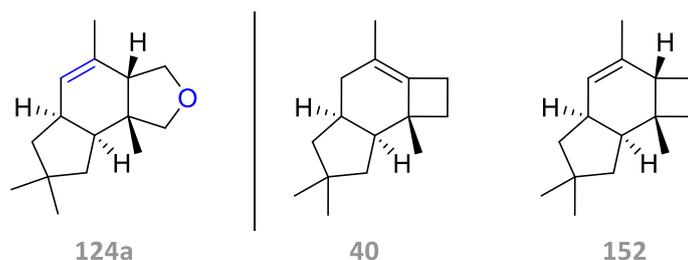


Abbildung 68: Produkt **124a** der Biotransformation der STC PenA mit dem unnatürlichen Substrat **78** sowie die strukturverwandten Produkte Δ^6 -Protoilluden (**40**) und Δ^7 -Protoilluden (**152**). Abweichungen von **124a** gegenüber den natürlich vorkommenden Produkten sind blau eingefärbt.

Die schon für die Biotransformation mit dem Substrat FPP (**12**) beobachtete katalytische und mechanistische Verwandtschaft der beiden STCn PenA und BcBOT2, kann auch bei der Umsetzung mit dem unnatürlichen Substrat **78** eindrucksvoll beobachtet werden. Im Gegensatz zu **124a** sollte die Bildung des Produkts **112** über den gleichen Mechanismus erfolgen, wie er bereits für die STC BcBOT2 und **78** beschrieben wurde (s. Kap. 3.9.2). Unterstützt wird dies durch die weiteren Verbindungen **125-127**, die ausgehend von der carbokationischen Kaskade des Produkts **112** gebildet werden könnten. Folglich besitzen die beiden STCn BcBOT2 und PenA die Möglichkeit einen identischen Reaktionspfad zu katalysieren. Dies ist umso bemerkenswerter, da die STCn lediglich über eine Sequenzhomogenität von 27 %¹⁹ verfügen und zudem bakteriellen bzw. pilzlichen Ursprungs sind. Ob der für die STC PenA typische oder der mit der STC BcBOT2 überstimmende Reaktionspfad katalysiert wird, hängt entscheidend von der nachfolgenden carbokationischen Kaskade des Intermediats **131** ab. Während ein 1,2-Hydridshift den Reaktionspfad zum Produkt **124a** eröffnet (Weg a), würde durch den nucleophilen Angriff der Doppelbindung die Reaktionskaskade auf den für die STC BcBOT2 typischen Reaktionsweg (Weg b) geleitet (**Schema 22, A**). Dementsprechend fungiert das Intermediat **131** als Schlüsselintermediat, an dem die bis dahin identisch verlaufenden Reaktionspfade zur Bildung der Produkte **112** und **124a-127** divergieren.

Ausgehend von dem Intermediat **131** würde, in Analogie zur Biosynthese des Enzyms BcBOT2 und dem Derivat **78**, das carbokationische Zwischenprodukt **132** durch einen nucleophilen Angriff der Doppelbindung ausgebildet. Mit Ausnahme des zusätzlichen Sauerstoffatoms zeigt **132** hierbei eine Übereinstimmung mit dem Intermediat **32** der Biosynthese von PSP (**29**) (**Schema 22, B**), wobei die Ausbildung eines Oxiran-1-ium-Kations (**132a**) zu einer anchimeren Stabilisierung beiträgt. Ein nachfolgender nucleophiler Angriff der verbliebenden Doppelbindung führt zum Intermediat **133**, aus dem durch Deprotonierung und Ausbildung der *exo*-Methylengruppe das Produkt **112** gebildet würde (**Schema 22, Weg c**).

Das Intermediat **133** ermöglicht der STC PenA zwei weitere Reaktionspfade, die zu den Produkten **125-127** führen könnten (**Schema 22, Weg d und e**). All diesen Verbindungen ist gemeinsam, dass sie über eine (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung verfügen sowie einen *syn*-anellierten Furanring. Weiterhin weisen die Produkte eine substituierte Methylgruppe am Cycloheptanring auf. Aufgrund

¹⁹ Zur Bestimmung der Sequenzidentität wurde das Programm BLAST verwendet.^[145,146]

der unterschiedlichen Orientierung der Methylgruppe in den beiden Produktpaaren **125/126b** und **126a/127** ist ein Wasserstofftransfer denkbar, der oberhalb oder unterhalb der Molekülebene erfolgen könnte. Dazu würden sich die Protonen des *anti*-fusionierten Cyclobutanrings im Intermediat **133** anbieten, deren relative Anordnung bereits durch das isolierte Produkt **112** belegt ist.²⁰ Ein α -seitiger Wasserstofftransfer würde dementsprechend zu dem Intermediat **155** führen, bei dem die Methylgruppe am Cycloheptanring β -orientiert ist (Weg d). Eine anschließende Umlagerung von **155** führt zum Cyclopropylmethylkation **156**. Eine Deprotonierung an einer der endständigen Methylgruppen (Weg d₁) führt zur Ausbildung einer *exo*-Methylengruppe und einer Cyclopropylringöffnung, sodass das Produkt **125** gebildet würde. Eine Deprotonierung an der Position 1 (Weg d₂) führt hingegen zur Bildung des Produkts **126b**. Erfolgt stattdessen ein β -seitiger Wasserstofftransfer (Weg e), so führt dies zum Intermediat **157** bei dem die Methylgruppe am Cycloheptanring α -orientiert wäre. Eine Deprotonierung an den endständigen Methylgruppen (Weg e₁) bzw. an der Position 1 (Weg e₂) führt nach Öffnung des Cyclobutylrings zur Bildung der Produkte **126a** und **127**. Da sich der postulierte Biosyntheseweg für die Produkte **126a** und **127** lediglich durch die Position der finalen Deprotonierung unterscheidet, sollte das Produkt **126a** über eine identische relative Stereochemie wie **127** verfügen. Dies würde zudem im Einklang mit dem Produktpaar **125/126b** stehen. Erstaunlicherweise konnten keine natürlich vorkommenden Sesquiterpene mit einem vergleichbaren Grundgerüst (**Abbildung 69**) gefunden werden, sodass die Produkte **125-127** durch eine neue Variante der carbokationischen Reaktionskaskade gebildet worden sind.

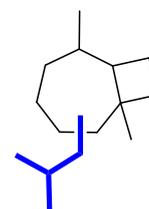
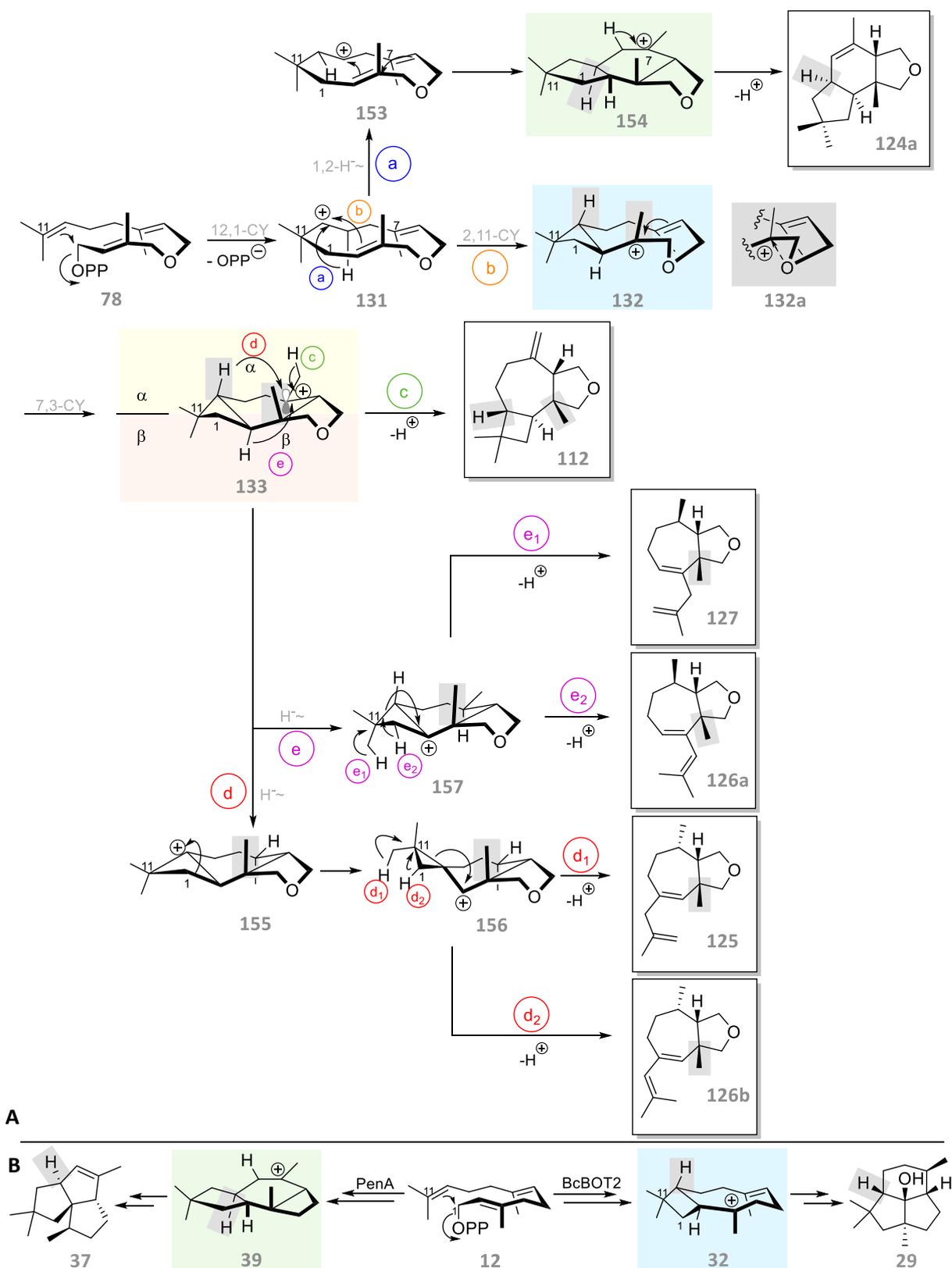


Abbildung 69: Grundgerüst der Produkte **125-127** ohne das zusätzliche Sauerstoffatom und der substituierten Seitenkette.

Die Bildung der Produkte **125-127** konnte im Produktspektrum der STC BcBOT2 mit dem Derivat **78** nicht nachgewiesen werden, sodass PenA die Reaktionspfade **e** und **d** exklusiv katalysiert (**Schema 22**). Da die Reaktionswege durch einen Wasserstofftransfer initiiert werden, sollte PenA im Gegensatz zu BcBOT2 über eine basische Spezies innerhalb der aktiven Tasche verfügen, die den Transfer begünstigt. Die aktive Tasche der STC PenA wurde bereits ausgiebig durch ortsspezifische Mutagenesestudien untersucht. Dabei konnten sowohl H309 als auch W308 als potentielle Basen ausgeschlossen werden.^[73,78] Stattdessen wird angenommen, dass entweder gebundenes Wasser in der aktiven Tasche, die Carbonylgruppen des Peptidrückgrads oder das fest gebundene Diphosphat als Base agieren.^[73,78] Da die Nucleophilie des Wassers ebenfalls zur Bildung von alkoholischen Nebenprodukten führen sollte und diese nicht im Produktspektrum ersichtlich sind, erscheint Wasser als potentielle Base unwahrscheinlich. Kristallstrukturen der STC PenA mit dem unnatürlichen Substrat **78** in der geschlossenen Konformation könnten weitere Hinweise auf eine mögliche Basenaktivität des Diphosphats oder einer AS-Seitenkette der aktiven Tasche liefern.

²⁰ Der Nachweis eines Wasserstofftransfers ober- oder unterhalb der Molekülebene sowie die Identifikation der beteiligten Wasserstoffe könnte durch deuterierte Isotopenmarkierungsstudien nachgewiesen werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden.



Schema 22: A: Postulierte Mechanismen für die Bildung der Produkte **112** sowie **124a-127** aus dem unnatürlichen Substrat **78** und enzymatischer Katalyse mit der STC PenA. **Weg a:** Bildung des Produkts **124a** über einen dem postulierten Biosyntheseweg der STC PenA identischen Reaktionsweg, **Weg b:** postulierter Mechanismus in Übereinstimmung mit der STC BcBOT2 zum Intermediat **133**, **Weg c:** Bildung von **112** durch finale Deprotonierung, **Weg d:** α -seitiger Wasserstofftransfer zu **155** und Bildung der Produkte **125** (Weg d_1) und **126b** (Weg d_2), **Weg e:** β -seitiger Wasserstofftransfer und Bildung der Produkte **127** (Weg e_1) und **126a** (Weg e_2). **B:** Biotransformation von PenA und BcBOT2 mit FPP (**12**) zu **37** und **29** sowie Angabe der relevanten Intermediate, die auch bei den unnatürlichen Substraten gebildet werden.

Mittels der 1D-NOE-Experimente konnte bereits die relative Konfiguration der Produkte aufgeklärt werden, während Informationen zur absoluten Stereochemie ungeklärt blieben. Abhilfe kann ein Vergleich mit den Biosynthesewegen des Pentalenen (**37**) und PSP (**29**) schaffen. Hierbei stehen stereogene Zentren im Fokus, die zu Beginn der Biotransformation gebildet wurden und unverändert im Produkt enthalten sind. Überlegungen zur absoluten Stereochemie des Produkts **112** wurden bereits eingehend in Kapitel 3.9.2 diskutiert. Diese basieren auf dem in **112** grau markierten Stereozentrum mit dem gebundenen Wasserstoff, welches durch die Bildung des Cyclobutylintermediats **132** gebildet wurde und unverändert im Produkt **112** vorliegt. Bei den Cycloheptafuranen **125-127** kann das stereogene Zentrum mit der substituierten Methylgruppe (grau markiert) am verbrückten Furanring zur Bestimmung der absoluten Stereochemie herangezogen werden. Durch einen weiteren Ringschluss der verbliebenden Doppelbindung im Intermediat **132**, wird das stereogene Zentrum ausgebildet, sodass **133** als Referenz verwendet werden kann. Da das besagte stereogene Zentrum ebenfalls im Produkt **112** enthalten ist und die Produkte alle ausgehend von dem Intermediat **133** gebildet wurden, sollte die Orientierung der Methylgruppe bei allen Produkten identisch sein. Im Falle der postulierten Biosynthese des Produkts **124a** handelt es sich bei **154** um ein strukturell eng verwandtes Intermediat des Protoilludylkations (**39**), das lediglich ein zusätzliches Sauerstoffatom im Grundgerüst aufweist. Zur Bestimmung der absoluten Stereochemie kann daher das in grau hinterlegte Stereozentrum genutzt werden, welches durch Ausbildung der Intermediate **39** bzw. **154** gebildet wird und auch in den Produkten **37** und **124a** unverändert wiederzufinden ist. Demzufolge sollte das grau markierte Stereozentrum in **124a** ebenfalls (*S*)-konfiguriert sein. Da zur Analyse der Verbindungen nur relative Methoden Anwendung fanden, kann das Vorliegen von Enantiomerenpaaren nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings konnte die Enantioselektivität der STCs PenA und BcBOT2 bereits für die Biotransformationen mit dem natürlichen Produkt FPP (**12**) bewiesen werden. Dazu wurde die absolute Stereochemie der Produkte **29** und **37** durch enantioselektive Totalsynthese^[63,68–70] sowie im Falle von PSP (**29**) zusätzlich durch säurekatalysierte Dehydratisierung zu (–)-Silphiperfol-6-en und Röntgenkristallographie^[62] aufgeklärt.

3.14 Chemische Derivatisierung des biotransformierten Produkts **112**

Die enzymatische Katalyse von unnatürlichen Substraten ermöglicht die Bildung neuer Terpenoide, die vor allem für die Aromen- und Duftstoffindustrie von Interesse sein können. Insbesondere oxyfunktionalisierte Terpene haben hierbei eine breite Anwendung als Duft- und Aromastoffe, da die Moleküle oftmals über ausgeprägte olfaktorische Eigenschaften verfügen.^[178] Mittels enzymatischer Katalyse können innerhalb kürzester Zeit komplexe zyklische Terpenkohlenwasserstoffe mit definierten Stereozentren generiert werden. Durch die Kombination von enzymatischer Katalyse und einer sich anschließenden chemischen Derivatisierung kann das Spektrum von stereochemisch und strukturell anspruchsvollen unnatürlichen Terpenen mit oxidierten Funktionalitäten weiter ausgebaut werden. Hierzu wurde das biotransformierte Produkt **112** ausgewählt, da dieses sowohl von der STC BcBOT2 als auch von PenA durch Umsetzung mit dem unnatürlichen Substrat **78** gebildet wird. Zudem weist dieses ein interessantes sensorisches

Profil auf, welches in Bezug auf die pfeffrige Note mit dem Naturstoff Rotundon vergleichbar ist.^[108] Durch gezielte chemische Derivatisierung in Form einer Semisynthese sollen oxidierte Funktionalitäten in das Molekül eingeführt werden und die neuen Produkte hinsichtlich olfaktorischer Eigenschaften untersucht werden.

Dazu wurde das Substrat **78** mit der STC BcBOT2 im semi-präparativen Maßstab umgesetzt, sodass insgesamt 93.1 mg Rohprodukt erzeugt wurden. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch mit *n*-Pentan/Diethylether gereinigt, wodurch 45.6 mg farbloses Produkt erhalten wurden. Eine gaschromatographische Analyse ergab, dass das enthaltene Nebenprodukt **113** aufgrund einer Coelution nicht von dem Produkt **112** getrennt werden konnte (**Abbildung 70**). Dennoch konnte der prozentuale Anteil der Verbindung **112** von 62.2 % auf 85.9 % gesteigert werden. Die restlichen 14.1 % entfallen auf das Nebenprodukt **113**, sodass weitere Verunreinigungen erfolgreich entfernt wurden. Auf einen weiteren Reinigungsschritt wurde aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Verbindung **112** verzichtet.

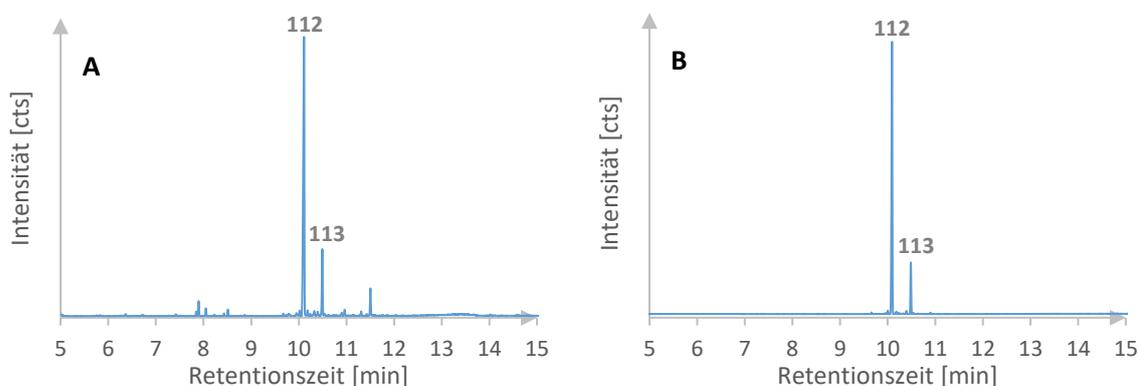
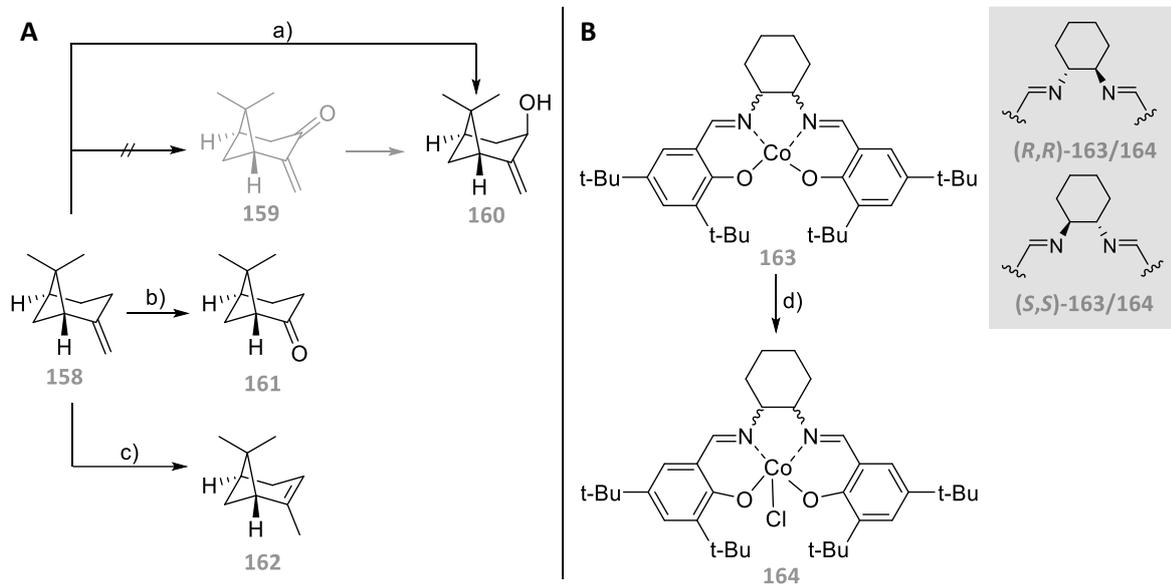


Abbildung 70: Chromatographische Analyse des Rohprodukts (A) aus der Biotransformation von **78** mit der STC BcBOT2 und nach säulenchromatographischer Reinigung (B).

3.14.1 Semi-synthetische Arbeiten mit (-)- β -Pinen (**158**)

Vor Beginn der eigentlichen Semisynthese mit dem trizyklischen Produkt **112**, wurden die geplanten Reaktionen anhand des kommerziell verfügbaren und strukturell verwandten (-)- β -Pinen (**158**) erprobt (**Schema 23**). Hierbei konnten für alle Umsetzungen akzeptable Produktausbeuten erzielt werden. So wurde das Produkt **160** durch RILEY-Oxidation mit einer Ausbeute von 63% dargestellt. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen sowie der Multiplizitäten und skalaren Kopplungskonstanten zeigte, dass anstelle des in der Literatur beschriebenen Pinocarvon (**159**),^[179,180] direkt das hydroxylierte Pinocarveol (**160**) gebildet wurde.^[181] Eine durchgeführte Ozonolyse führte zum Produkt (-)-Nopinon (**161**), welches in 75 % Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten wurde. Die Bestätigung des Produkts **161** erfolgte ferner durch einen Vergleich mit vorliegenden NMR-Daten aus der Literatur.^[182] Die Isomerisierung zu (-)- α -Pinen (**162**) erfolgte mit (*R,R*)-Co(salen, ^tBu ^tBu)Cl in einer Ausbeute von 48 %, während mit (*S,S*)-Co(salen, ^tBu ^tBu)Cl eine Ausbeute von 56 % erzielt werden konnte. Die Entfernung des Co-Katalysators gelang durch Säulenchromatographie.^[183] Eine Abtrennung des eingesetzten Edukts **158** konnte aufgrund einer Coelution nicht erzielt werden. Daher erfolgte die Ermittlung der

Ausbeute durch gaschromatographische Analyse. Dennoch konnte das Produkt **162** durch einen Vergleich mit NMR-Literaturdaten bestätigt werden.^[184] Die Herstellung der Co(salen, ^tBu ^tBu)Cl-Komplexe (**164**) erfolgte durch Oxidation von Co(salen ^tBu ^tBu) (**163**) mit pTsOH · H₂O.^[185–187] Hierbei wurde für (*R,R*)-**164** in einer Ausbeute von 73 % und für (*S,S*)-**164** in einer Ausbeute von 69 % erhalten.

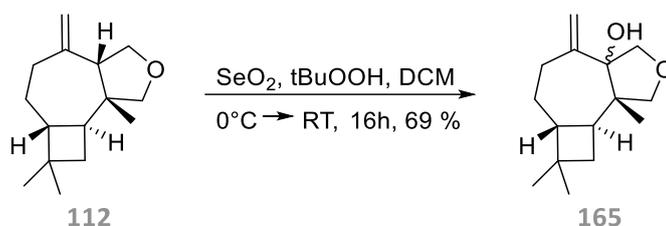


Schema 23: **A:** Semisynthetische Umsetzungen des Testedukts (–)- β -Pinen (**158**) zu (*E*)-Pinocarveol (**160**), (–)-Nopinon (**161**) und (–)- α -Pinen (**162**). **a)** Riley-Oxidation: SeO₂, tBuOOH, DCM, 0°C \rightarrow RT, 2.25 h, 63 %, **b)** Ozonolyse: O₃, DMS, MeOH, -78°C, 5 min, 75 %, **c)** Isomerisierung der terminalen Doppelbindung: (*R,R*)-**163**, PhSiH₃, C₆H₆, RT, 16h, 48 %, bzw. (*S,S*)-**163**, PhSiH₃, C₆H₆, RT, 16 h, 56 %. **B:** Oxidation von Co(salen ^tBu ^tBu) (**163**) zu Co(salen ^tBu ^tBu)Cl (**164**). **d)** pTsOH · H₂O, CH₂Cl₂, RT, 1.5 h, 73 %.

Nach erfolgreicher Anwendung der geplanten Semi-synthetischen Umsetzungen mit (–)- β -Pinen (**158**) wurden die Reaktionen auf das biotransformierte Produkt **112** übertragen.

3.14.2 Semi-synthetische Arbeiten mit dem biotransformierten Produkt **112**

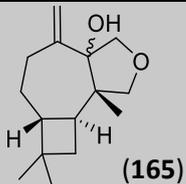
Ausgehend von dem biotransformierten Produkt **112** wurde neben einer RILEY-Oxidation, eine Ozonolyse mit anschließender Reduktion durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Isomerisierung der terminalen Doppelbindung durch Co(salen, ^tBu ^tBu)-Katalyse angestrebt. So resultierte eine RILEY Oxidation ausschließlich im Allylalkohol **165** in einer Ausbeute von 69 % (**Schema 24**). Interessanterweise, hat die Oxidation in diesem Fall am höher substituierten allylischen Kohlenstoffatom stattgefunden, während beim strukturell verwandten (–)- β -Pinen (**158**) die Oxidation an der weniger substituierten Methylengruppe erfolgte. Ursächlich könnte eine Ausrichtung der C-H-Bindung in *syn*-periplanarer Orientierung zur terminalen Doppelbindung sein, die durch die *syn*-Anellierung des Furanrings hervorgerufen wird. Dadurch wird der durch SHARPLESS postulierte Übergangszustand während der 2,3-sigmatropen Umlagerung erleichtert, weshalb die Anordnung zu einer Aktivierung der tertiären Position gegenüber der Methylengruppe führt.^[188]



Schema 24: RILEY Oxidation von **112** mit SeO_2 und tBuOOH in DCM zu dem hydroxylierten Produkt **165**.

Eine GC-MS Analyse diente zur Charakterisierung des Produkts (**Tabelle 23**). Hierbei zeigte sich, dass das Produkt mit einem nahezu identischen prozentualen Flächenanteil wie das eingesetzte Edukt **112** enthalten ist. Auch in oxidiert Form konnte das Produkt **165** nicht vollständig von dem Nebenprodukt **113** abgetrennt werden, welches in der RILEY Reaktion ebenfalls oxidiert wurde. Dies konnte anhand des Molpeaks sowie dem RI auf der polaren Trennsäule identifiziert werden. Eine Isolierung und Strukturaufklärung des entstandenen Nebenprodukts, war allerdings aufgrund einer zu geringen Produktmenge nicht möglich. Für das Hauptprodukt **165** wurde ein Molpeak von m/z 236 bestimmt, sodass eine Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ resultierte. Zusammen mit dem gesteigerten RI weist dies auf die Bildung eines hydroxylierten Produkts hin. Die Bildung von Diastereomeren konnte anhand des Chromatogramms ausgeschlossen werden. Eine olfaktorische Analyse ergab für das Produkt **165** keinen wahrnehmbaren Geruchseindruck.

Tabelle 23: GC-MS Analyse zur Charakterisierung des Oxidationsprodukts **165**. Neben den Retentionsindices (RI) zweier Trennsäulen unterschiedlicher Polarität ist der prozentuale Flächenanteil A[%] der Verbindung angegeben. Weiterhin ist der Molpeak (MP), der Basispeak (BP) sowie das charakteristische Fragmentierungsmuster (m/z) nach abnehmender Intensität aufgelistet.

 (165)	RI _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT}	RI _{WAX}	A[%] _{WAX}
		1757	86.4	2430
	MP	BP	m/z	
	236	137	69, 121, 109, 95, 81, 149, 177, 162	

Durch NMR-Experimente konnte anschließend die Struktur der Verbindung aufgeklärt werden. Im Vergleich zum Edukt **112** liegt hierbei eine Tieffeldverschiebung für das Kohlenstoffatom C-6 im ^{13}C -NMR Spektrum vor, sodass die Hydroxygruppe an dieses gebunden sein sollte. Dies wird zudem durch das Vorliegen eines zusätzlichen quartären Kohlenstoffatoms im Vergleich zu **112** bestätigt. Zudem wurde erneut eine *exo*-Methylengruppe durch die charakteristische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 113.8$ ppm nachgewiesen. Mit Hilfe des COSY- und HMBC-Spektrum wurde die Strukturformel der Verbindung anschließend vollständig aufgeklärt (**Abbildung 71**). Da das Proton des tertiären Alkohols im ^1H -NMR Spektrum sichtbar ist, wurde ein ROESY aufgenommen um die relative Stereochemie der Verbindung **165** an der Position C-6 zu bestimmen. SCHREINER konnte bereits anhand von quantenmechanischen Berechnungen zeigen, dass bei Perhydroazulenen eine *syn*-Anellierung des Cyclopentanrings als stabilstes Konformationsisomer fungiert, da eine *anti*-Verknüpfung der Ringsysteme zusätzlich mit einer *gauche*-Anordnung einhergeht.^[189] Eine Übertragung der Ergebnisse auf die Verbindung **165** würde eine *syn*-Anellierung des Furanrings

unterstützen, wie es auch beim eingesetzten Edukt **112** der Fall ist. Aufgrund fehlender Magnetisierungstransfers des Hydroxyprotons im ROESY und 1D-NOE konnte das Stereozentrum jedoch nicht aufgeklärt und die vermutete Verknüpfung des Furanrings nicht bestätigt werden. Die relative Stereochemie der weiteren stereogenen Zentren stimmt mit dem des Edukts **112** überein.

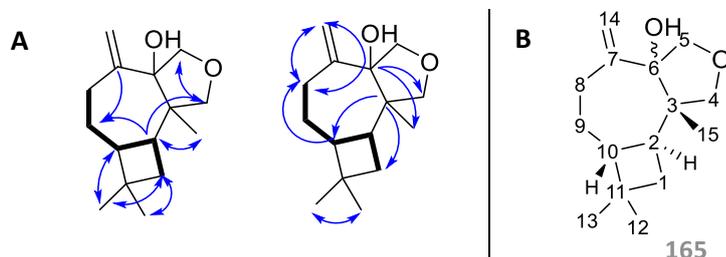
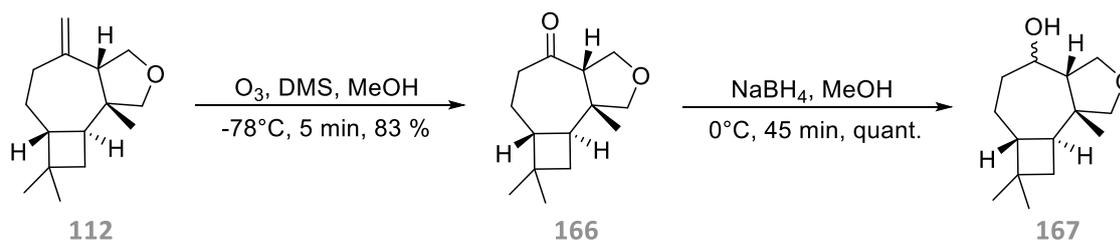


Abbildung 71: Strukturaufklärung des Produkts **165** der Riley Oxidation. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum eingesetzten unnatürlichen Substrat **78**.

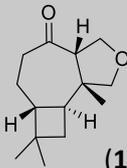
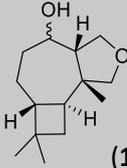
Durch Ozonolyse der Verbindung **112** wurde **166** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 83 % erhalten. Anschließend lieferte die Reduktion von **166** mit NaBH₄ den sekundären Alkohol **167** in quantitativer Ausbeute (**Schema 25**).^[190,191]



Schema 25: Ozonolyse von **112** in MeOH bei -78°C lieferte das Produkt **166** in 83 % Ausbeute. Eine anschließende Reduktion mit NaBH₄ führte zum sekundären Alkohol **167**.

Eine GC-MS Analyse der Verbindungen **166** und **167** zeigte, dass die beiden Produkte einen Molpeak von m/z 222 bzw. 224 aufweisen (**Tabelle 24**). Ersteres entspricht dem Verlust eines Kohlenstoffatoms bei gleichzeitiger Addition eines Sauerstoffatoms, während bei Letzterem die Reduktion der Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe mit einer Erhöhung der Molmasse um m/z 2 einhergeht. Die Steigerung der Polarität beginnend mit der olefinischen Doppelbindung bis zur Hydroxygruppe kann zudem anhand der polaren RI nachverfolgt werden. Eine olfaktorische Analyse zeigte, dass keine der beiden dargestellten Verbindungen **166** und **167** über einen Geruchseindruck verfügen.

Tabelle 24: GC-MS Analyse zur Charakterisierung des Ozonolyseprodukts **166** sowie dem Reduktionsprodukt **167**. Neben den Retentionsindices (RI) zweier Trennsäulen unterschiedlicher Polarität sind die prozentualen Flächenanteile A[%] der Verbindungen angegeben. Weiterhin sind der Molpeak (MP), der Basispeak (BP) sowie das charakteristische Fragmentierungsmuster (m/z) nach abnehmender Intensität aufgelistet.

 (166)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1700	86.7	2277	74.6
	MP	BP	m/z	
	222	139	121, 69, 107, 151, 165, 207, 179, 189	
 (167)	RI_{DB5HT}	A[%]_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}
	1725	88.3	2422	85.6
	MP	BP	m/z	
	224	149	109, 123, 135, 67, 191, 163, 177, 206	

Die Verbindungen konnten anhand von COSY- und HMBC-Experimenten aufgeklärt werden (**Abbildung 72**). Bei der Verbindung **166** konnte im Vergleich zum biotransformierten Produkt **112** der Verlust eines Kohlenstoffatoms und infolgedessen das Ausbleiben einer exozyklischen Doppelbindung bestätigt werden. Die stattdessen im Molekül **166** enthaltene Carbonylgruppe wurde durch die charakteristische chemische Verschiebung von $\delta(^{13}\text{C}) = 209.2$ ppm nachgewiesen. Nach erfolgter Reduktion konnte anhand der chemischen Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verlust der Carbonylgruppe und die Bildung der Hydroxygruppe bestätigt werden. Das Protonensignal des sekundären Alkohols ist im ^1H -NMR-Spektrum nicht ersichtlich. Da der Cycloheptanring überaus flexibel ist und zudem fünf verschiedene Konformationen einnehmen kann^[189], war eine Bestimmung des stereogenen Zentrums an C-7 anhand von Kern-OVERHAUSER-Effekten nicht möglich. Die weiteren Stereozentren in **166** und **167** stimmen hinsichtlich der relativen Stereochemie mit dem eingesetzten Edukt **112** überein, sodass auch diese Verbindungen über einen *syn*-anellierten Furanring und ein konvex-konkav ähnliches Grundgerüst verfügen. Zudem konnte eine durch die Reduktion hervorgerufene Bildung von Diastereomeren für die Verbindung **167** ausgeschlossen werden. Hinsichtlich der relativen Stereochemie und der Kernstruktur zeigt die Verbindung **167** mit Ausnahme des Sauerstoffatoms eine Übereinstimmung mit den epimeren 5,8-Cyclocaryophylen-4-olen **135a** und **135b** (s. Kap. 3.9.2).^[161]

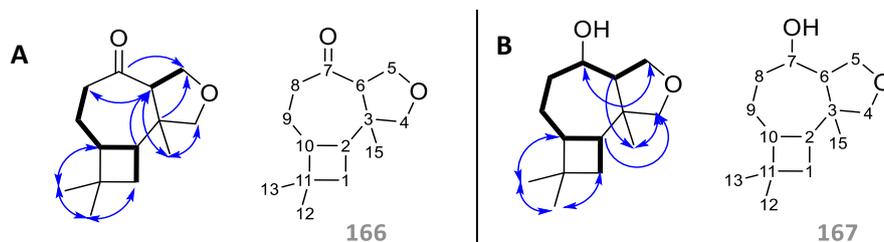


Abbildung 72: A: Strukturaufklärung der Verbindung **166** sowie Nummerierung entsprechend dem Edukt **112**. B: Strukturaufklärung des Reduktionsprodukts **167** und Nummerierung in Analogie zum eingesetzten Edukt **112**.

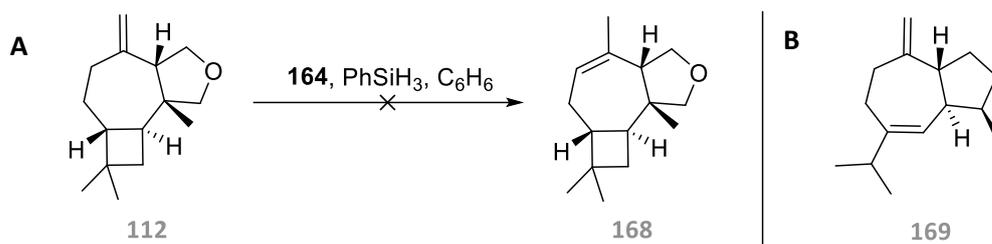
Für die Cobalt katalysierte Isomerisierung der exozyklischen Doppelbindung nach SHENVI^[185] (**Schema 26, A**) konnte trotz Variation der Reaktionsparameter kein Produktumsatz zu **168** mittels GC-MS und NMR-Spektroskopie identifiziert werden (**Tabelle 25**).

Tabelle 25: Bedingungen für die Isomerisierung der exozyklischen Doppelbindung nach SHENVI.

	164	PhSiH₃	LM	T [°C]	t [min]	Ergebnis
1	5.0 mol [%] ^A	5.0 mol [%]	C ₆ H ₆	RT	16 h	keine Umsetzung
2	5.0 mol [%] ^B	5.0 mol [%]	C ₆ H ₆	RT	16 h	keine Umsetzung
3	5.0 mol [%] ^A	5.0 mol [%]	C ₆ H ₆	50	3 h	keine Umsetzung
4	8.5 mol [%] ^A	8.5 mol [%]	C ₆ H ₆	40	18 h	keine Umsetzung
5	10.0 mol [%] ^B	5.0 mol [%]	C ₆ H ₆	RT	3 h	keine Umsetzung

^A (S,S)-**164**, ^B (R,R)-**164**

Eine sterische Hinderung des Edukts **112** sowie die Wahl des ebenfalls sterisch anspruchsvollen Katalysators könnte als Möglichkeit für die nicht stattfindende Isomerisierung in Betracht gezogen werden. Abhilfe könnte die Verwendung des achiralen Co(salen ^tBu ^tBu)Cl-Komplexes auf Basis des Salcomin schaffen, welches von SIEMON bereits erfolgreich für die Isomerisierung des strukturverwandten Sesquiterpens Guaia-6,10(14)-dien (**169**) verwendet wurde (**Schema 26, B**).^[183]



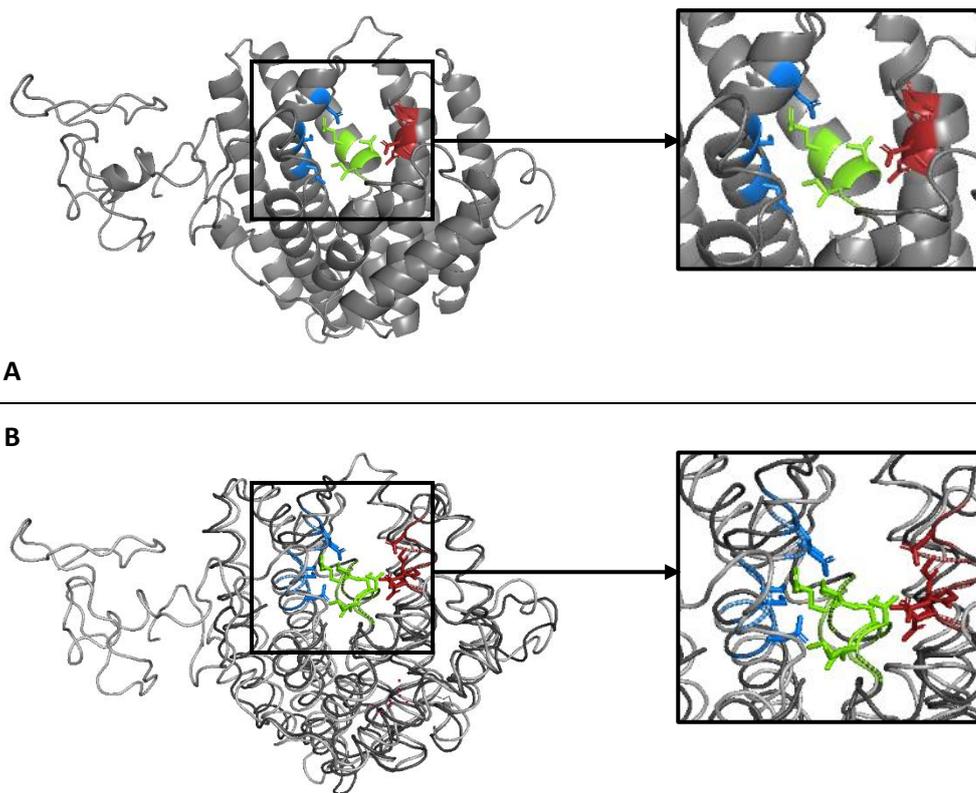
Schema 26: A: Isomerisierung der exozyklischen Doppelbindung nach SHENVI. B: Guaia-6,10(14)-dien.

3.15 Ortsspezifische Mutagenesestudien von BcBOT2

Mit Ausnahme der polaren Metallbindemotive, besteht die aktive Tasche der STCn größtenteils aus hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren.^[77] Neben der Stabilisierung der carbokationischen Zwischenprodukte, dienen die Seitenkettenreste auch zur Kontur der aktiven Tasche und ermöglichen eine exakte Faltung und Konformation des Substrats.^[15,29,192] Die Anwendung der ortsspezifischen Mutagenese ermöglicht die Identifikation von katalytisch essentiellen Aminosäuren im aktiven Zentrum.^[44,45] Durch den Austausch von definierten Aminosäuren können alternative Substratfaltungen induziert werden, die neue Reaktionspfade innerhalb der Reaktionskaskade ermöglichen und zur Bildung neuer Verbindungen führen.^[47,73,192] Durch die Isolierung und Strukturaufklärung der gebildeten Verbindungen können Rückschlüsse auf die Funktion der punktmultierten Aminosäure gezogen werden.

3.15.1 Bioinformatische Analyse von BcBOT2

Da von der STC BcBOT2 keine Kristallstruktur bekannt ist, wurde zunächst mit Phyre2 ein Homologiemodell erstellt und anhand dessen und unter Einbezug der NCBI Datenbank die hochkonservierten Metallbindemotive und die Effektortriade identifiziert (**Abbildung 73, A**).^[193] Eine Überlagerung des BcBOT2-Homologiemodells mit der Kristallstruktur der STC PenA zeigte, dass trotz einer Sequenzidentität von lediglich 27 %²¹, eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der beiden STCn in Bezug auf die hochkonservierten Motive sowie des α -helikalen Bündels (**Abbildung 73, B**) gegeben ist. Auffällig ist zudem, dass sich das sonst übliche NSE/DTE-Metallbindemotiv im Falle der STC BcBOT2 aus der Konsensussequenz $N_{285}DVLS_{289}YRKD_{293}$ zusammensetzt.



STC	Metallbindemotive		Effektortriade		
	<i>DDXXD</i>	<i>NSE/DTE</i>	<i>Sensor</i>	<i>Linker</i>	<i>Effektor</i>
BcBOT2	D ₁₄₁ D ₁₄₂ QFD ₁₄₅	N ₂₈₅ S ₂₈₉ D ₂₉₃	R ₂₃₉	T ₂₄₂	I ₂₄₃
PenA	D ₈₀ D ₈₁ LFD ₈₄	N ₂₁₉ S ₂₂₃ E ₂₂₇	R ₁₇₃	T ₁₇₆	I ₁₇₇

Abbildung 73: A: Mittels Phyre2 erstelltes Homologiemodell für die STC BcBOT2 und identifizierte Metallbindemotive (DDxxD: rot, NSD: blau) sowie Effektortriade (grün). B: Überlagerung des Homologiemodells der STC BcBOT2 (hellgrau) mit der Kristallstruktur der bakteriellen STC PenA (dunkelgrau). In Vergrößerung sind die Metallbindemotive (DDxxD: rot, NSE_{PenA} bzw. NSD_{BcBOT2}: blau) und Effektortriaten (RTI: grün) der beiden STC hervorgehoben. Zusätzlich ist eine tabellarische Übersicht der hochkonservierten Motive für die STCs BcBOT2 und PenA angegeben.

²¹ Zur Bestimmung der Sequenzidentität wurde das Programm BLAST verwendet.^[145,146]

3.15.2 Auswahl an Mutationsstellen

Die Aminosäuren der aktiven Tasche dienen neben der Stabilisierung der carbokationischen Zwischenprodukte auch zur Konturierung des aktiven Zentrums, wodurch dieses als Templat für die exakten Konformationen von Substrat und reaktiven Zwischenprodukten agiert. Ausgehend vom eingesetzten natürlichen Vorläufer FPP (**12**) erfahren durchschnittlich zwei Drittel aller Kohlenstoffatome eine Hybridisierung oder eine chemische Bindungsänderung bis zur Freisetzung des enzymatischen Produkts.^[194] Hierbei interagieren ausgewählte Aminosäuren wie jene der Metallbindemotive oder der Effektortriade direkt mit dem Substrat, während andere für die Größe und Struktur der aktiven Tasche verantwortlich sind.^[15,19] Durch den Tausch ganzer Domänen gelang zudem bereits die Generierung von chimären Zyklus.^[195] Auch die ortsspezifische Mutagenese hat bereits vielfach gezeigt, dass vereinzelte Punktmutationen zu Veränderungen der promiskuen Enzymaktivität und anormalen Produktspektren führen können.^[196]

Insbesondere aromatischen Aminosäuren wird eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der carbokationischen Zwischenprodukte durch Kationen- π -Wechselwirkungen zugeschrieben.^[82] Aufgrund ihres Volumens sind sie zudem maßgeblich an der Kontur der aktiven Tasche und somit an der Faltung von Substrat und Zwischenprodukten beteiligt.^[44,84,86,192] Dass die Größe der aktiven Tasche einen entscheidenden Einfluss auf die Produktpromiskuität eines Enzyms nimmt, konnte bereits SCHMIDT-DANNERT anhand der Enzyme Cop4 und Cop6 aus *Coprinus cinereus* nachweisen.^[88] Auch für die δ -Selinen- und γ -Humulen-Multiproduktsynthesen, die 34 bzw. 52 verschiedene Sesquiterpene erzeugen, wird eine große und flexible aktive Tasche angenommen, wodurch unterschiedliche Konformationen und Stabilisierungsmöglichkeiten während der Zyklisierungskaskade ermöglicht werden.^[194,197,198] Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher ebenfalls drei Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese erzeugt, bei denen durch einen Seitenkettenaustausch die aktive Tasche vergrößert wurde, um so aus der spezifischen STC BcBOT2 eine Multiproduktsynthese zu erzeugen. So wurde bei den Mutanten F138V (**Abbildung 74**) und Y211S der aromatische Phenylring entfernt, sodass neben einer Taschenvergrößerung gleichzeitig auch die Kationen- π -Wechselwirkung zur Stabilisierung der carbokationischen Zwischenprodukte entfällt. Durch die fehlende elektrostatische Wechselwirkung ist zudem ein frühzeitiger Abbruch der Reaktionskaskade wahrscheinlich.^[199] Zusätzlich wurde mit der Mutante T282S eine Vergrößerung der aktiven Tasche unter Beibehaltung der polaren Funktionalität erzielt.

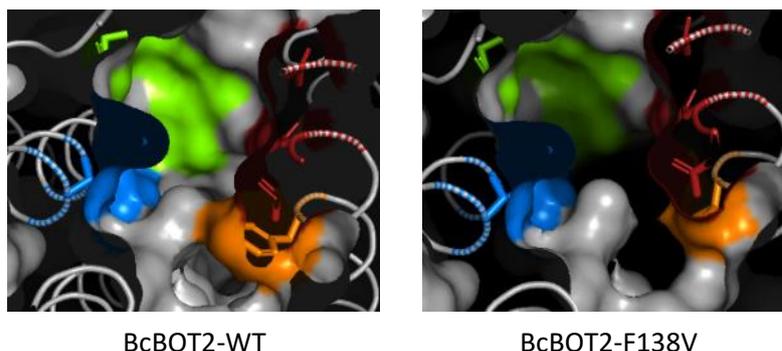


Abbildung 74: Einblick in das Homologiemodell (Oberflächendarstellung) von BcBOT2-WT (links) und BcBOT2-F138V (rechts). Die Metallbindemotive (DDxxD: rot, NSD: blau) und Effektortriade (RTI: grün) sind farblich markiert. Zudem ist die Aminosäure (orange) an der Mutationsstelle vor (F138) und nach (F138V) der Mutation gekennzeichnet. Durch den Austausch erfolgt eine Vergrößerung der aktiven Tasche.

Weiterhin wurden die Mutanten F138Y und Y211F hergestellt, mit denen die Polarität der Mutationsstelle beeinflusst werden sollte. Im Falle der Mutante F138Y wurde die Polarität durch die Einführung der Hydroxygruppe erhöht, während bei der Mutante Y211F aus einer polaren AS-Seitenkette ein hydrophober Rest erzeugt wurde. Polare Rückstände können ebenso wie aromatische Funktionalitäten an elektrostatischer Stabilisierung beteiligt sein und sind zudem in der Lage die Regiochemie bei Protonierungs- und Deprotonierungsschritten innerhalb der Reaktionskaskade zu steuern.^[77,194] Entscheidend hierbei ist allerdings ebenfalls die geometrische Anordnung zum kationischen Zwischenprodukt, um eine Enzymalkylierung zu verhindern.^[200]

Zwei weitere Mutanten wurden an der Position T242 erzeugt, bei dem es sich um den Linker der Effektortriade handelt. DICKSCHAT konnte durch einen Sequenzvergleich von 200 bakteriellen Terpensynthasen zeigen, dass neben Threonin auch Asparaginsäure, Serin und Asparagin als Linker fungieren.^[47] Daher wurden neben der Mutante T242S, bei der zusätzlich eine Vergrößerung der aktiven Tasche erzeugt wird, auch die Mutante T242N erstellt, die zu einer Verkleinerung der aktiven Tasche führt. Der Diphosphatsensor R239 wurde hingegen nicht verändert, da bereits gezeigt werden konnte, dass dieser konserviert vorliegt.^[47] Auch die hoch konservierten Metallbindemotive wurden im Rahmen der Mutagenesestudien nicht verändert, da diese oftmals zu drastischen Veränderungen der Reaktionskaskade führen und mit einem erheblichen Aktivitätsverlust einhergehen können.^[82,197]

Des Weiteren erfolgte eine Substitution der basischen Aminosäure Arginin an der Position 373 gegen Histidin (R373H) und Glycin (R373G). Während mit Histidin eine sterisch anspruchsvollere Base an der Position eingeführt wurde, erfolgte mit dem Austausch gegen Glycin der Verlust der Basizität bei gleichzeitiger Aufweitung der aktiven Tasche. Mit Letzterer könnte somit eine Basenaktivität der Aminosäure R373 überprüft werden. Mutagenesestudien mit TEAS deuten zudem auf eine potentielle Basenaktivität der Aminosäure Tryptophan hin.^[90] Da diese im Gegensatz zu den basischen AS Histidin, Arginin und Lysin eine verringerte Nukleophilie aufgrund des Indolrings aufweist, kann eine unbeabsichtigte Enzymalkylierung vermieden werden, sodass eine Interaktion mit den carbokationischen Intermediaten möglich erscheint.^[90] Anhand des Homologiemodells der STC BcBOT2 konnte W118 identifiziert werden, die tief in der aktiven Tasche angesiedelt ist. Durch einen Austausch gegen die polare AS Glutamin (W118Q) wird das Volumen

der aktiven Tasche verringert (**Abbildung 75**). Gleichzeitig wird dem Enzym durch den Austausch eine höhere Thermostabilität verliehen, wie Studien von ARNOLD mit der Mutante BcBOT2-W118Q zeigten.^[110,201]

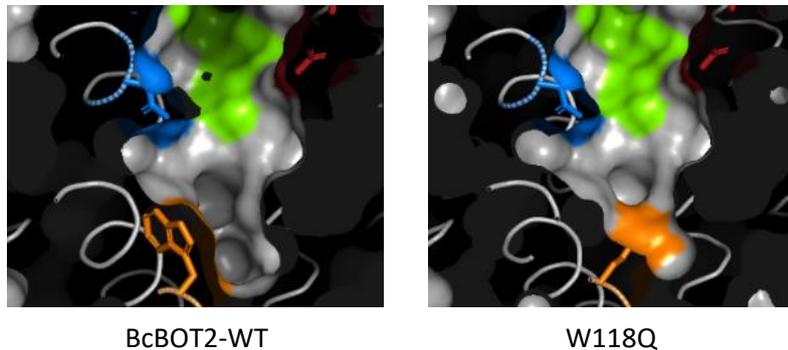


Abbildung 75: Einblick in das Homologiemodell (Oberflächendarstellung) von BcBOT2-WT (links) und BcBOT2-W118Q (rechts). Die Metallbindemotive (DDxxD: rot, NSD: blau) und Effektortriade (RTI: grün) sind farblich markiert. Zudem ist die Aminosäure (orange) an der Mutationsstelle vor (W118) und nach (W118Q) der Mutation gekennzeichnet. Durch den Austausch erfolgt eine Verringerung des Taschenvolumens.

Insgesamt wurden zehn Mutanten der STC BcBOT2 ausgewählt, die hergestellt und in analytischen Enzymtests mit FPP (**12**) hinsichtlich Enzymaktivität und Produktspektrum untersucht wurden. Bei geeigneter semi-quantitativer Ausbeute der Hauptprodukte erfolgte im Anschluss eine semi-präparative Umsetzung sowie die Isolierung der Verbindungen. Durch die Strukturaufklärung wurden anschließend postulierte Reaktionsmechanismen aufgestellt und der Einfluss der jeweiligen mutierten AS-Seitenketten auf die Biosynthese diskutiert.

3.15.3 Ortsspezifische Mutagenese und heterologe Expression

Zur Herstellung der Mutanten wurde eine ortsspezifische Mutagenese durchgeführt. Zur Ermittlung einer optimalen Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR unter Verwendung der *High-Fidelity* Phusion™ DNA-Polymerase durchgeführt. Der Temperaturbereich der Gradienten-PCR wurde so gewählt, dass dieser unterhalb der berechneten Schmelzpunkte der Primer angeordnet ist. Da die Primer die einzuführende Mutation tragen, handelt es sich um komplementäre Primer. Als Ausgangs-DNA diente das von OBERHAUSER klonierte BcBOT2-pET28a(+)-Konstrukt.^[112] Die Templat-DNA wurde vor Beginn der Mutagenesearbeiten zunächst durch eine Midi-Plasmidisolierung in ausreichender Menge hergestellt und sequenziert.

Der schematische Ablauf der Mutagenese ist in der **Abbildung 76** veranschaulicht. Nach erfolgter Gradienten-PCR wurde zur Verifizierung einer erfolgreichen Amplifikation eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, ehe der DpnI-Verdau der methylierten Templat-DNA erfolgte. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10 sowie die Plasmidisolierung. Zur Überprüfung einer korrekten Einführung der Mutation wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt, gefolgt von einer Genexpression sowie dem Zellaufschluss und der Proteinreinigung zur Gewinnung der mutierten BcBOT2-Synthasen.

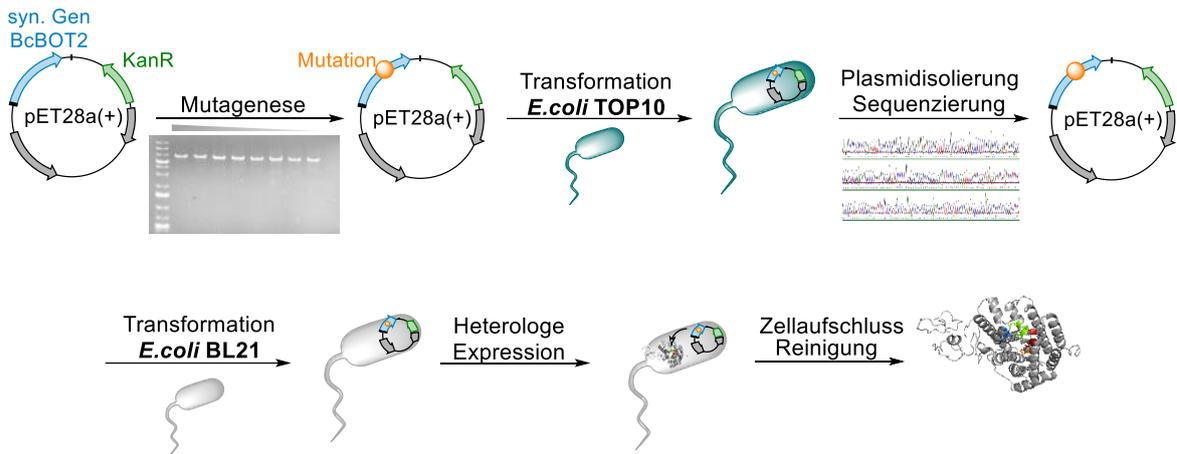


Abbildung 76: Fließschemata für die Durchführung der ortsspezifischen Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen in die STC BcBOT2. Die heterologe Expression sowie der Zellaufschluss und die Proteinreinigung erfolgten in Analogie zum BcBOT2-WT.

Die Verifizierung mittels Agarosegelelektrophorese zeigte, dass für alle Primerpaare eine optimale Annealing-Temperatur gefunden werden konnte (**Abbildung 77**). Zudem stimmt die Größe der charakteristischen Bande bei 6.5 kb mit dem Ausgangs-Konstrukt BcBOT2-pET28a(+) überein.

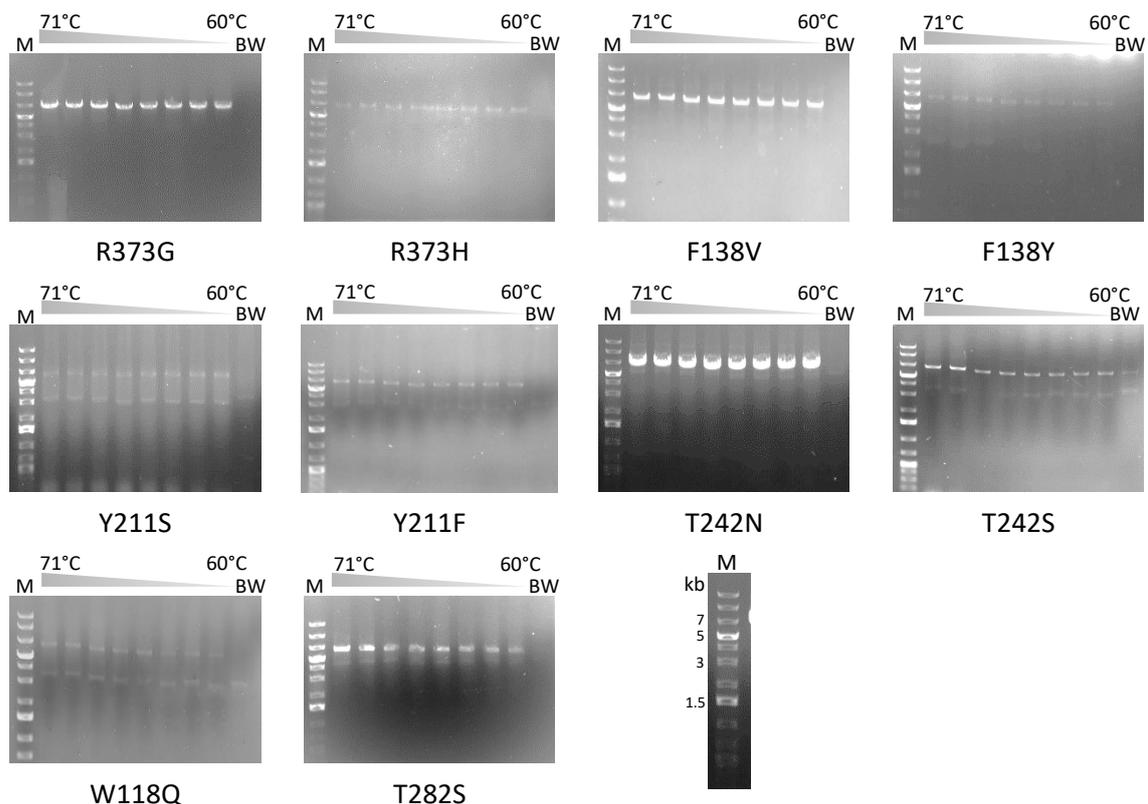


Abbildung 77: Agarosegele zur Amplifikationsverifizierung der mutierten BcBOT2-pET28a(+)-Plasmid-DNA und zur Identifikation der optimalen Annealing-Temperatur durch Gradienten-PCR. Der Größenstandard (M) ist in kb angegeben. Als Negativkontrolle diente eine PCR-Probe ohne Templat-DNA. Die zusätzliche Bande bei etwa 3.2 kb kann auf die eingesetzten Reagenzien zurückgeführt werden, da diese auch in der Negativkontrolle sichtbar ist.

Für die Mutanten W118Q, T242N, T242S, Y211S und T282S erfolgte eine Optimierung, da zunächst keine erfolgreiche Amplifikation beobachtet wurde. Ein Vergleich der komplementären Primer zeigte, dass die Primerpaare der genannten Mutanten alle eine erhöhte Schmelztemperatur sowie eine schwache Sekundärstruktur aufweisen. Daher erfolgte zunächst eine Erhöhung der Amplifikationstemperatur sowie der Zyklenzahl, um trotz Temperaturerhöhung genügend Amplifikat zu erhalten. Allerdings konnte keine Verbesserung der Amplifikation erzielt werden. Die komplementären Primer könnten hierbei zu einer Ausbeuteverringerng der PCR beitragen, indem sie Primer-Dimere ausbilden und dadurch nicht mehr in ausreichender Konzentration für die Anlagerung an die spezifischen Bindungsstellen der Plasmid-DNA zur Verfügung stehen. Daher wurde der Anteil an DMSO gesteigert, wodurch neben einer Senkung der Schmelztemperatur auch eine Destabilisierung und das Aufbrechen von Sekundärstrukturen erleichtert wird. Gleichzeitig wurde der Anteil an MgCl₂ erhöht, um die Aktivität der Polymerase zu erhöhen, wodurch für alle Mutanten eine erfolgreiche Amplifikation erzielt werden konnte. Nach Verifizierung des korrekten Einbaus der Mutationsstellen erfolgte eine heterologe Expression der mutierten BcBOT2-Gene in *E. coli* BL21 (DE3). Anhand einer SDS-Page wurde in Analogie zum WT für alle Mutanten eine Überexpression nach IPTG Zugabe sowie eine akzeptable Löslichkeit des Proteins nach Zellaufschluss nachgewiesen (**Abbildung 78, A**). Eine Reinigung der exprimierten Mutanten erfolgte ebenfalls mittels Metallchelatchromatographie (**Abbildung 78, B**). Hierbei konnte ein Elutionsmaximum im Bereich von 100 mM bis 250 mM Imidazol verzeichnet werden.

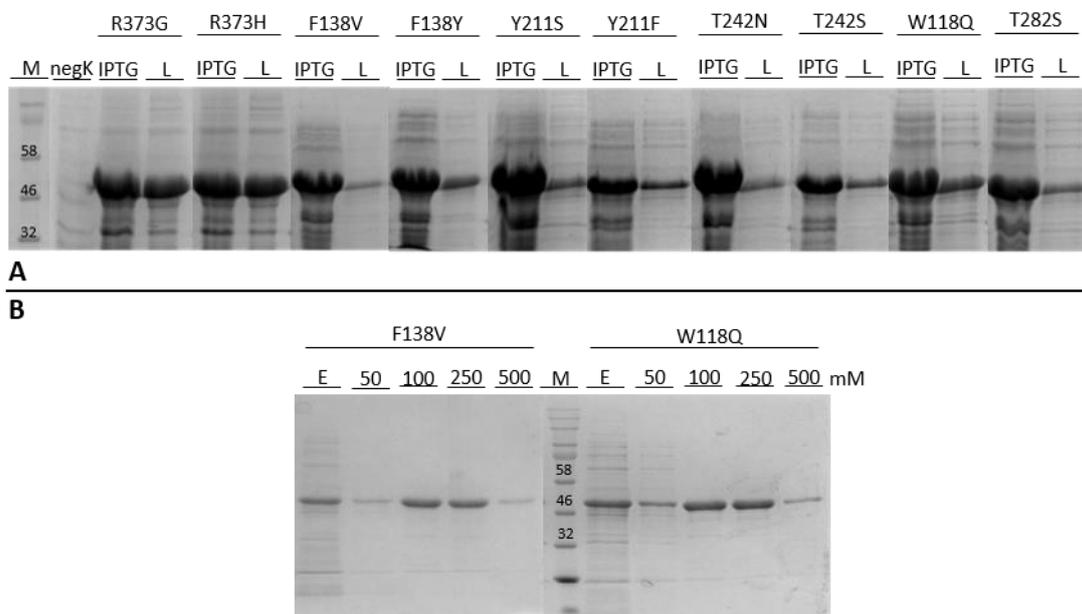
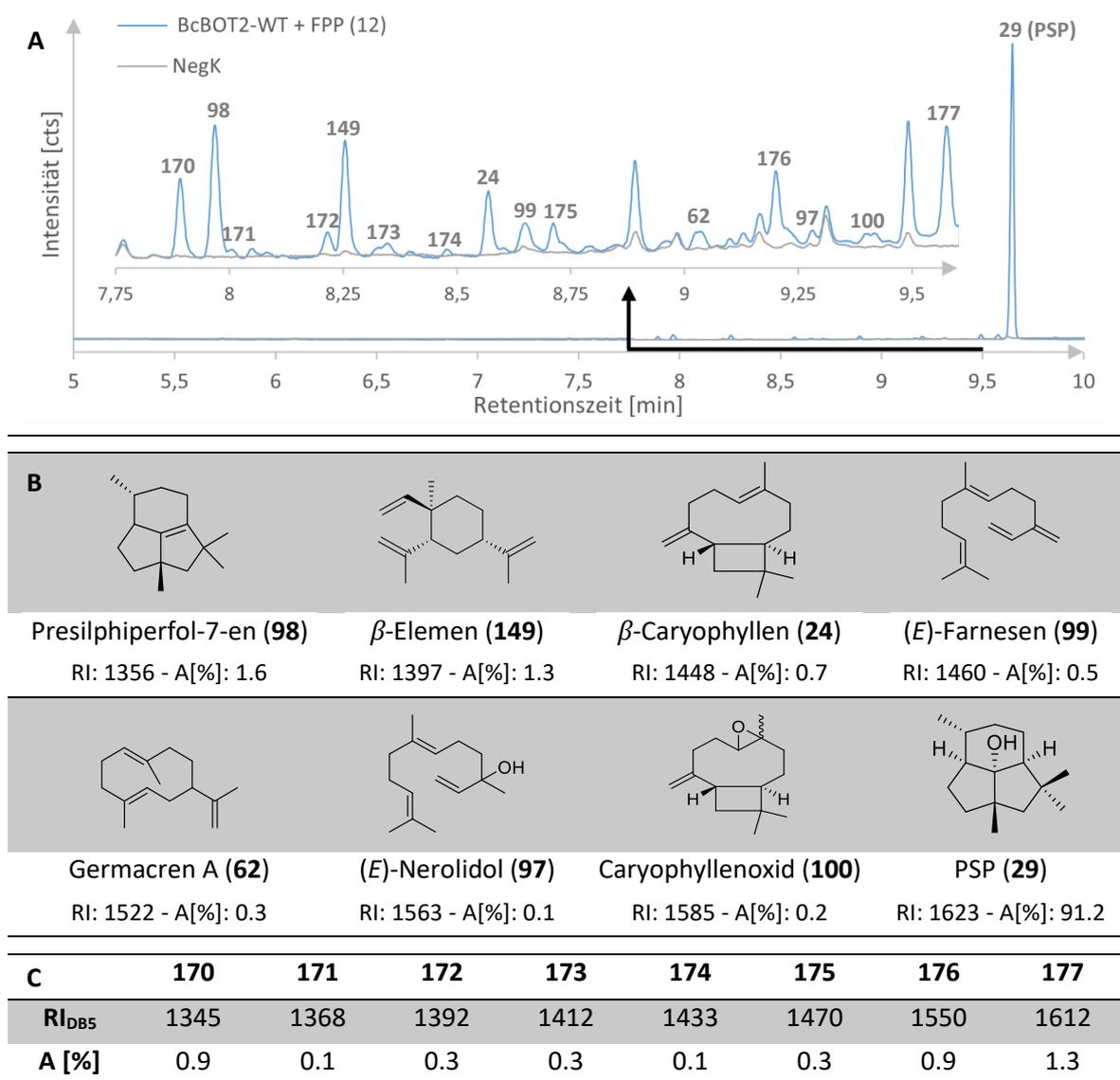


Abbildung 78: A: SDS-Page der *E. coli*-BL21 (DE3)-Hauptkulturen vor (negK) und nach Induktion (IPTG) mit IPTG sowie die Auftragung des Lysats (L) zum Nachweis der Proteinlöslichkeit für die zehn BcBOT2-Mutanten. B: SDS-Page der Proteinreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie für die BcBOT2-Mutanten F138V und W118Q. Zur besseren Übersicht sind die Banden des Größenstandards mit den jeweiligen kDa gekennzeichnet. Neben dem Durchfluss nach zweimaliger Aufgabe auf die Säule (E) sind die Elutionsschritte mit 50 mM – 500 mM Imidazol abgebildet.

3.15.4 Analytische Enzymtests und semi-quantitative Betrachtung

Bevor die punktmutierten BcBOT2-Mutanten hinsichtlich ihrer Aktivität und des Produktspektrums untersucht wurden, erfolgte zunächst eine Evaluierung des Wildtyps (WT). Dazu wurde die STC BcBOT2-WT in einem analytischen Enzymtest mit dem natürlichen Produkt FPP (**12**) umgesetzt und die biotransformierten Produkte anhand eines Vergleichs mit Negativkontrollen identifiziert (Tabelle 26).

Tabelle 26: Identifikation von Nebenprodukten der Biotransformation von BcBOT2-WT und FPP (**12**). **A:** Chromatogramm (DB5-Trennsäule) des resultierenden Produktspektrums (blau) und der Negativkontrolle (ohne Enzym, grau). Der Elutionsbereich der Nebenprodukte ($t_R = 7.75 \text{ min} - 9.6 \text{ min}$, schwarze Markierung) ist vergrößert abgebildet. **B:** Strukturformeln der mittels GC-MS nachgewiesenen Nebenprodukte. Zudem ist das Cope-Umlagerungsprodukt (**149**) angegeben sowie das isolierte und über NMR-Spektroskopie aufgeklärte Hauptprodukt PSP (**29**). **C:** Übersicht der unbekanntesten Verbindungen **170-177** mit Angabe der prozentualen Flächenprocente (A[%]) und der Retentionsindices auf einer DB5-Trennsäule.



Hierbei konnten neben dem Hauptprodukt PSP (**29**, 91.2 % Anteil) 15 weitere Nebenprodukte identifiziert werden, die mit prozentualen Anteilen zwischen 0.1 % und 1.6 % vorliegen. Hiervon wurden bereits sechs Verbindungen in Kap. 3.5.2 durch einen Datenbankabgleich aufgeklärt und entsprechende Biosynthesewege postuliert. Das Caryophyllenoxid (**100**) konnte bereits als Oxidationsprodukt des β -Caryophyllen (**24**) bestätigt werden.^[141] Zusätzlich wurde ebenfalls β -Elemen (**149**) im Produktspektrum nachgewiesen. Da die STC BcBOT2 das thermolabile Germacren A (**62**) als Produkt bildet und β -Elemen bei Verwendung eines abweichenden Temperaturprogramms während der chromatographischen Trennung nicht detektiert wurde (s. Kap. 3.5.2), kann β -Elemen (**149**) eindeutig als COPE-Umlagerungsprodukt des Germacren A (**62**) identifiziert werden.^[154] Durch die Umlagerung ist auch der im Vergleich zu Kap. 3.5.2 geringere prozentuale Anteil an Germacren A (**62**) im Produktspektrum der STC BcBOT2-WT bedingt.²² Die weiteren Verbindungen **170-177** konnten nicht über Massenspektren und RI bestimmt werden, sodass diese unbekannt sind. Eine Isolierung aus dem Produktspektrum der STC BcBOT2-WT war aufgrund der geringen prozentualen Anteile nicht möglich.

Im Anschluss erfolgten analytische Enzymtests mit den zehn hergestellten BcBOT2-Mutanten. Durch die Verwendung von Negativkontrollen konnten eingeschleppte Verunreinigungen verifiziert und eine Identifikation von Biotransformationsprodukten gewährleistet werden. Ein Vergleich mit dem WT zeigte, dass die Mutanten Y211S, Y211F, T242N, T242S und T282S ein identisches Produktspektrum erzeugen. Eine durchgeführte semi-quantitative Auswertung des WT und der Mutanten offenbarte lediglich geringfügige Abweichungen hinsichtlich der erzielten Ausbeuten der einzelnen Produkte. So konnten mit den Mutanten PSP-Ausbeuten im Bereich von 43.9 ± 0.5 % und 50.1 ± 3.3 % erzielt werden, die mit dem des WT (52.6 ± 4.2 %) durchaus vergleichbar sind. Ähnlich verhält es sich auch bei den biotransformierten Nebenprodukten.²³

Einzig bei der Mutante Y211S liegt eine signifikante Ausbeuteerhöhung von 1.3 ± 0.1 % für das Produkt **174** vor, sodass die Vergrößerung der aktiven Tasche und die Entfernung der Kationen- π -Wechselwirkung die Bildung von **174** begünstigt. Gleichzeitig scheint das Ausbleiben der elektrostatischen Stabilisierung jedoch keinen Einfluss auf die Biosynthese der weiteren Produkte, insbesondere des Hauptproduktes **29**, zu nehmen. Auch eine Vergrößerung der aktiven Tasche durch die Mutation T282S zeigte keine Veränderung hinsichtlich einer Konformationsänderung von Substrat und carbokationischen Zwischenprodukten. Ob der AS-Rest durch die Hydroxyfunktion eine elektrostatische Stabilisierung auf die kationischen Intermediate ausübt, könnte in weiteren Studien durch den Austausch gegen die AS Valin überprüft werden. Bei der Mutante Y211F konnte hingegen gezeigt werden, dass die polare Hydroxygruppe nicht an der Stabilisierung der carbokationischen Kaskade beteiligt ist, weshalb ebenfalls keine Änderung in der Zusammensetzung des Produktspektrums beobachtet wurde. Auch beim Austausch des Linkers der Effektortriade (T242) wurde keine signifikante Abweichung hinsichtlich der

²² Der prozentuale Anteil des biotransformierten Germacren A (**62**) am Produktspektrum der STC BcBOT2, setzt sich aus den detektierten Anteilen an Germacren A und COPE-Umlagerungsprodukt (**149**) zusammen.

²³ Eine Übersicht der semi-quantitativ ermittelten Umsetzung kann dem Anhang (Kap.10.9.1) entnommen werden.

Produktzusammensetzung festgestellt. Ebenso wie bei den bakteriellen STCs kann der Linker demzufolge auch bei den fungalen STCs durch verschiedene Aminosäurereste repräsentiert werden.^[47]

Da die Mutationen Y211S, Y211F, T242N, T242S und T282S eine vergleichbare Enzymaktivität wie der WT und keine signifikanten Abweichungen im Produktspektrum aufweisen, wurde die Thermostabilität der BcBOT2-Mutanten überprüft. Der Vorteil eines thermostabilen Enzyms ist das Erzielen von höheren Reaktionsgeschwindigkeiten ohne, dass das Enzym durch die Temperaturerhöhung denaturiert und an Aktivität einbüßt. Weiterhin sind thermostabile Enzyme robuster gegenüber weiteren Mutationen, sodass sie als idealer Ausgangspunkt für weitere Mutagenesestudien genutzt werden können.^[110] Anhand der **Abbildung 79** zeigt sich, dass bei allen BcBOT2-Mutanten eine Verschiebung des Ausbeutemaximums zu höheren Temperaturen beobachtet werden konnte.²⁴ Hinsichtlich der Mutanten T242S und T282S konnte eine leichte Verschiebung des Temperaturmaximums auf 30°C beobachtet werden. Interessanterweise, wurde bei beiden Mutationsstellen Threonin gegen Serin ausgetauscht, sodass die Verkürzung des AS-Rests zu einer besseren Thermostabilität beizutragen scheint, die auf eine bessere Flexibilität des Enzyms und Einfügung des Substrats in das aktive Zentrum begründet sein könnte. Die weiteren BcBOT2-Mutanten Y211S, Y211F und T242N zeigen ebenfalls eine deutliche Verschiebung des Ausbeutemaximums auf 40°C, sodass diese Mutanten als Ausgangspunkt für weitere Mutagenesestudien in Frage kommen.

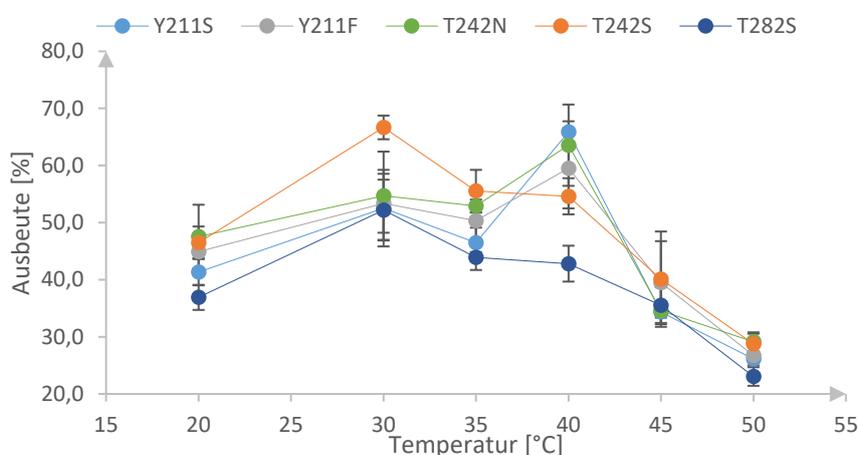


Abbildung 79: Überprüfung der Thermostabilität für die BcBOT2-Mutanten Y211S, Y211F, T242N, T242S und T282S in einer Dreifachbestimmung. Die Ermittlung der Ausbeute erfolgte unter Zusatz eines internen Standards.

Der Austausch von Arginin gegen die sterisch anspruchsvollere Base Histidin oder auch die Auslöschung der Basizität durch die Einführung von Glycin an der Position 373 führt zu einem vollständigen Verlust der PSP (**29**) Produktion sowie weiteren Nebenprodukten. Die Aminosäure R373 scheint somit essentiell für die Aktivität der STC BcBOT2 zu sein. Da die Nebenprodukte **170**, **177** und β -Caryophyllen (**24**) bei beiden Mutanten weiterhin in Spuren²⁵ nachgewiesen wurden,

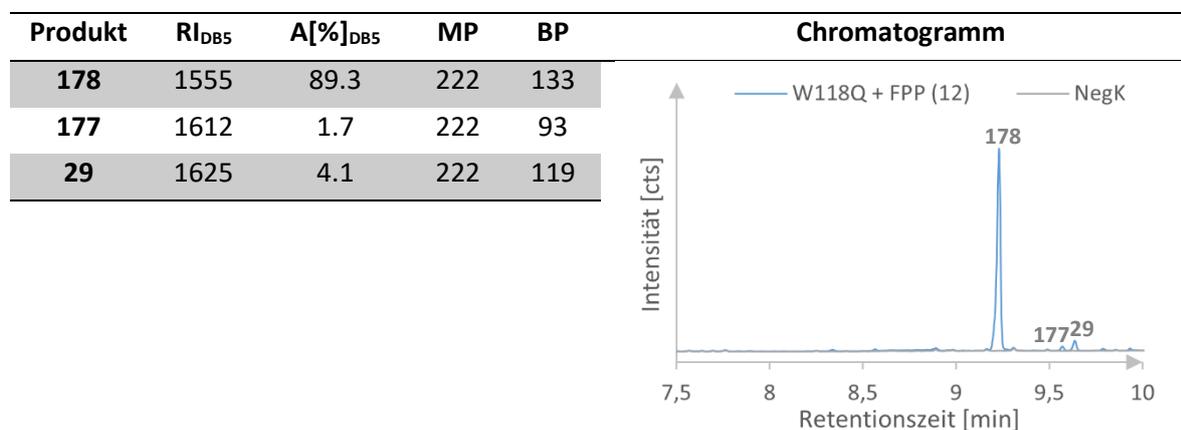
²⁴ Das Ausbeutemaximum des BcBOT2-WTs wurde bei einer Temperatur von 20-25°C erreicht (s. Kap.3.4.3).

²⁵ Die Ermittlung der Ausbeute erfolgte semi-quantitativ anhand eines internen Standards. Hierbei konnten Ausbeuten zwischen 0.04 % und 0.16 % für die Produkte **24**, **170** und **177** ermittelt werden.

scheint R373 aufgrund der Detektion von **24** erst nach der Bildung des Caryophyllenylkations (**32**) effektiv an der Reaktionskaskade beteiligt zu sein.

Auch die AS Tryptophan verfügt über eine Basenaktivität, die eine Interaktion mit carbokationischen Intermediaten erlaubt.^[90] Mit dem natürlichen Substrat FPP (**12**) konnte im Rahmen der Mutagenesestudien eine deutliche Veränderung des Produktspektrums mit der Mutante W118Q erzielt werden (**Tabelle 27**). Es konnte ein neues Produkt **178** identifiziert werden, welches nicht im Produktspektrum des WTs enthalten ist. Gleichzeitig besitzt jedoch auch die Mutante W118Q die Fähigkeit den Reaktionspfad des WT zu katalysieren und die Produkte **29** und **177** auszubilden. Um zu überprüfen, ob die Verkleinerung der aktiven Tasche bzw. die Basenaktivität der ausgetauschten AS für die Bildung eines neuen Hauptprodukts verantwortlich ist, bietet sich eine Isolierung und Strukturaufklärung der Verbindung **178** an, um über postulierte Biosynthesewege Unterschiede in den Reaktionspfaden der Bildung von **29** und **178** festzustellen. Dazu ist eine gute Enzymaktivität der Mutante BcBOT2-W118Q unabdingbar, die indirekt über eine semi-quantitative Auswertung des Hauptprodukts ermittelt werden kann. Hierbei konnte eine Ausbeute von 18.7 ± 0.1 % bestimmt werden, sodass das Produkt in ausreichender Menge für eine Isolierung produziert wird.

Tabelle 27: Ausgewählte Produkte der Biotransformation von FPP (**12**) mit der Mutante BcBOT2-W118Q. Neben der Angabe des Retentionsindex (RI) sind die prozentualen Flächenanteile sowie die charakteristischen Mol- (MP) und Basispeaks (BP) der Verbindungen angegeben. Die Produkte sind im Chromatogramm gekennzeichnet. Eine Identifizierung der Produkte erfolgte durch Überlagerung des Produktspektrums mit einer Negativkontrolle (NegK).

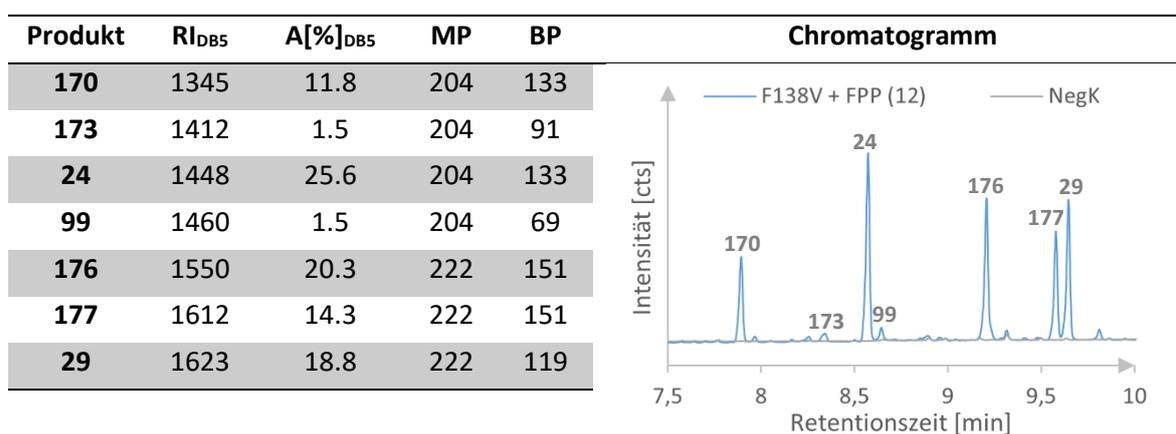


Auch die Punktmutationen an der Position F138 führten zu einem veränderten Produktspektrum. Interessanterweise wird die STC BcBOT2-WT durch den Austausch der AS Phenylalanin gegen Valin und Tyrosin von einem hochspezifischen Enzym in eine Multiproduktsynthese überführt, die neben dem Hauptprodukt PSP (**29**) weitere Produkte mit einem vergleichbaren prozentualen Anteil produziert. Ein Vergleich mit dem WT zeigte hierbei, dass es sich bei den weiteren Produkten nicht um gänzlich neue Produkte wie bei der Mutante W118Q handelt, sondern um einige der im WT detektierten Nebenprodukte.

Im Falle der Mutante F138V erzeugte das mutierte Enzym zusätzlich zum PSP (**29**) vier weitere Produkte, von denen ein Produkt bereits durch einen Datenbankabgleich anhand der RI und MS-Spektren als β -Caryophyllen (**24**) identifiziert wurde (**Tabelle 28**). Die weiteren drei Produkte sind

hingegen unbekannt. Mittels einer semi-quantitativen Bestimmung wurden die Ausbeuten der unbekanntenen Verbindungen **170**, **176** und **177** ermittelt ($3.2 \pm 0.2 \%$ bis $4.7 \pm 0.3 \%$), sodass eine Isolierung der Verbindungen im semi-präparativen Maßstab möglich ist. Durch den Austausch von Phenylalanin gegen Valin entfällt die stabilisierende Kation- π -Wechselwirkung, wobei gleichzeitig die enzymatische Tasche vergrößert wird. Da neben dem Hauptprodukt nun verstärkt auch die Nebenprodukte gebildet werden, scheint F138 Einfluss auf die Stabilisierung der carbokationischen Kaskade zu nehmen und die Biosynthese zum Hauptprodukt PSP (**29**) zu leiten. Durch die Vergrößerung der aktiven Tasche wird zudem die Produktpromiskuität eines Enzyms erhöht, da das Substrat über einen höheren Grad an Konformationsfreiheit während der Zyklisierungskaskade verfügt, sodass alternative Reaktionspfade zugänglich werden.^[80] Folglich scheint die katalytische Promiskuität sowie die Produktpromiskuität des Enzyms entscheidend von der AS F138 geprägt zu werden.

Tabelle 28: Ausgewählte Produkte der Biotransformation von FPP (**12**) mit der Mutante BcBOT2-F138V. Neben der Angabe des Retentionsindex (RI) sind die prozentualen Flächenanteile A [%] sowie die charakteristischen Mol- (MP) und Basispeaks (BP) der Verbindungen angegeben. Die Produkte sind im Chromatogramm gekennzeichnet. Eine Identifizierung der Produkte erfolgte durch Überlagerung des Produktspektrums mit einer Negativkontrolle (NegK).



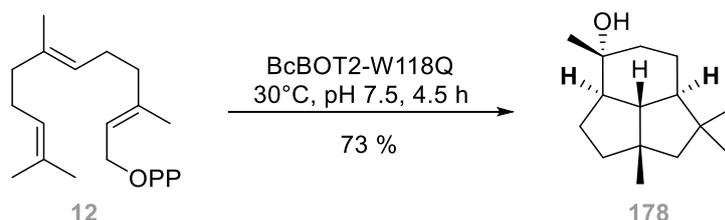
Bei der Mutante F138Y wurde hingegen eine zusätzliche Hydroxyfunktion eingeführt, die neben einer Polaritätserhöhung auch eine Verkleinerung der aktiven Tasche bedingt. Eine semi-quantitative Bestimmung mittels internen Standard zeigte, dass die Ausbeuten unterhalb von $0.7 \pm 0.1 \%$ liegen, sodass der Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin zu einem drastischen Ausbeuteverlust des Hauptprodukts **29** führt (**Tabelle 29**). Die weiteren detektierten Nebenprodukte weisen hingegen vergleichbare Ausbeuten wie bei der Umsetzung mit dem BcBOT2-WT auf. Eine mögliche Ursache ist, dass die eingeführte voluminösere und polarere AS Tyrosin die Effektortriade beeinflussen könnte, indem die notwendige Konformationsänderung des Enzyms blockiert wird, wodurch die Abspaltung des Diphosphats gehemmt wird. Folglich würde die katalytische Aktivität des Enzyms reduziert werden und nur ein geringer Anteil des eingesetzten Substrats würde für die nachfolgende Zyklisierung zur Verfügung stehen. Auch die von der Hydroxygruppe des Tyrosins ausgehende Polarität könnte die Enzymaktivität dahingehend negativ beeinflussen, als dass der Reaktionspfad zur Bildung des Hauptprodukts verwehrt wird.

Tabelle 29: Ausgewählte Produkte der Biotransformation von FPP (**12**) mit der Mutante BcBOT2-F138Y. Neben der Angabe des Retentionsindex (RI) sind die prozentualen Flächenanteile A [%] sowie die charakteristischen Mol- (MP) und Basispeaks (BP) der Verbindungen angegeben. Die Produkte sind im Chromatogramm gekennzeichnet. Eine Identifizierung der Produkte erfolgte durch Überlagerung des Produktspektrums mit einer Negativkontrolle (NegK).

Produkt	RI _{DB5}	A[%] _{DB5}	MP	BP	Chromatogramm
170	1345	2.6	204	133	
24	1448	7.7	204	133	
99	1460	29.4	204	69	
176	1550	11.7	222	151	
177	1612	12.9	222	151	
29	1623	31.0	222	119	

3.15.5 Semi-präparativer Ansatz von BcBOT2-W118Q mit FPP

Vor der eigentlichen Umsetzung wurde auch mit der Mutante W118Q eine Temperaturoptimierung durchgeführt. Hierbei konnte ein Ausbeutemaximum bei 40°C festgestellt werden, sodass eine Erhöhung der Thermostabilität für die literaturbekannte Mutante W118Q bestätigt werden konnte.^[110,201] Für die anschließende Isolierung der Verbindung **178** wurde zunächst eine semi-präparative Umsetzung im Fed-Batch Prozess durchgeführt. Es wurde eine hellgelbe, ölige Flüssigkeit in 73 % Ausbeute als Rohprodukt erhalten (**Schema 27**). Interessanterweise konnte mit der Mutante W118Q eine im Vergleich zum WT (46 %) höhere Ausbeute an Rohprodukt mit dem natürlichen Substrat FPP (**12**) erzielt werden. Diese Beobachtung könnte auf die bestätigte Thermostabilität und eine damit einhergehende Langzeitstabilität der Mutante BcBOT2-W118Q zurückgeführt werden. Zudem ist auch eine Steigerung der Enzymaktivität durch die Einführung der Punktmutation denkbar.

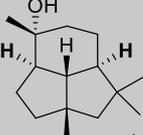


Schema 27: Enzymatische Biotransformation von FPP (**12**) mit der punktmultierten STC BcBOT2-W118Q zu dem Hauptprodukt **178**.

Eine analytische Charakterisierung zeigte, dass die Verbindung **178** angesichts des RI auf der polaren FFAP-Trennsäule über eine oxidierte Funktionalität verfügt (**Tabelle 30**). Bei dieser handelt es sich um eine Hydroxygruppe, die indirekt über den Fragmentverlust in Form von Wasser (m/z 18) bei Bestimmung der hochaufgelösten Masse mit EI-Ionisation nachgewiesen wurde und die im Einklang mit dem detektierten Molpeak von m/z 222 für die Verbindung **178** steht (s. Kap. 3.15.4).

Eine Begutachtung des sensorischen Profils offenbarte, dass die Verbindung **178** keinen wahrnehmbaren Geruchseindruck aufweist.

Tabelle 30: Analytische Charakterisierung der Verbindung **178** anhand von RI auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität, der hochaufgelösten Molmasse sowie dem sensorischen Profil. Durch eine pGC konnte die Reinheit A[%] der Verbindung **178** erhöht werden.

 (178)	RI _{DB5HT}	RI _{FFAP}	A[%] _{DB5HT}	A[%] _{DB5HT - nach pGC}
		1569	2017	74.8
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden: 204.1877 [M-H ₂ O] ⁺		kein sensorisches Profil	

Vor der Strukturaufklärung konnte die Reinheit der Verbindung durch eine Isolierung mittels pGC auf 94.1 % erhöht werden. Mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente wurde anschließend die Struktur aufgeklärt, wobei die Verbindung **178** als das literaturbekannte Presilphiperfolan-9β-ol identifiziert werden konnte.^[53,202,203] Auch die über 1D-NOE Experimente ermittelte relative Stereochemie stimmt mit der Literatur überein, sodass das Vorliegen eines Diastereomers ausgeschlossen werden kann (**Abbildung 80**). Hierbei wurden Magnetisierungs-transfers ausgehend vom zentralen Proton H-8 zu den in die gleiche Richtung orientierten Protonen der beiden Cyclopentanringe und des Cyclohexanrings nachgewiesen. Die relative Anordnung der Hydroxygruppe ergibt sich aus den Wechselwirkungen der ebenfalls an C-9 gebundenen Methylgruppe 15.

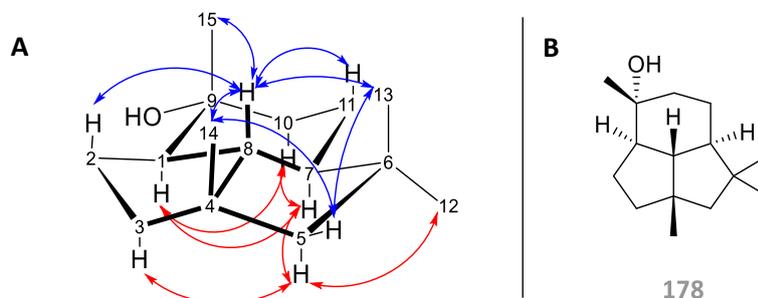


Abbildung 80: A: Ausgewählte 1D-NOE Magnetisierungstransfers zur Aufklärung der relativen Stereochemie der Verbindung **178**. B: Relative Stereochemie der Verbindung **178**.

Das Produkt Presilphiperfolan-9β-ol (**178**) wurde bereits durch WEYERSTAHL und MARCO aus den Pflanzengattungen *Artemisia lacinata* und *Artemisia chamaemelifolia* isoliert und die Struktur durch NMR-Spektroskopie, Eu(fod)₃-Shift Reagenzien und *Modelling* aufgeklärt.^[202,204] Weiterhin gelang WEYERSTAHL die Bestätigung der Struktur und Konfiguration durch eine 17-stufige Totalsynthese, ausgehend von dem Baustein *iso*-Buttersäure.^[203] Eine olfaktorische Analyse zeigte außerdem, dass das Racemat über eine kräftige holzartige und harzige Note verfügt.^[203] Da das isolierte Produkt **178** kein sensorisches Profil aufweist, sollte somit lediglich eines der beiden möglichen Enantiomere durch die Biotransformation gebildet worden sein. Ferner zeigten biologische Toxizitätsstudien, dass das Presilphiperfolan-9β-ol (**178**) eine fraßhemmende Wirkung

auf Insekten hat, wobei eine toxische Wirkung auf das periphere und zentrale Nervensystem angenommen wird.^[205]

3.15.6 Semi-präparativer Ansatz von BcBOT2-F138V mit FPP

Eine Überprüfung der Thermostabilität belegte auch für die Mutante BcBOT2-F138V eine Verschiebung des Ausbeutemaximums für alle fünf Hauptprodukte zu höher Temperatur (**Abbildung 81**). Hierbei konnte ein breites Optimum oberhalb von 30°C beobachtet werden, welches etwa 10°C höher liegt als bei der Umsetzung mit dem WT. Neben der Vergrößerung der aktiven Tasche durch die eingeführte Punktmutation, könnte aufgrund der Temperaturerhöhung die Flexibilität von Enzym und Substrat weiter gesteigert werden, sodass die Reaktionspfade zur Bildung der Nebenprodukte **24**, **170** sowie **176** und **177** nochmals begünstigt werden.

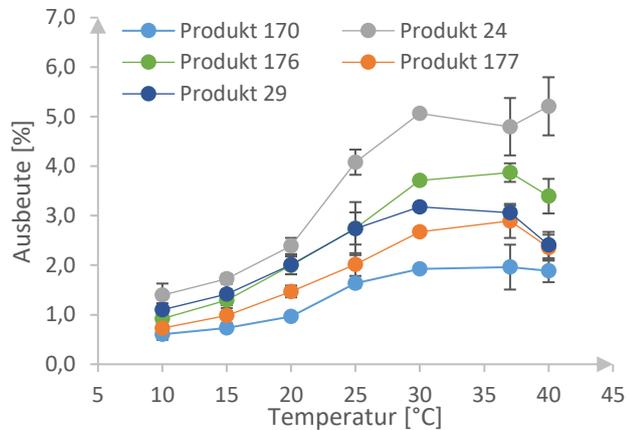
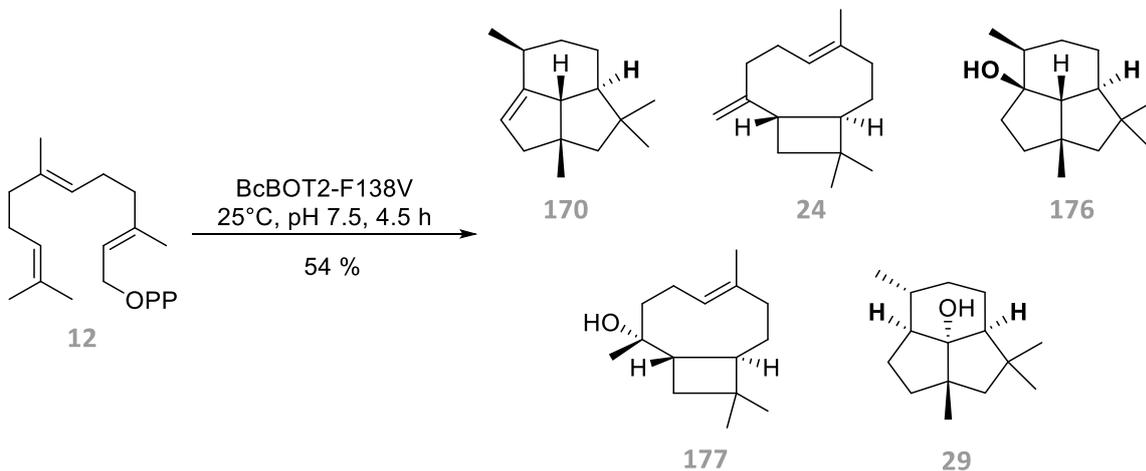


Abbildung 81: Überprüfung der Thermostabilität der Mutante BcBOT2-F138V anhand der semi-quantitativ ermittelten Ausbeute der fünf Hauptprodukte.

Für die Umsetzung im semi-präparativen Maßstab wurde abermals ein Fed-Batch Prozess gewählt. Das Rohprodukt wurde als hellgelbe, ölige Flüssigkeit in einer Ausbeute von 54.4 % erhalten. Bemerkenswerterweise wurde, in Analogie zur BcBOT2-W118Q Mutante, erneut eine höhere Rohproduktausbeute als mit dem BcBOT2-WT und FPP (**12**) als Substrat erzielt (**Schema 28**).

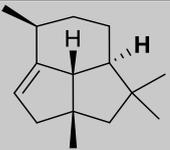
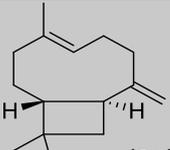
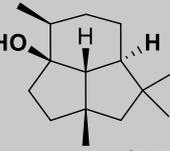
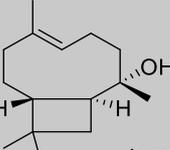
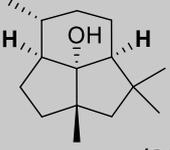


Schema 28: Enzymatische Biotransformation von FPP (**12**) mit der Mutante BcBOT2-F138V zu den Produkten **24**, **29**, sowie **176** und **177**.

Neben der bereits über Datenbanken identifizierten Verbindung **24** und dem natürlichen Hauptprodukt PSP (**29**) wurden durch eine analytische Charakterisierung mittels GC-MS erste Informationen zu den Verbindungen **170**, **176** und **177** erhalten. So weist die Verbindung **170** aufgrund des RI auf der polaren FFAP-Trennsäule und der detektierten Molmasse keine oxidierte Funktionalität auf, während die beiden weiteren Verbindungen eine Hydroxygruppe enthalten. Die

Abweichung der hochaufgelösten Masse bei den Verbindungen **176**, **177** und **29** von der tatsächlichen Molmasse ist durch die Abspaltung der Hydroxygruppe in Form von Wasser (m/z 18) bedingt. Eine GC-olfaktorische Betrachtung des sensorischen Profils lieferte für keine der Verbindungen einen Geruchseindruck (**Tabelle 31**). Um eine Strukturaufklärung zu ermöglichen, wurden die Produkte, einschließlich der bekannten Verbindungen **24** und **29**, mittels pGC aus dem Rohprodukt isoliert, wodurch die Reinheiten der Verbindungen auf 78.8 % - 96.6 % gesteigert werden konnten.

Tabelle 31: Analytische Charakterisierung der Verbindungen **24**, **29**, **170** sowie **176** und **177** anhand der RI auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität, der hochaufgelösten Masse und dem sensorischen Profil. Durch eine pGC konnten die einzelnen Verbindungen isoliert und die Reinheit $A[\%]_{\text{nach pGC}}$ maßgeblich gesteigert werden.

 (170)	RI_{DB5HT}	RI_{FFAP}	$A[\%]_{DB5HT}$	$A[\%]_{DB5-HT-nach\ pGC}$
	1351	1415	8.5	94.1
	HR-GCMS gefunden: 204.1876 [M] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
 (24)	RI_{DB5HT}	RI_{FFAP}	$A[\%]_{DB5HT}$	$A[\%]_{DB5-HT-nach\ pGC}$
	1456	1599	26.7	96.6
	HR-GCMS gefunden: 204.1878 [M] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
 (176)	RI_{DB5HT}	RI_{FFAP}	$A[\%]_{DB5HT}$	$A[\%]_{DB5-HT-nach\ pGC}$
	1564	1943	16.1	84.9
	HR-GCMS gefunden: 204.1875 [M-H ₂ O] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
 (177)	RI_{DB5HT}	RI_{FFAP}	$A[\%]_{DB5HT}$	$A[\%]_{DB5-HT-nach\ pGC}$
	1625	2034	12.1	87.1
	HR-GCMS gefunden: 204.1877 [M-H ₂ O] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	
 (29)	RI_{DB5HT}	RI_{FFAP}	$A[\%]_{DB5HT}$	$A[\%]_{DB5-HT-nach\ pGC}$
	1645	2084	16.4	78.8
	HR-GCMS gefunden: 204.1879 [M-H ₂ O] ⁺		GC-Olfaktometrie kein sensorisches Profil	

Die Identifikation des Hauptproduktes PSP (**29**) als eines der fünf Produkte konnte, neben den RI und MS-Spektren auch nochmals durch die ¹H- und ¹³C-NMR-Experimente bestätigt werden.^[59] Ebenso verhielt es sich bei dem Produkt β -Caryophyllen (**24**), welches anhand der NMR-Experimente eindeutig verifiziert werden konnte.^[206,207] β -Caryophyllen wurde bereits durch BOHLMANN zusammen mit PSP (**29**) isoliert, weshalb es als eine Vorstufe der Presilphiperfolane angesehen und ebenfalls über eine 11,1-Zyklisierung ausgebildet wird.^[52,208] Die Bildung des

diastereomeren 2-*epi*- β -Caryophyllens konnte hingegen durch die Bestimmung der relativen Stereochemie und RI ausgeschlossen werden.

Das Produkt **170** konnte mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente als Presilphiperfol-1-en identifiziert werden. Die literaturbekannte Verbindung wurde bisher noch nicht als natürlich vorkommendes Produkt nachgewiesen, sondern durch eine Dehydratisierung unter sauren Bedingungen aus Presilphiperfolan-1-ol (**179**) erzeugt.^[209] Die Bestimmung der relativen Stereochemie mittels 1D-NOE-Experimenten offenbarte eine von der Literatur abweichende Stereochemie für das Produkt **170** (**Abbildung 82**).^[209] So konnten Magnetisierungsansfers zwischen dem axial angeordneten Proton H-8 mit den Protonen der Methylgruppen 13, 14 und 15 identifiziert werden, die eindeutig eine Orientierung der Methylgruppen in die gleiche Richtung nachweisen. Das Proton an der Position 7 hingegen weist aufgrund von Wechselwirkungen mit den Protonen H-10a, H-5a und H-3a sowie der Methylgruppe 12 in die entgegengesetzte Richtung.

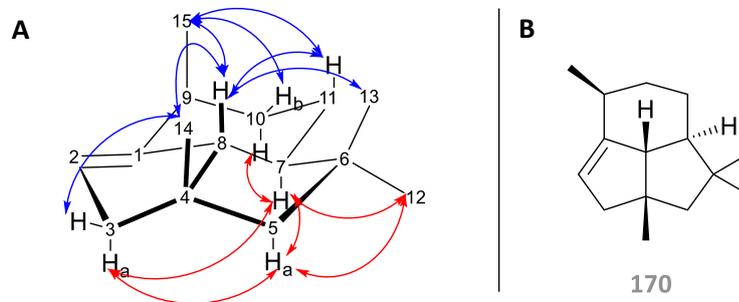
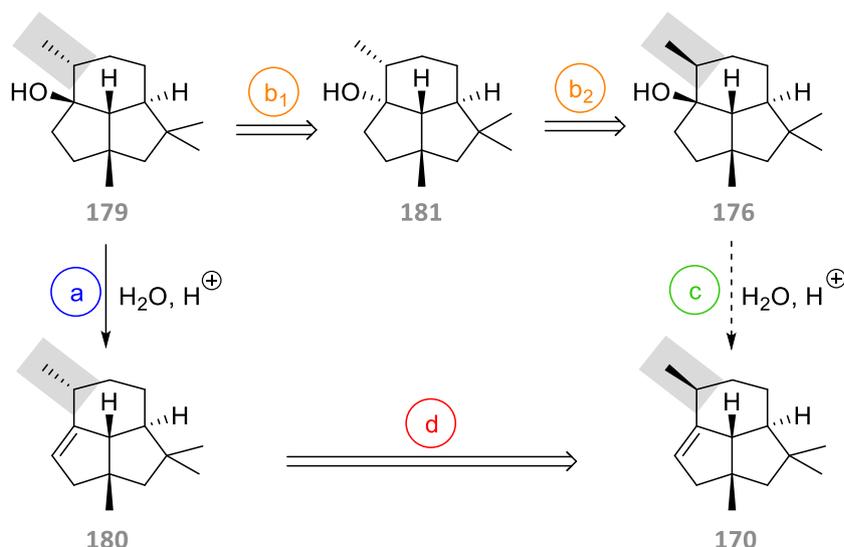


Abbildung 82: A: Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **170** anhand ausgewählter 1D-NOE-Effekte. B: resultierende relative Stereochemie für die isolierte Verbindung **170**.

Die in der Literatur für Presilphiperfol-1-en (**170**) abweichende relative Stereochemie (**180**) für die Methylgruppe 15 (grau markiert) kann darauf zurückgeführt werden, dass die Konfiguration der Verbindung nicht experimentell ermittelt, sondern aus dem Dehydratisierungsprodukt Presilphiperfolan-1-ol (**179**) abgeleitet wurde, dessen exakte Konfiguration (**176**) erst 2010 nach mehrmaliger Revidierung durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen wurde (**Schema 29**).^[209–211] Eine Dehydratisierung ausgehend von dem Presilphiperfolan-1 α -ol (**176**) würde zum isolierten Produkt **170** führen, sodass die von KÖNIG angenommene relative Stereochemie des Presilphiperfol-1-en im Rahmen dieser Arbeit revidiert werden konnte.



Schema 29: Die relative Stereochemie der durch Dehydratisierung erzeugten Verbindung **180** erfolgte durch eine Übertragung der Konfiguration von **179** auf **180** (Weg a).^[209] 2009 revidierte zunächst PINTO die durch KÖNIG postulierte relative Stereochemie der Verbindung **179** zu *epi*-Presilpiperfolan-1-ol (**181**) (Weg b₁)^[210], ehe 2010 JOSEPH-NATHAN durch Röntgenstrukturanalyse die eigentliche Konfiguration des Presilpiperfolan-1 α -ol (**176**) nachweisen konnte (Weg b₂)^[211]. Eine Übertragung der relativen Stereochemie der Verbindung **176** auf das Dehydratisierungsprodukt (Weg c) würde im Einklang mit der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten relativen Stereochemie des Presilpiperfol-1-en (**170**) stehen, sodass die postulierte Konfiguration von KÖNIG für das Presilpiperfol-1-en revidiert werden konnte (Weg d).

Das Presilpiperfolan-1 α -ol (**176**) konnte anhand der ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente ebenfalls als Produkt der Biotransformation von BcBOT2-F138V mit FPP nachgewiesen werden. Hierbei lag eine Übereinstimmung hinsichtlich der chemischen Verschiebungen in den ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren vor, sodass die Bildung eines Diastereomers ausgeschlossen und eindeutig Presilpiperfolan-1 α -ol (**176**) als isoliertes Produkt bestätigt wurde.^[209–211] Auf die Bestimmung der relativen Stereochemie wurde verzichtet, da diese bereits eingehend durch JOSEPH-NATHAN verifiziert wurde.^[211] Die absolute Stereochemie des Presilpiperfolan-1 α -ol (**176**) wurde weiterhin durch eine 15-stufige enantioselektive Totalsynthese bestimmt.^[212] TIEFENBACH gelang es, durch die Verwendung einer supramolekularen Resorcinaren-Kapsel als Katalysator die Synthese für das Produkt **176** auf vier Stufen zu verkürzen.^[213] Bei Presilpiperfolan-1 α -ol (**176**) handelt es sich um einen Naturstoff, der bereits aus dem Lebermoos *Concocephalum conicum* und aus dem Farn *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* isoliert worden ist.^[209,210] Zudem wurde die Verbindung als Umlagerungsprodukt ausgehend von *iso*-Caryophyllen durch Behandlung mit HSO₃F und SO₂Cl bei 120°C erhalten.^[214] Ferner konnten der Verbindung **176** antimycobakterielle Eigenschaften nachgewiesen werden.^[215]

Eine Strukturaufklärung der Verbindung **177** wurde zunächst dadurch erschwert, dass sowohl in den ¹H- als auch im ¹³C-NMR-Spektren breite und schlecht aufgelöste Signale ersichtlich waren, sodass die Verbindung als ineinander überführbare Konformationsisomere in Lösung existiert.^[213] Durch eine Tieftemperaturmessung bei 253.3 K in Toluol-*d*₈ gelang es einen kompletten Satz an scharfen Signalen zu erzielen, wodurch lediglich ein Konformer bei den gewählten Bedingungen ersichtlich ist. Das HSQC lieferte eine Summenformel von C₁₅H₂₅, sodass zum Erreichen der im MS-Spektrum nachgewiesenen Molmasse eine Hydroxygruppe im Molekül enthalten sein sollte. Während

die Hydroxygruppe im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum kein Signal zeigte, konnte diese im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum anhand der Tieffeldverschiebung ($\delta(^{13}\text{C}) = 73.0 \text{ ppm}$) des quartären Kohlenstoffatoms C-3 identifiziert werden. Zudem weist die Verbindung eine endozyklische Doppelbindung auf, die zwischen einem quartären Kohlenstoffatom und einer CH-Gruppe, die durch die chemische Verschiebung des olefinischen Protons identifiziert werden konnte, ausgebildet wird. Die Struktur der Verbindung konnte anschließend anhand der skalaren Kopplungen im COSY Spektrum sowie den $J^{2,3}(\text{C,H})$ -Kopplungen im HMBC Spektrum eindeutig bestimmt werden (**Abbildung 83**). Diese offenbarte, dass die Verbindung **177** aufgrund der olefinisch gebundenen Methylgruppe 14 bei Raumtemperatur insgesamt zwei mögliche Konformationen einnehmen kann, bei denen die Methylgruppe entweder nach oben (α) oder nach unten (β) weist. Durch eine Rotation innerhalb des beweglichen C-4/C-9-Segments können die beiden Konformationsisomere ineinander überführt werden. Ein entsprechendes Verhalten wurde bereits zuvor ausführlich für das *iso*-Germacren A (**123**) diskutiert (s. Kap. 3.12.3).

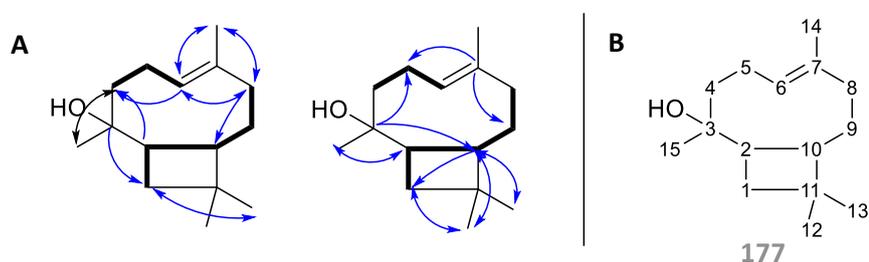


Abbildung 83: Strukturaufklärung der Verbindung **177**. A: Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (dick) und Kopplungen im HMBC Spektrum (Pfeile), B: Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum eingesetzten FPP (**12**).

Mit Hilfe von ausgewählten 1D-NOE-Experimenten konnte die relative Stereochemie der Verbindung aufgeklärt werden. Dabei konnte eine mit dem β -Caryophyllen (**24**) identische Verknüpfung des Cyclobutanrings nachgewiesen werden sowie eine *cis*-Konfiguration der endozyklischen Doppelbindung (**Abbildung 84**). Die Anordnung der Methylgruppen 12 und 13 konnte neben dem Magnetisierungstransfer zwischen H-10 und H-12 auch anhand der chemischen Verschiebungen im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum bestätigt werden. So konnte CANE durch Isotopenmarkierungsstudien zeigen, dass die Methylgruppe, die einen Magnetisierungstransfer mit dem verbrückten Proton H-10 aufweist und infolgedessen in die gleiche Richtung wie das Proton orientiert ist, eine höhere chemische Verschiebung erfährt.^[59] Das im Vergleich zum β -Caryophyllen (**24**) zusätzliche Stereozentrum am C-3 wurde anhand der Magnetisierungstransfers von H-14 mit H-13 und H-15 sowie einem fehlenden Effekt von H-15 mit H-10 und H-6 eindeutig aufgeklärt. Da das Proton H-10 entsprechend dem postulierten Mechanismus des PSP (**29**) β -orientiert sein sollte und in die entgegengesetzte Richtung wie die Methylgruppe 15 ausgerichtet ist, sollte die Addition des Wassers von unterhalb der Molekülebene erfolgen. Bezüglich der Methylgruppe 14 konnte bei 253.3 K in Toluol- d_8 für das vorliegende Konformer, aufgrund der beobachteten Magnetisierungstransfers, eine α -Orientierung bestimmt werden.

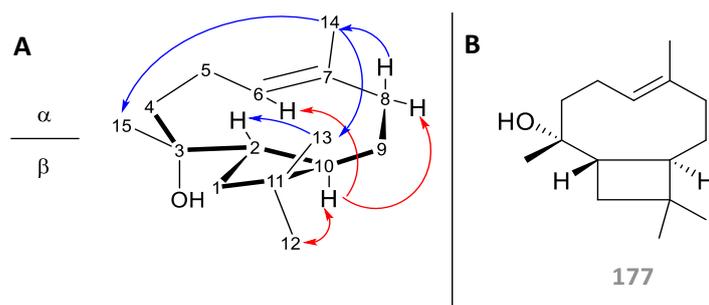


Abbildung 84: Aufklärung der relativen Stereochemie der Verbindung **177**. **A:** Ausgewählte 1D-NOE-Magnetisierungs-transfers. Als Pfeile angegeben sind Transfers zwischen Protonen oberhalb (α , blau) und unterhalb (β , rot) der Molekülebene angegeben. **B, C:** Resultierende relative Stereochemie für das Produkt Caryophyllen-8 α -ol (**177**).

Bei der Verbindung **177** handelt es sich um das literaturbekannte Caryophyllen-8 β -ol, welches allerdings bisher noch nicht als natürlich vorkommendes Produkt beschrieben worden ist. Stattdessen wurde **177** durch eine synthetische Umsetzung aus dem Caryophyllenoxid (**100**) gewonnen.^[163] Zudem stellt die Verbindung **177** ein Zwischenprodukt bei der Totalsynthese des Presilphiperfolan-1 α -ol (**176**) dar.^[163,213]

3.15.7 Postulierter Biosyntheseweg für die durch BcBOT2-F138V und BcBOT2-W118Q gebildeten Produkte

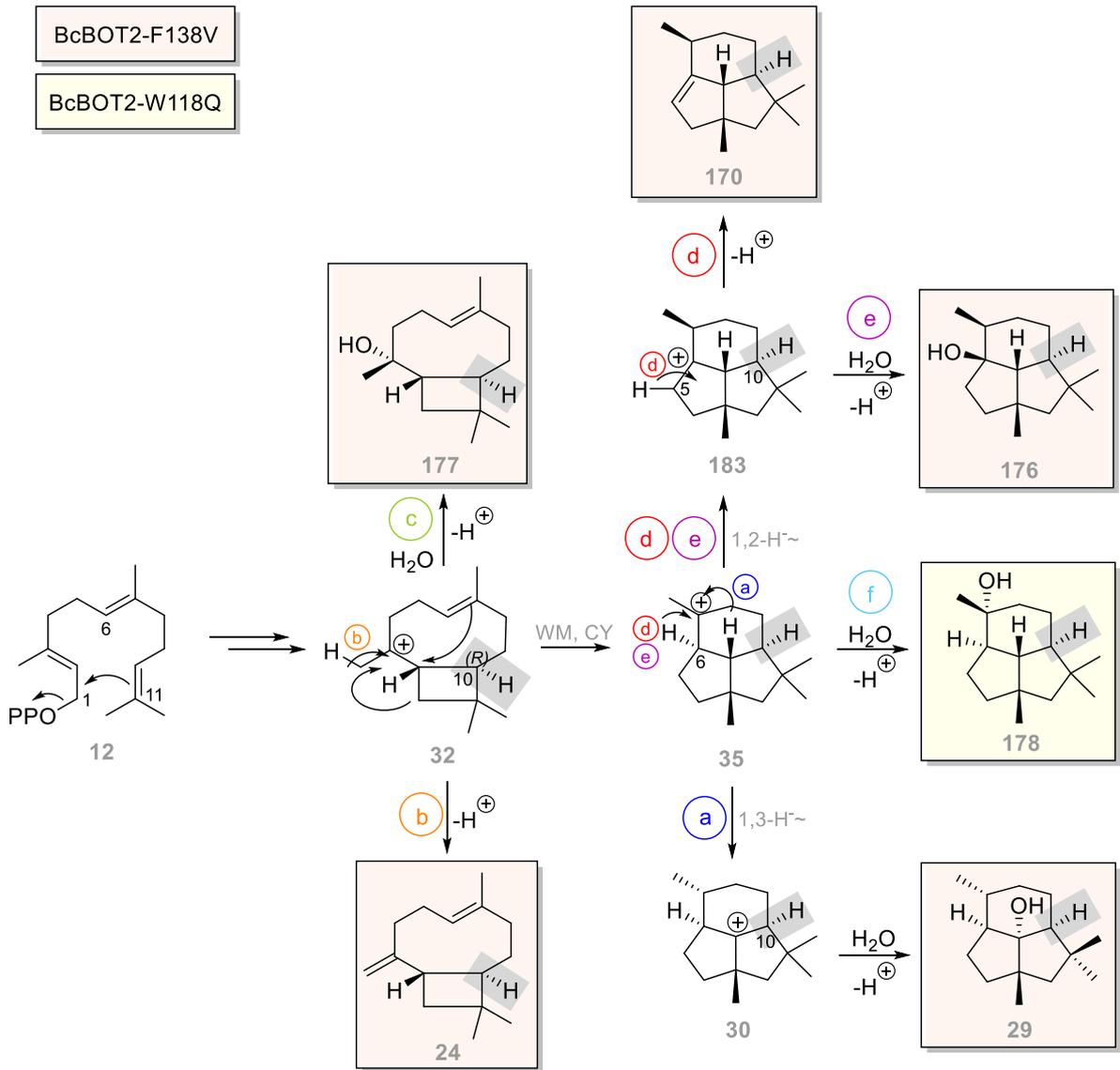
Bei der Biotransformation mit der Mutante BcBOT2-F138V konnten die fünf Hauptverbindungen erfolgreich isoliert und die Struktur aufgeklärt werden. Es zeigt sich, dass die Produkte **24**, **170**, **176** und **177** ausgehend von der Reaktionskaskade des PSP (**29**) gebildet werden könnten, wobei insbesondere das Caryophyllenylkation (**32**) und das carbokationische Zwischenprodukt **35** eine Schlüsselfunktion einnehmen (**Schema 30**). So könnte das isolierte β -Caryophyllen (**24**) durch eine Deprotonierung der endständigen Methylgruppe erhalten werden (Weg b), während das Caryophyllen-8 α -ol (**177**) durch Abfangen des tertiären Kations mit Wasser ausgebildet werden könnte (Weg c). Beide Produkte unterstützen zudem die Biosynthesewege von HANSON und TANTILLO, die eine Reaktionskaskade über das Caryophyllenylkation (**32**) für das PSP (**29**) postulierten (s. Kap. 1.3.3).^[57,61] Für die Bildung der Produkte **170** und **176** wurden bereits mögliche Biosynthesewege postuliert.^[53,212,213] Diese verlaufen ebenso wie die Bildung des PSP (**29**) über das intermediäre Zwischenprodukt **35**. Anstelle eines 1,3-Hydrid-Shifts, wie es bei Biosynthese des PSP (**29**) der Fall ist (Weg a) und welches ebenfalls durch die Mutante F138V ausgebildet wurde, findet ein 1,2-Hydrid-Shift des verbrückten Protons an C-6 statt (Weg e und d), sodass das Kation **183** entsteht. Ausgehend von **183** bildet sich das Presilphiperfolan-1 α -ol (**176**) durch Abfangen des tertiären Carbokations mit Wasser. Das Dehydratisierungsprodukt Presilphiperfol-1-en (**170**) kann hingegen durch eine Deprotonierung an der Position 5 erhalten werden.

Die Vergrößerung der aktiven Tasche und die Auslöschung der Kation- π -Wechselwirkung durch die Mutante BcBOT2-F138V führt zu multiplen Reaktionspfaden, wodurch dem Enzym eine ausgeprägte Produktpromiskuität verliehen wurde. Ob die Erweiterung der Tasche oder der Wegfall der elektrostatischen Wechselwirkung verantwortlich für die Bildung eines Multiproduktspektrums ist, kann aufgrund fehlender Kristallstrukturen der STC BcBOT2 nicht näher bestimmt werden.

Allerdings kann anhand der postulierten Mechanismen eindrucksvoll gezeigt werden, dass ausgehend von den Zwischenprodukten **32** und **35** neue Reaktionspfade eröffnet werden, die von dem punktmutierten Enzym gleichberechtigt zum Biosyntheseweg des PSP (**29**) genutzt werden. Während die vorzeitige Beendigung der Reaktionskaskade zu den Produkten **24** und **177** führt, wird ein neuer Reaktionspfad durch einen 1,2-Hydrid-Shift erzeugt. Damit Letzterer erfolgen kann, sollte die Mutante im Gegensatz zum WT eine zusätzliche Stabilisierungsmöglichkeit für das entstehende Intermediat **183** aufweisen, aus dem sich anschließend die Produkte **170** und **176** bilden.

Das Produkt Presilphiperfolan-9 β -ol (**178**), dessen Biosynthese ebenfalls eingehend untersucht wurde^[53,208,213], konnte durch die Mutante BcBOT2-W118Q als Hauptprodukt der enzymatischen Katalyse erzeugt werden (**Schema 30**, Weg f). Die Biosynthesewege von **178** und PSP (**29**) divergieren erneut am carbokationischen Zwischenprodukt **35**, sodass diesem eindeutig eine Schlüsselfunktion in der Reaktionskaskade zuteil kommt. Durch die Mutation wird der 1,3-Hydrid-Shift und somit die Bildung des Zwischenprodukts **30** nahezu vollständig unterdrückt. Stattdessen wird das tertiäre Kation **35** durch Addition von Wasser abgefangen und die Reaktionskaskade frühzeitig beendet. Da die Mutante die Bildung des PSP (**29**) hemmt, scheint diese einen direkten Einfluss auf die Reaktionskaskade nach Ausbildung des intermediären Kations **35** zu nehmen. Denkbar wäre daher die Stabilisierung des Zwischenprodukts **30** oder des 1,3-Hydrid-Shifts durch die AS W118. Alternativ könnten jedoch durch die Verkleinerung der aktiven Tasche auch potentielle Wechselwirkungspunkte des Enzyms mit dem Substrat ausgeschlossen werden, sodass der Reaktionspfad zur Bildung des PSP (**29**) unzugänglich wird. Ob die Volumenveränderung der aktiven Tasche oder die AS W118 für die vorzeitige Beendigung der Reaktionskaskade verantwortlich ist, kann ohne eine vorliegende Kristallstruktur der STC BcBOT2 nicht abschließend geklärt werden.

Anhaltspunkte zur absoluten Stereochemie der Verbindungen **24**, **170** sowie **176-178** können auf Grundlage von mechanistischen Überlegungen erhalten werden. So wurde die absolute Stereochemie des natürlichen Produktes PSP (**29**) bereits durch Isotopenmarkierungsstudien, einer kristallographischen Analyse und mittels Totalsynthese eindeutig verifiziert.^[52,62,63] Da alle isolierten Verbindungen in Analogie zum Produkt PSP (**29**) ebenfalls über das Intermediat **32** verlaufen, wird auch das (*R*)-konfigurierte Stereozentrum an C-10 (grau markiert) in **32** für alle Verbindungen in gleicher Weise ausgebildet. Da dieses im weiteren Biosyntheseverlauf unverändert bleibt, könnte es als stereogener Anker fungieren und zur Bestimmung der absoluten Stereochemie herangezogen werden. Da die Strukturaufklärung jedoch mittels relativer Analysemethoden erfolgte, kann die Bildung von Enantiomerenpaaren auch bei den Mutagenesestudien nicht vollends ausgeschlossen werden.



Schema 30: Postulierte Mechanismen zur Bildung der isolierten Verbindungen **24**, **170** und **176-178** durch die Mutanten BcBOT2-W118Q und -F138V ausgehend von dem postulierten Biosyntheseweg des PSP (**29**) (s. Kap.1.3.3), durch die Mutanten BcBOT2-F138V und BcBOT2-W118Q. Die Hauptprodukte, die durch die Mutante F138V gebildet wurden, sind orange eingefärbt, während das Produkt **178** aus der Katalyse mit der Mutante W118Q gelb hinterlegt ist. Die Abweichungen von der Biosynthese des PSP (**29**) (Weg a) sind durch die Reaktionspfade b-f gekennzeichnet. Grau hinterlegt ist jenes Stereozentrum, welches zur Bestimmung der absoluten Stereochemie verwendet werden kann.

4 Zusammenfassung und Ausblick – Thema I

Durch die Biotransformationen der STCn BcBOT2 und PenA mit den unnatürlichen Substraten gelang die Isolierung und Strukturaufklärung neuer unnatürlicher Terpenoide. Durch die von OBERHAUSER^[112] optimierten Bedingungen der heterologen Expression konnten die STCn BcBOT2 und PenA erfolgreich als lösliches Protein erhalten werden. Das Protein wurde anschließend durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und direkt für die analytischen und semi-präparativen Umsetzungen eingesetzt. Durch die Optimierung im analytischen Maßstab war es möglich die Produktausbeuten der natürlichen Produkte PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) deutlich zu steigern, sodass mit semi-präparativen Umsetzungen ausreichend Produkt für eine Isolierung und Strukturaufklärung erzielt werden kann. Durch die analytischen Enzymtests wurde zudem die Substratazeptanz für das Heteroatom-modifizierte Substrat **78** sowie für die unnatürlichen methylverschobenen Derivate **109-111** nachgewiesen. Den STCn kann folglich eine Substratpromiskuität zugeschrieben werden.

Durch die semi-präparativen Umsetzungen der STCn mit dem natürlichen Substrat FPP (**12**) wurden die literaturbekannten Produkte PSP (**29**) und Pentalenen (**37**) durch NMR-spektroskopische Strukturaufklärung bestätigt. Zudem war es erstmals möglich für beide Biotransformationen Nebenprodukte qualitativ anhand der RI und MS-Spektren zu bestimmen, weshalb die STCn über eine geringfügig aufgeprägte Produktpromiskuität verfügen. Für alle detektierten Nebenprodukte konnten weiterhin postulierte Biosynthesewege formuliert werden. Insbesondere der Nachweis des Sesquiterpens Germacren A (**62**) offenbarte, dass beide STCn ebenfalls über eine geringfügige katalytische Promiskuität verfügen. Das einige der Nebenprodukte sowohl durch die STC BcBOT2 als auch durch die STC PenA gebildet werden, deutet auf eine strukturelle und katalytische Verwandtschaft der beiden Synthasen hin.

Durch die semi-präparativen Ansätze der unnatürlichen Substrate mit der STCn BcBOT2 konnten insgesamt neun unnatürliche Terpenoide isoliert und aufgeklärt werden (**Abbildung 85, A**). Hierbei zeigte sich, dass mit den unnatürlichen Substraten **78** und **110** jeweils zwei Hauptprodukte gebildet wurden, sodass die STCn BcBOT2 durch die Substrate von einer spezifischen in eine promiske STCn überführt wird. Mit dem unnatürlichen Substrat **111** wurde hingegen *iso*-Germacren A (**123**) isoliert, welches als drei verschiedene Konformere in Lösung existiert. Eine thermische Belastung des Produkts führte zudem nachweislich zur Bildung des COPE-Umlagerungsprodukts *iso*- β -Elemen (**122**). Eine olfaktorische Analyse zeigte, dass die gebildeten Terpenoide ausgeprägte sensorische Profile aufweisen, die sich durch fruchtige, citrische, pfeffrige, campherartige, etherische und würzige Noten auszeichnen. Für alle isolierten Produkte gelang zudem die Aufstellung von postulierten Biosynthesewegen. Zudem wurden Überlegungen zur absoluten Stereochemie der Verbindungen angestellt. Die STC PenA lieferte mit dem heteroatom-modifizierten Substrat **78** insgesamt sechs Hauptprodukte, die isoliert und aufgeklärt wurden. Interessanterweise wurde mit der STC PenA ebenfalls das trizyklische Terpenoid **112** ausgebildet, was als weiterer Hinweis auf eine strukturelle und katalytische Verwandtschaft der beiden STCn gewertet werden kann. Eine weitere Erhöhung der Produktausbeuten könnte durch die Etablierung eines segmentierten Flow-

Prozesses erreicht werden, welcher bereits durch TANG bei der Biotransformation mit der Aristolochen-Synthase erfolgreich angewendet wurde.^[216] Ein weiterer vielversprechender Ansatz findet sich in der Immobilisierung der STCn, wodurch die Enzymstabilitäten erhöht werden könnten.^[7] Als weitere unnatürliche Substrate würden sich zudem Derivate anbieten, die neben einer Heteroatom-Modifizierung auch über ein verschobenes Methylierungsmuster verfügen.

Das Terpenoid **112** wurde in einem weiteren Teilprojekt als Edukt für semi-synthetische Umsetzungen eingesetzt. Hierbei führten eine RILEY-Oxidation sowie eine Ozonolyse mit nachfolgender Reduktion zu drei weiteren oxyfunktionalisierten unnatürlichen Terpenoiden (**Abbildung 85, B**). Eine olfaktorische Analyse zeigte jedoch, dass die Produkte über kein sensorisches Profil verfügen. Zukünftige Oxyfunktionalisierungen würden allerdings zu einer weiteren Steigerung der Diversität der Naturstoffklasse beitragen. Die absolute Stereochemie des gebildeten sekundären Alkohols **167** könnte zudem durch eine MOSHER-Ester Analyse aufgeklärt werden.

Für die ortsspezifische Mutagenese wurden insgesamt 10 Mutationsstellen anhand eines zuvor erzeugten Homologiemodells ausgewählt und hergestellt. Analytische Enzymtests mit dem natürlichen Substrat FPP offenbarten, dass fünf der Mutanten ein vergleichbares Produktspektrum wie der WT erzeugten und somit nicht direkt an der Stabilisierung der carbokationischen Reaktionskaskade beteiligt sind. Der Austausch der basischen Aminosäure Arginin (R373) führte zu einer Inaktivierung des Enzyms, sodass diese essentiell für die Aktivität der STC BcBOT2 zu sein scheint. Während eine weitere Mutante (W118Q) zur Bildung eines neuen Hauptproduktes führte, wurden mit den verbliebenen zwei Mutanten (F138) Multiproduktspektren erzeugt. Durch eine einzige Punktmutation war es daher möglich die zuvor hoch spezifische STC BcBOT2 in eine promiske STC zu überführen. Eine Isolierung und Strukturaufklärung der Produkte ermöglichte zudem die Aufstellung von postulierten Biosynthesewegen, die Aussagen zur Funktion der ausgetauschten Aminosäuren in der aktiven Tasche ermöglichten (**Abbildung 85, C**). Insbesondere die thermostabilen Mutanten könnten im weiteren Verlauf als Ausgangspunkte für die Erstellung von Doppelmutanten oder für die gerichtete Evolution genutzt werden, da sich diese Mutanten oftmals als robust gegenüber der Einführung weiterer Mutationsstellen erwiesen haben.^[110] Für die gerichtete Evolution ist jedoch zunächst die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screening Verfahrens unabdingbar. Für weitere ortsspezifische Mutagenesestudien wäre zudem die Aufklärung der Kristallstruktur der STC BcBOT2 ein wichtiger Ansatzpunkt, um gezielter potentielle Mutationsstellen identifizieren zu können.

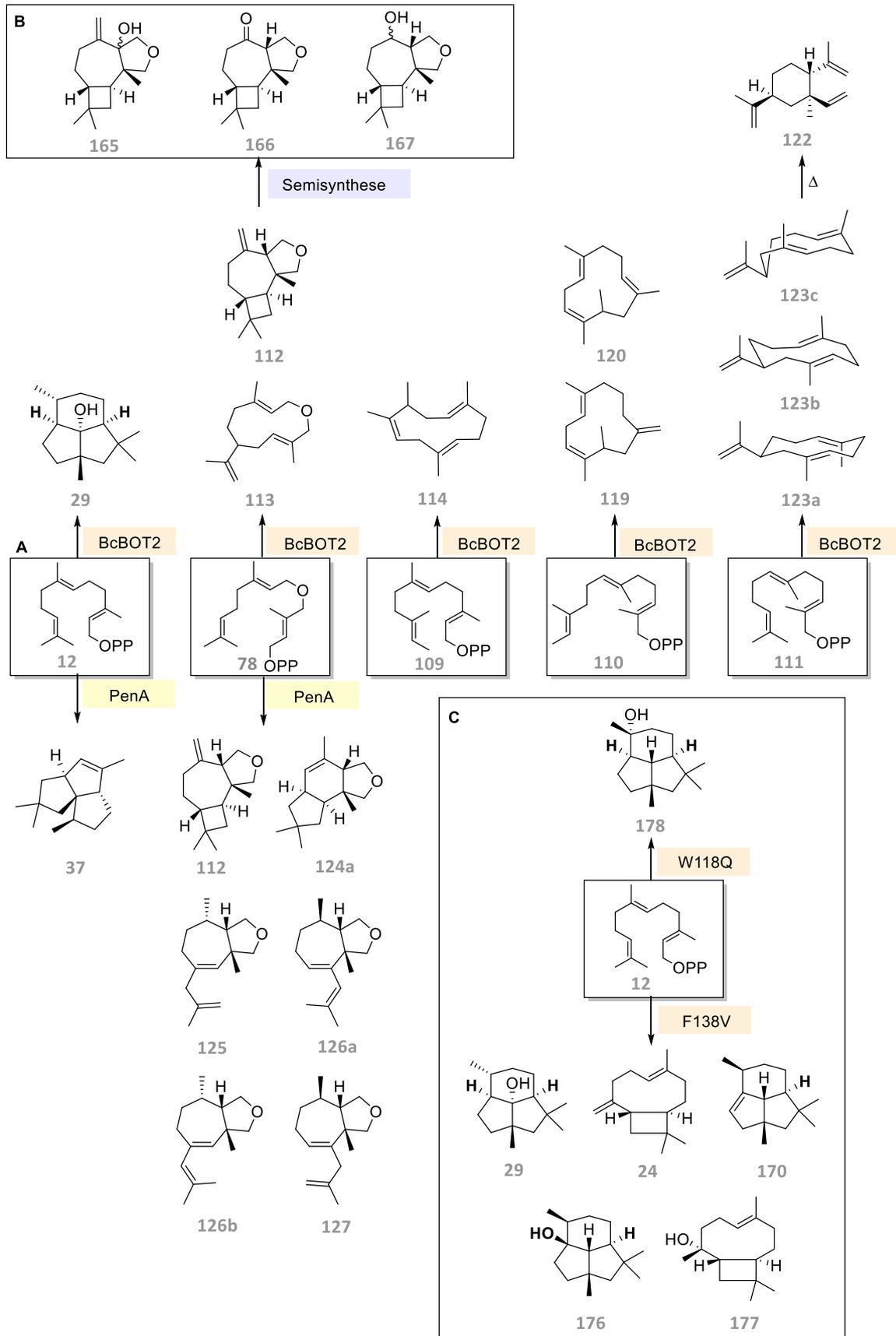


Abbildung 85: Durch semi-präparative Umsetzungen isolierte und mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärte unnatürliche Terpene. **A:** Biotransformationen des natürlichen Substrats FFP (**12**) und der unnatürlichen Substrate **109-111** mit den STCn BcBOT2 und PenA, **B:** Semi-synthetische Umsetzungen mit dem Terpenoid **112**, **C:** Ortsspezifische Mutagenese der STC BcBOT2 und isoliertes Produktspektrum der Mutanten W118 und F138V.

5 Einleitung – Thema II

5.1 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) zählen zur Familie der Serin-Hydrolasen und sind ubiquitär in der Umwelt anzutreffen.^[217,218] So kommen sie in nahezu allen Pflanzen und Tieren vor und sind auch Bestandteil vieler Mikroorganismen.^[217] Im Organismus übernehmen sie vielfältige Funktionen im Stoffwechsel von Speicher- und Nahrungsfetten.^[217] Die meisten kommerziell erhältlichen Lipasen sind mikrobiellen Ursprungs oder stammen aus Magen und Pankreasextrakten von Säugetieren.^[217] Die Lipasen werden in immobilisierter Form, als Ganzellsysteme oder auch in lyophilisierter Form verwendet.^[219] Dabei ist die physiologische Rolle der Lipasen die katalytische Transformation von Triglyceriden zu Di- und Monoglyceriden, Fettsäuren und Glycerol.^[218] Die Reaktionen zeichnen sich durch eine ausgeprägte Enantio-, Regio- und Stereoselektivität aus, wobei das Vorhandensein einer Wasser-Lipid Grenzschicht mit Ausnahme einiger weniger Lipasen unabdingbar für die Enzymaktivität ist.^[4,217]

Die Regioselektivität der Lipasen kann dabei in drei Bereiche unterteilt werden.^[220] Während Nicht-spezifische Lipasen alle drei Esterfunktionen hydrolysieren werden im Falle von 1,3-spezifischen Lipasen Mono- oder Diglyceride erhalten, wobei die Lipasen stereospezifisch zwischen den Positionen 1 und 3 der Triglyceride unterscheiden können. Fettsäurespezifische Lipasen hingegen spalten explizit nur langkettige oder ungesättigte Substrate.^[220,221] Da die Lipasen als Katalysatoren in chemischen Gleichgewichtsreaktionen fungieren, sind sie ebenfalls in der Lage Veresterungen oder Umesterungsreaktionen zu katalysieren. Diese Reaktionen finden in nicht-wässrigen Medien statt.^[218] Dadurch weisen die Lipasen ausgeprägte katalytische und konditionspromiske Eigenschaften auf. Lipasen verfügen weiterhin über eine breite Substratpromiskuität, da sie neben den Triglyceriden auch aliphatische, aromatische und metallorganische Ester spalten sowie verschiedene substituierte Alkohole akzeptieren.^[217,220,222,223]

Aufgrund ihrer promiskiven Eigenschaften sowie der Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln haben sie eine breite Anwendung bei biotechnologischen Prozessen in der Industrie. So werden Lipasen bei der Erzeugung von Biodiesel^[219], als Waschmittelzusätze^[217] und bei der Synthese enantiomerenreiner Bausteine für Pharmazeutika verwendet.^[217,224,225] Auch in der Lebensmittel-, Leder-, Käse-, Öl- und Papierindustrie haben Lipasen ein breites Einsatzspektrum.^[225,226] Um die Aktivität und Selektivität zu erhöhen wurden neben der gerichteten Evolution auch Studien zur Immobilisierung der Lipasen durchgeführt.^[218]

5.1.1 Struktur

Lipasen verfügen über eine charakteristische α/β -Faltblattstruktur, die aus acht nahezu parallelen β -Faltblättern besteht, welche beidseitig von α -Helices umgeben sind.^[4,227] Zudem besitzen sie im aktiven Zentrum eine katalytische Triade, die sich aus einem nucleophilen Serin sowie Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure und Histidin zusammensetzt.^[4,217,227] Ein weiteres Strukturmerkmal ist eine hoch konservierte Konsensussequenz (**G,AxSxG**) die das Serin der

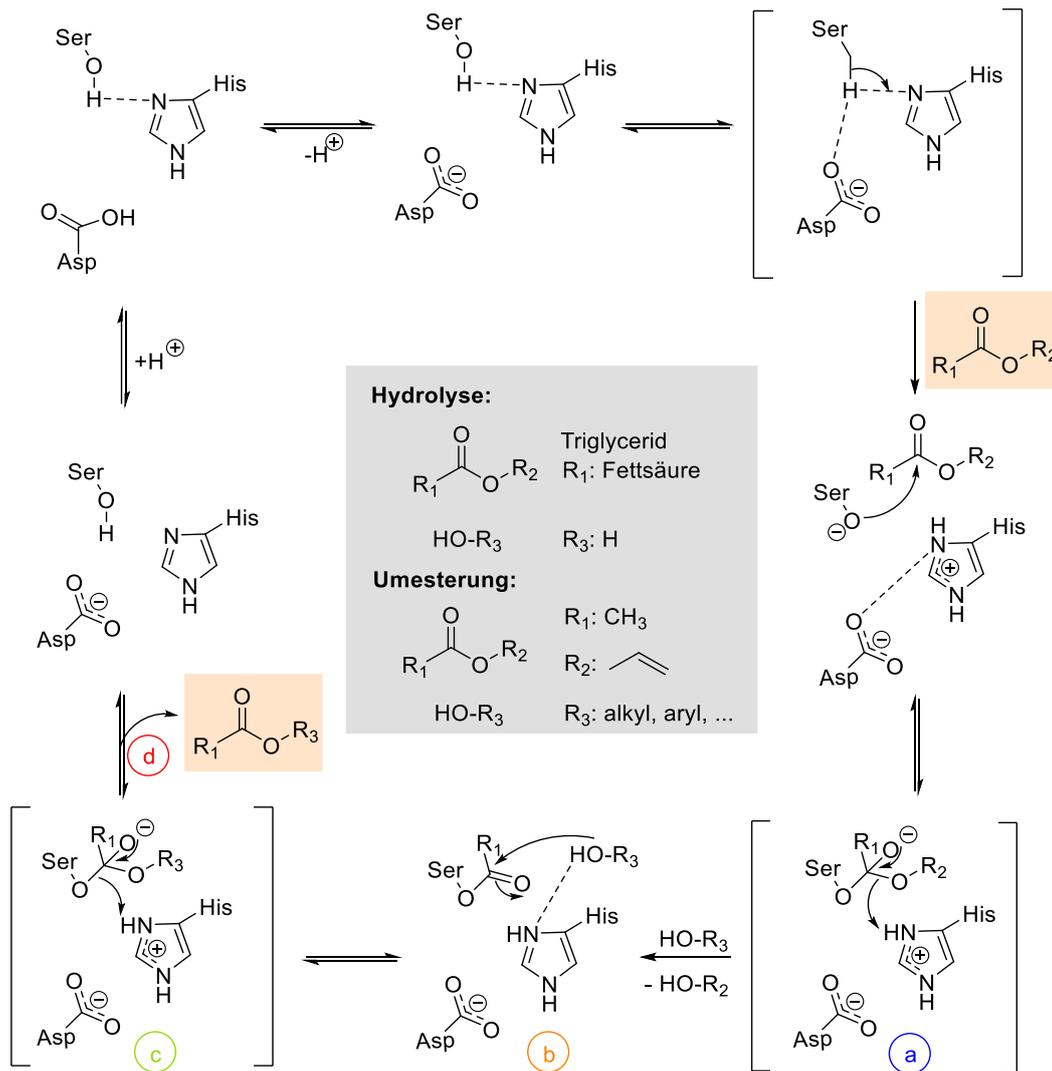
katalytischen Triade einschließt und sich zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix ausbildet.^[217,220] Charakteristisch ist zudem ein amphiphiler „Deckel“, der das aktive Zentrum erst bei Anwesenheit einer Grenzphasenfläche oder eines organischen Lösemittels freigibt und somit für die Grenzflächenaktivität verantwortlich ist.^[4,217,228] Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass nicht alle Lipasen zwingend eine solche abschirmende Oligopeptidereinheit besitzen.^[221]

Lipasen verfügen insgesamt über vier Substratbindetaschen. Drei Bindetaschen für die Fettsäuren sowie einer in allen Lipasen vorkommenden Oxyanion-Bindestelle, die durch zwei Amidreste des N-Terminus und dem C-terminalen Nachbarn des essentiellen Serins ausgebildet wird.^[220,229] Anhand der Geometrie der Bindetaschen können die Lipasen in drei Untereinheiten differenziert werden. Neben einer nahe an der Oberfläche befindlichen Bindetasche mit einer spaltartigen hydrophoben Öffnung, kann weiterhin in tunnelartige und trichterförmige Bindetaschen unterschieden werden.^[220]

5.1.2 Katalytischer Mechanismus

Der katalytische Mechanismus der Lipasen ist vergleichbar mit denen der Serin Proteasen, da diese ebenfalls Serin als Bestandteil der katalytischen Triade aufweisen.^[227] Ob eine Hydrolysereaktion oder eine Umesterung bzw. Veresterung stattfindet hängt entscheidend von der Anwesenheit von Wasser ab.^[218] Während für die Hydrolyse aufgrund der unterschiedlichen Polarität von Substrat und Enzym eine Wasser-Lipid-Grenzschicht oftmals unerlässlich ist, findet die Rückreaktion unter Ausschluss von Wasser statt.^[218,230,231] Neben einem Alkohol wird für die Veresterung zudem ein Acyldonor benötigt. Hierbei werden oftmals Vinylester verwendet, da das anfallende Nebenprodukt zum Aldehyd tautomerisiert und somit dem chemischen Gleichgewicht entzogen wird.^[228] Zusätzlich sind Lipasen in der Lage auch Alkohololyse, Azidolyse und Aminolyse zu katalysieren.^[218,230]

Sowohl die Umesterung als auch die Hydrolyse findet an der katalytischen Triade statt (**Schema 31**). Dazu wird das in den Bindetaschen befindliche Triglycerid (Hydrolyse) bzw. der Acyldonor (Umesterung) am Carbonylkohlenstoff durch das Sauerstoffatom der Serin-Seitenkette nucleophil angegriffen. Dabei entsteht ein tetrahedrales Zwischenprodukt, dessen Oxyanion durch die AS-Seitenketten der Alkoholbindetasche stabilisiert wird (a). Der Zerfall des Intermediats geht mit einem Verlust eines Alkohols einher, sodass sich ein Acylenzym ausbildet (b). Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Biosynthese. Die Addition von Wasser (Hydrolyse) bzw. eines Alkohols (Umesterung) führt zur Ausbildung eines weiteren tetrahedralen Übergangszustands (c), dessen Zerfall zur Freisetzung einer Fettsäure (Hydrolyse) bzw. eines Esters (Umesterung) führt (d). Anschließend findet eine Regenerierung der Lipase statt.^[218,220,227,228] Der postulierte katalytische Mechanismus kann somit als eine primäre Acylierung des Serins und einer anschließenden formalen Acylierung von einem Wasser- oder Alkoholmolekül zusammengefasst werden.^[217]



Schema 31: postulierter Mechanismus zur Lipase-katalysierten Hydrolyse in wässrigen Medien und Veresterung mit Vinylacetat (R_2) als Acyldonor in organischen Lösemitteln. Relevante Reaktionsschritte sind die die Bezeichnungen a-d gekennzeichnet und sind im Fließtext näher beschrieben.^[218,232]

5.1.3 Lipase *Candida rugosa*

Die Lipase *Candida rugosa* (CrL) wurde erstmals in den frühen 60iger Jahren beschrieben und weist mindestens sieben Gene auf, die an der Lipasenproduktion beteiligt sind.^[233] Bisher konnten bereits fünf Isoenzyme der CrL (LIP1-5) vollständig biochemisch charakterisiert werden (**Abbildung 86**).^[233,234] Die Gene der Isoenzyme LIP1-5 werden durch 534 AS codiert und verfügen allesamt über ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa.^[235] Sie weisen eine Sequenzidentität von 85-90 % auf und haben zudem gemeinsam, dass sich die katalytische Triade aus den Aminosäuren S_{209} , H_{449} und E_{341} zusammensetzt.^[236] Zudem verfügen die Isoenzyme über ein tunnelartiges aktives Zentrum, dessen Größe durch die Anzahl der Phenylalanin-Reste bestimmt wird.^[233] Die Oxyanion-Bindetasche wird bei der CrL durch die AS-Reste G_{123} , G_{124} und A_{210} ausgebildet.^[236]

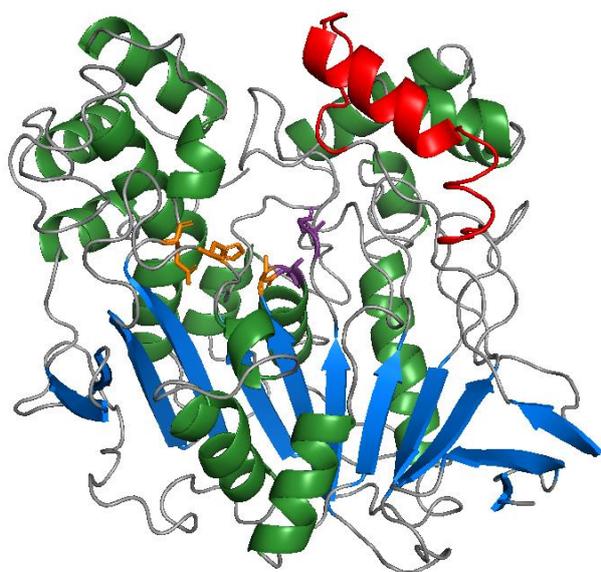


Abbildung 86: Kristallstruktur des Isoenzym LIP1 in der offenen Konformation (1CRL). In blau sind die β -Faltblätter und die grün die α -Helices des α/β -Faltmotivs abgebildet. Die α -Helix des amphiphilen „Deckels“ ist in rot markiert. In orange ist weiterhin die katalytische Triade und in violett die relevanten AS der Oxyanion-Bindestelle eingezeichnet.^[234]

nicht-spezifisch agiert und alle Esterfunktionen der Triglyceride mit gleicher Geschwindigkeit und Wahrscheinlichkeit spaltet.^[238] Zudem verfügt die Lipase CrL über eine (*S*)-Stereopräferenz. Dies konnte bereits eindrucksvoll in Umsetzungen mit racemischen (–)-Menthol (**1**) und dem Analgetikum Naproxen unter Beweis gestellt werden.^[239]

5.2 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) zählen zur Klasse der Oxidoreduktasen (EC 3.13.11.12) und werden den Nicht-Häm-Eisen-haltigen Dioxygenasen zugeordnet.^[240–242] LOXn wurden erstmals vor etwa 90 Jahren beschrieben und isoliert.^[243] und sind eine der am weitreichsten untersuchten Enzymklassen in Pflanzen und Tieren.^[244,245] Sie katalysieren die regio- und stereospezifische Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit mindestens einer (1*E*,4*E*)-Pentadieneinheit durch molekularen Sauerstoff.^[240,244–247] Als Produkte werden chirale *E,Z*-konfigurierte Hydroperoxide (HPOD) sowie die daraus abgeleiteten Metabolite erhalten.^[248,249] LOXn sind ubiquitär in der Umwelt zugegen und sowohl in Tieren als auch höheren Pflanzenarten zu finden.^[240,245,250] Weiterhin wurden sie Pilzen und Mikroorganismen sowie Cyanobakterien nachgewiesen, sind jedoch nur geringfügig in Prokaryoten vertreten.^[249,250] LOX-katalysierte Verbindungen initiieren die Biosynthese der Lipidmediatoren, wobei die gebildeten HPOD verschiedenste Funktionen im Organismus wahrnehmen.^[249,251] So werden sie in Pflanzen zur Mobilisierung von Lipiden für die Energieproduktion, für strukturelle Funktionen sowie für die Membranpermeabilisierung benötigt.^[240,246,249,252] In Säugetieren scheinen die LOXn an der Membranmodifikation und an der Zelldifferenzierung beteiligt zu sein.^[252] Zudem dienen die HPOD als Ausgangsverbindungen für eine

Hinsichtlich des isoelektrischen Punkts sowie dem Glykolisierungsgrad divergieren die Isoenzyme. Ebenso wie bei dem aus 31 AS bestehenden amphiphilen „Deckel“, bei dem lediglich 14 konservierte AS innerhalb der Isoenzyme identifiziert wurden.^[233] Die Isoenzyme weisen infolge der Abweichungen unterschiedliche bio-katalytische Eigenschaften auf. So besitzen bspw. die Isoenzyme LIP2 und LIP3 die Charakteristika einer Cholesterolesterase.^[236] Auch hinsichtlich der Substratazeptanz zeigte sich in Studien, dass die LIP1 bevorzugt lineare primäre Alkohole umsetzt, während die Isoenzyme LIP2 und LIP3 auch sterisch anspruchsvolle Alkohole akzeptierten.^[237] In Bezug auf die Regioselektivität der CrL konnten BENZOANA und ESPOSITIO nachweisen, dass die Lipase

Reihe von Sekundärmetaboliten^[253,254], die auch als Oxylipine²⁶ bezeichnet werden und über antimikrobielle und antimykotische Eigenschaften verfügen.^[250,251] In Pflanzen werden die HPOD zu Jasmonsäure und Aldehyden metabolisiert^[251], weshalb sie einen entscheidenden Anteil an den Wundheilungsprozessen und Schutzmechanismen der Pflanze haben.^[244,250,252,254] In Pilzen entstehen aus den HPOD wiederum Diole und Lactone. Zudem regulieren die HPOD die Mykotoxin-Produktion.^[251] In Säugetieren dienen die HPOD als Vorläufer für die Bildung von regulatorischen Molekülen wie die Lipoxinen und Leukotrienen, die an Entzündungen, Asthma, Herzerkrankungen und auch Krebs beteiligt sein können.^[245,250–252,254] Daher ist die Identifikation von menschlichen LOX-Inhibitoren ein wichtiges Forschungsgebiet, um potentielle Medikamente für diese Erkrankungen zu entwickeln.^[252]

Während pflanzliche LOXn²⁷ als Hauptsubstrate Linolsäure (LA) und Linolensäure akzeptieren,^[244,255] nutzen tierische LOXn Arachidonsäure als Substrat zur Bildung der HPOD.^[253] Da sich tierische und pflanzliche LOXn in Abhängigkeit ihrer Herkunft maßgeblich hinsichtlich ihrer Regioselektivität unterscheiden, werden sie entsprechend dieser klassifiziert.^[241,244,246,250,251] Bei Enzymen pflanzlicher Herkunft erfolgt die Klassifizierung anhand des Substrats LA, sodass sie in 9- und 13-LOXn unterteilt werden.^[250,251] Tierische LOXn haben aufgrund des Substrats Arachidonsäure die Möglichkeit mehrere Positionen zu oxidieren, weshalb dort eine Klassifizierung in 5-, 8-, 12- und 15-LOX erfolgt.^[250] Mikroorganismen nutzen neben LA auch Oleinsäure, weshalb sie zusätzlich über 10- und 11-LOXn verfügen.^[250] Weiterhin liegen LOXn einer Art häufig als verschiedenste Isoenzyme vor^[246], die sich hinsichtlich des pH-Werts, der Substrat- und Produktspezifität, Regioselektivität und der Cooxidationseigenschaften unterscheiden.^[240,244,256–259] Pflanzliche LOX-Isoenzyme können daher anhand ihres pH-Optimums sowie ihrer Primärstruktur *sub*-klassifiziert werden.^[246,251] So weisen *Typ-1*-LOXn ein alkalisches pH-Optimum auf und sind extraplastidiale Enzyme, die kein Transferpeptid aufweisen, dafür jedoch eine Sequenzidentität von mehr als 75 % aufweisen.^[251] *Typ-2*-LOXn zeigen hingegen im neutralen pH-Bereich die höchste Enzymaktivität, tragen eine Chloroplastentransfer-Sequenz^[250,260] und verfügen nur über eine geringere Sequenzidentität (> 35 %).^[251] Während zu den *Typ-1*-LOXn sowohl 9- als auch 13-LOXn zählen, gehören der *Typ-2*-LOX nur 13-LOXn an.^[250] Neben den genannten typischen Substraten akzeptieren die LOXn auch Phospholipide, Galactolipide, Cholesterol Ester und Biomembranen sowie geladene Substrate bei denen die Carboxylgruppe der Fettsäure substituiert wurde.^[240,246,251,252]

In industriellen Prozessen werden LOXn aufgrund ihrer hohen Umweltfreundlichkeit bei der Herstellung von Aromastoffen, der Produktion von lipidabstammenden Chemikalien, der Modifizierung von Lipiden aus Rohstoffen und der Bleichung von gefärbten Komponenten verwendet sowie in der Lebensmittelherstellung und olechemischen Produktion.^[250] Auch bei der Brotherstellung werden LOXn insbesondere wegen ihrer bleichenden Eigenschaften sowie einer

²⁶ Als Oxylipine werden allgemein alle Oxidationsprodukte der mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie deren Derivate bezeichnet.^[246] Die Bildung der Oxylipine kann neben der enzymatischen Umsetzung mit LOXn auch durch die Biosynthese mit einer α -Dioxygenase erfolgen.^[255]

²⁷ In pflanzlichen LOX befindet sich das Substrat Linolensäure hauptsächlich im Pflanzengewebe, während die Linolsäure in den Pflanzensamen hauptanteilig enthalten ist.^[242]

einhergehenden besseren Mischbarkeit und Rheologie des Teigs eingesetzt.^[245,259] Intrinsische LOXn in Lebensmittelrohstoffen können jedoch bei der Lagerung der Produkte einen negativen Einfluss auf die Qualität des Endprodukts nehmen, etwa in Form von Geschmacks- und Farbveränderungen. Auch können sie die antioxidativen Eigenschaften des Rohstoffes aufgrund der autoxidativen Bildung der reaktiven Hydroperoxide negativ beeinflussen.^[244,250,261]

5.2.1 Strukturmerkmale der Lipoxygenasen

LOXn bestehen aus einer monomeren Peptidkette, die bei pflanzlichen LOXn ein Molekulargewicht von 94 kDa - 104 kDa und bei tierischen LOXn eine molekulare Masse von 75 kDa - 80 kDa aufweisen kann.^[254] Der Größenunterschied kann auf zusätzlichen Schleifen innerhalb der pflanzlichen LOXn zurückgeführt werden.^[249] Als Referenzstruktur für alle tierischen und pflanzlichen LOXn wird die von BOYINGTON beschriebene Kristallstruktur des Isoenzym LOX-1 aus Sojabohnen (*Glycine max*) angesehen.^[249,262] Allen bisherigen aufgeklärten LOXn ist gemeinsam, dass sie sich aus zwei Domänen zusammensetzen: Einer etwa 25 - 30 kDa großen N-terminalen β -Fasstruktur, die auch als *PLAT* (*Polycystin-1*, *LOX*, α -*Toxin*) bzw. als „C2-ähnliche“ Domäne²⁸ bezeichnet wird sowie einer am C-Terminus befindlichen größeren (55 - 65 kDa) α -helikalen Domäne, in der sich das aktive Zentrum befindet (**Abbildung 87, A**).^[249–251] Zwischen den Domänen wird eine direkte Kommunikation durch eine Kation- π -Wechselwirkung angenommen, die zwischen einem Tryptophan-Rest der PLAT-Domäne und einem Lysin-Rest der katalytischen Domäne ausgebildet wird und sowohl in pflanzlichen als auch tierischen LOXn vorkommt.^[249]

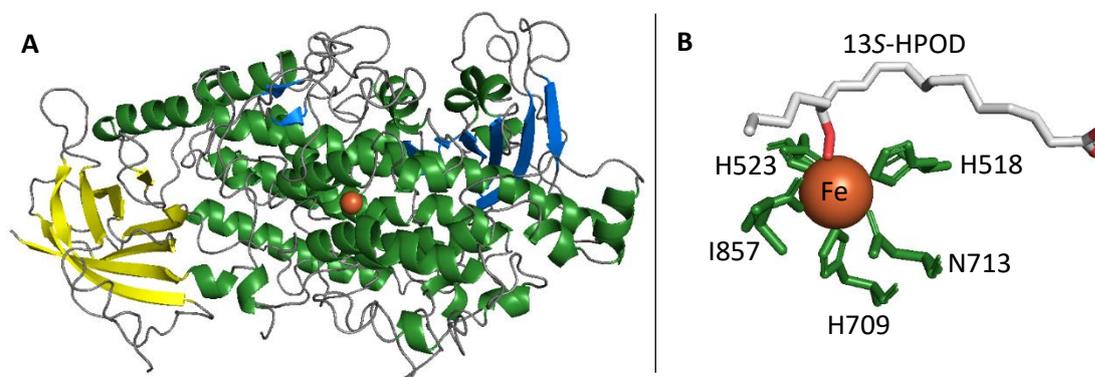


Abbildung 87: **A:** Kristallstruktur der LOX-1 aus *Glycine max* (PDB: 1IK3). In Gelb ist die β -Fasstruktur der N-terminalen Domäne und in Grün die α -Helices der C-terminalen Domäne mit dem katalytischen Zentrum und dem Eisenatom (orange). **B:** Pseudo-oktaedrische Koordination des Eisenatoms in der aktiven Tasche von LOX-1 aus *Glycine max* (PDB: 1IK3). Das Eisenatom wird durch drei Histidine (H518, H523 und H709, grün), ein Asparagin (N713, grün), dem C-terminalen Isoleucin (I857, grün) sowie durch ein an das Substrat (13S-HPOD, grau) gebundenes Wassermolekül koordiniert.^[263]

Weiterhin konnte durch Atomabsorptions- und Mössbauerspektroskopie als Cofaktor ein Eisenatom²⁹ identifiziert werden, welches sich innerhalb des katalytischen Zentrums der LOXn befindet.^[241,252,264] In pilzlichen LOXn konnte zudem gezeigt werden, dass anstelle eines Eisenatoms auch ein Manganatom als Cofaktor fungieren kann.^[251] Das Eisenatom weist eine pseudo-

²⁸ Aufgrund der Ähnlichkeit zu der Ca^{2+} -abhängigen membranbindenden Domäne der Phospholipasen.^[247]

²⁹ Es wurde 1 mol Eisen je 1 mol LOXn nachgewiesen.^[241,251]

oktaedrische Koordinationssphäre auf, indem es von einem Wassermolekül, drei Histidinresten sowie von einem weiteren Histidin-, Serin- oder Aspartatrest und dem Carboxylrest des C-terminalen Isoleucin-Rests koordiniert wird (**Abbildung 87, B**).^[250,251,254] Die Koordination wird dabei durch Unregelmäßigkeiten innerhalb der α -Helices, die das katalytische Zentrum umschließen, ermöglicht. Eine dem Eisenatom gegenüberliegende α -Helix weist eine ausgeprägte Krümmung auf, sodass eine U-förmige Substratbindetasche vorliegt wobei, sodass sich das Eisenatom im Knick der aktiven Tasche befindet.^[249] Die Substraterkennung der LOXn wird auf hochkonservierte Leucin- und Isoleucinreste zurückgeführt, die sich auf der gegenüberliegenden Seite des Eisenatoms befinden und durch Kristallisationsstudien mit Inhibitoren und Substratanaloga unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen wurden.^[249] Weiterhin verfügen alle LOXn über eine lange röhrenförmige Öffnung, die sich ebenfalls gegenüber des komplexierten Eisenatoms befindet. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um einen Sauerstoffkanal handelt, wobei der Zugang zum katalytischen Zentrum durch konservierte AS-Seitenketten kontrolliert wird.^[249,265] Diese sog. „COFFA-site“ besteht bei den meisten LOXn aus Glycin oder Alanin und wird für die Stereoselektivität³⁰ der LOXn verantwortlich gemacht.^[266,267] Zudem wird einem konservierten Arginin-Rest am unteren Ende des aktiven Zentrums eine entscheidende Rolle bei der Regioselektivität der LOXn zugesprochen.^[262,265,263,268]

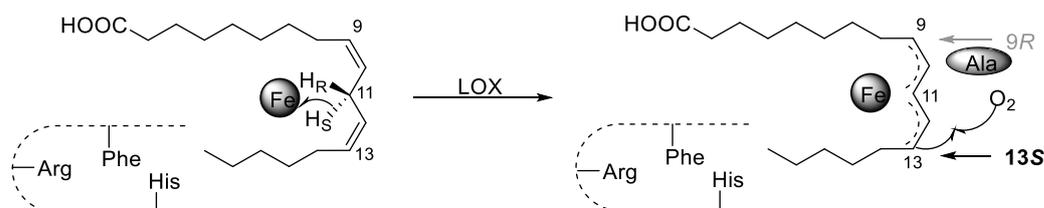
5.2.2 Regio- und Stereoselektivität

Die Regioselektivität wird prinzipiell durch zwei unabhängige Prozesse bestimmt. Einerseits durch die stereoselektive Wasserstoffabspaltung an der zentralen Methylengruppe der Pentadieneinheit und andererseits durch die selektive antarafaciale Sauerstoffinsertion.^[240,246,249] Durch die Umlagerung des gebildeten intermediären Fettsäureradikals kann der molekulare Sauerstoff bei dem Substrat LA entweder an der Position C-9 oder C-13 eingeführt werden.^[246] Die Regioselektivität wird dabei durch zwei Hypothesen beschrieben. Bei dem raumbezogenen („*space related*“) Modell diffundiert das Substrat zuerst mit dem Methylende in die aktive Tasche, wobei die Tiefe und Größe des katalytischen Zentrums die Position der Wasserstoffabstraktion und der Sauerstoffeinführung bestimmt.^[240,246] Im Falle pflanzlicher LOXn wird oftmals die Substrat-Orientierungshypothese angewendet.^[269] Diese beschreibt die Regioselektivität einer LOX in Abhängigkeit davon, ob das Substrat zuerst mit dem Methylende („*tail first*“) oder in einer inversen *head-to-tail* Orientierung („*head first*“) in das aktive Zentrum diffundiert.^[240,269,270] Hierbei erfolgte je nach Orientierung des Substrats entweder eine Abstraktion des pro-*R*- oder des pro-*S*-Wasserstoffatoms.^[249,271] Dies konnte eindrucksvoll anhand von Isotopenmarkierungsstudien nachgewiesen werden.^[271] Fast alle 13-LOXn besitzen im unteren Bereich ihrer aktiven Tasche voluminöse AS-Seitenkettenreste wie Histidin oder Phenylalanin, während die 9-LOXn stattdessen ein Valin aufweisen.^[240] Es wird angenommen, dass die raumerfüllenden AS-Reste ein ebenfalls im aktiven Zentrum befindliches positiv geladenes Arginin abschirmen, welches mit der Carboxygruppe des Substrats eine stabile Salzbrücke ausbilden könnte und eine inverse *head-to-tail* Orientierung begünstigen würde (**Abbildung 88**).^[246,251,263,268] Weist das Substrat mehrere

³⁰ Auf die Regio- und Stereoselektivität der LOXn wird im nachfolgenden Kapitel 5.2.2 näher eingegangen.

Pentadieneinheiten auf, so ist neben der Substratorientierung auch die Größe der aktiven Tasche ein wichtiger Einflussfaktor für die Regioselektivität.^[251] Beide vorgestellten Modelle lassen jedoch außer Acht, dass es sich bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes um einen dynamischen Prozess handelt und sowohl das Substrat als auch das Enzym flexibel sind.^[251] Zudem kann die Selektivität durch weitere Reaktionsparameter, wie die Substratkonzentration, Temperatur und pH-Wert beeinflusst werden.^[240,251]

13-LOX



9-LOX

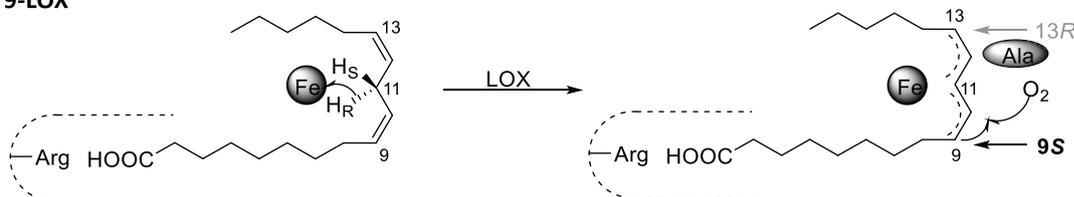
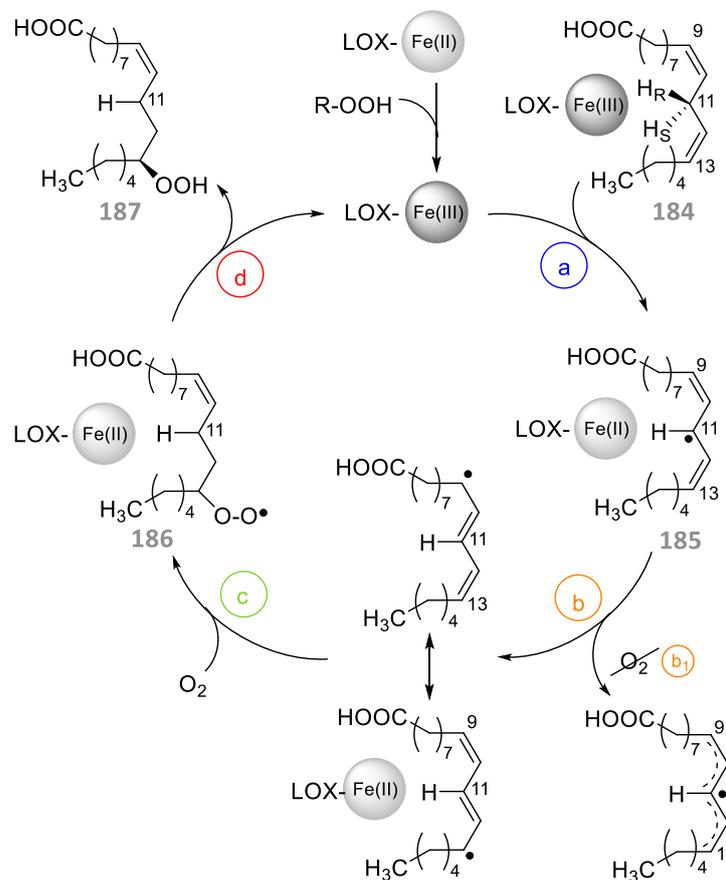


Abbildung 88: Regio- und Stereoselektivität anhand des pflanzlichen Substrats Linolsäure und einer (*S*)-spezifischen LOX aus *Glycine max*.^[23] Aufgrund der vorhandenen voluminösen Aminosäuren bei 13-LOXn diffundiert das Substrat mit der Methylgruppe voraus („tail-first“) in das katalytische Zentrum. Bei 9-LOXn findet hingegen eine inverse Substratorientierung statt aufgrund einer Interaktion mit dem Arginin und einer größeren aktiven Tasche. Je nach Orientierung erfolgt eine initiale pro-*R/S*-Wasserstoffabstraktion durch das Eisen. Das entstehende Linolsäureradikal kann durch die allylischen Doppelbindungen delokalisiert werden. Hinsichtlich der stereospezifischen HPOD-Bildung weist die LOX aus *Glycine max* ein Alanin in der COFFA-site auf, sodass die entsprechenden (*S*)-konfigurierten HPOD ausgebildet werden.

Hinsichtlich der Stereoselektivität zeigten Studien von COFFA und BRASH, dass anhand einer einzigen Aminosäure im aktiven Zentrum eine Voraussage zur Stereochemie der entstehenden HPOD möglich ist. Diese Aminosäure wird auch als COFFA-site bezeichnet und besteht bei (*S*)-spezifischen LOXn aus der Aminosäure Alanin, während bei den (*R*)-spezifischen LOXn an dieser Position ein Glycin zu finden ist.^[266,267] Dies konnte durch Mutagenesestudien und einem Austausch der Aminosäure gegen die jeweils andere bestätigt werden.^[266] Es wird dabei angenommen, dass die konservierte Aminosäure der COFFA-site eine selektive Abschirmung oder auch eine gerichtete Übertragung des molekularen Sauerstoffs ausübt (**Abbildung 88**).^[249] Es sind jedoch auch LOXn bekannt, die der postulierten Regel von COFFA und BRASH nicht folgen oder die eine abweichende Aminosäure an der Position im aktiven Zentrum aufweisen.^[251,272]

5.2.3 Katalytischer Mechanismus der Lipoxygenasen

Die Metabolisierung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch eine von LOXn katalysierte Oxygenierung stellt den initialen Schritt des LOX-Reaktionspfades dar.^[240,246] Ausgehend von den gebildeten HPODn können weitere Sekundärmetabolite durch verschiedenste Stoffwechselwege produziert werden.^[240] Die LOXn liegen nach deren Isolierung in inaktiver Fe(II)-Form vor und müssen zunächst durch eine Oxidation in die aktive Fe(III)-Form überführt werden.^[244,245,254] Die Aktivierung kann dabei durch die eigenen oder durch Autoxidation gebildeten HPOD erfolgen.^[245] Der anschließende Redozyklus kann prinzipiell in vier Schritte (**Schema 32, a-d**) unterteilt werden, wobei zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen unterschieden wird.^[242,244,252] Die charakteristischen Merkmale aller LOXn katalysierten Reaktionen sind hierbei die homolytische Spaltung einer σ -Bindung (C–H) sowie die Bildung von intermediären Radikalen.^[242]



Schema 32: Redozyklus der LOXn-katalysierten HPOD-Bildung am Beispiel einer 13(S)-LOX mit Linolsäure (184) als Substrat. **Schritt a:** Stereoselektive Wasserstoffabspaltung zur Bildung eines Fettsäureradikals (185) und einer Reduktion der LOX in die Fe(II)-Form. **Schritt b:** Umlagerung des Fettsäureradikals. Unter anaeroben Bedingungen (**b₁**) findet eine Freisetzung des Fettsäureradikals (185) statt. **Schritt c:** Aerobe molekulare Sauerstoffinsertion und Bildung eines Peroxyradikals (186). **Schritt d:** Freisetzung des 13(S)-HPOD (187) und Oxidation der LOX in die Fe(III)-Form.

Der initiale Reaktionsschritt ist die stereoselektive Entfernung eines pro-chiralen Wasserstoffatoms von der zentralen Methylengruppe der Pentadieneinheit durch das Nicht-Häm-Eisen(III) (Schritt a) und eine sich anschließenden Umlagerung zu mesomeren Fettsäureradikalen (Schritt b).^[242,244,249,259] Die Wasserstoffabspaltung stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.^[245] Gleichzeitig wird die LOX in die Fe(II)-Form reduziert.^[242,244] Unter aeroben Bedingungen

reagiert der Radikal-Enzym-Komplex mit molekularem Sauerstoff, sodass ein Peroxyradikal ausgebildet wird (Schritt c).^[242,259] Unter anaeroben Bedingungen wird hingegen das zuvor gebildete Fettsäureradikal aus der aktiven Tasche freigesetzt (Schritt b₁), wodurch Hydroperoxydasereaktionen begünstigt werden, die zu Fettsäuredimeren führen können.^[242,244,259] In einem letzten Schritt findet eine Reduktion der unter aeroben Bedingungen gebildeten Peroxyradikale zu den entsprechenden HPOD statt sowie die Freisetzung ebendieser aus dem katalytischen Zentrum (Schritt d).^[242,259] Die LOXn werden im finalen Schritt durch eine Oxidation in die Fe(III)-Form überführt und stehen für einen neuen Reaktionszyklus bereit. Die gebildeten HPODn werden anschließend durch mehrere Hauptstoffwechselwege metabolisiert.^[240,242] So führt eine Umsetzung mit einer HPOD-Lyase zu einer Spaltung der HPOD in C₆-Alkohole, -Aldehyde und -Ketone.^[242] Insbesondere die C₆-Derivate sind wichtige Verbindungen, da sie sich durch ein frisches grünes Aroma auszeichnen und zudem aufgrund ihrer antibakteriellen und antimykotischen Wirkung über eine Bioaktivität verfügen.^[256] Eine weitere Metabolisierungsmöglichkeit bietet die HPOD-Dehydrase, wodurch die HPOD in Allenoxide überführt werden, die als Vorläufer der Jasmonsäure fungieren.^[242]

5.2.4 Cooxidation

Die bleichenden Eigenschaften der LOXn wurden bereits früh mit cooxidativen Eigenschaften in Verbindung gebracht, die gegenüber Pflanzenpigmenten wie Carotenoiden und Chlorophyllen in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen wurden.^[258,273] Die Cooxidation wird dabei auf die Interaktion mit den durch die LOXn gebildeten Peroxyradikale zurückgeführt.^[258,273] Dadurch besteht die Annahme zu einem freien Peroxyradikalmechanismus, der durch eine nachweisliche Enantiomerenbildung unterstützt wird.^[257] Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Isoenzyme einer LOX-Art eine unterschiedlich starke Neigung zur Cooxidation aufweisen.^[257,258]

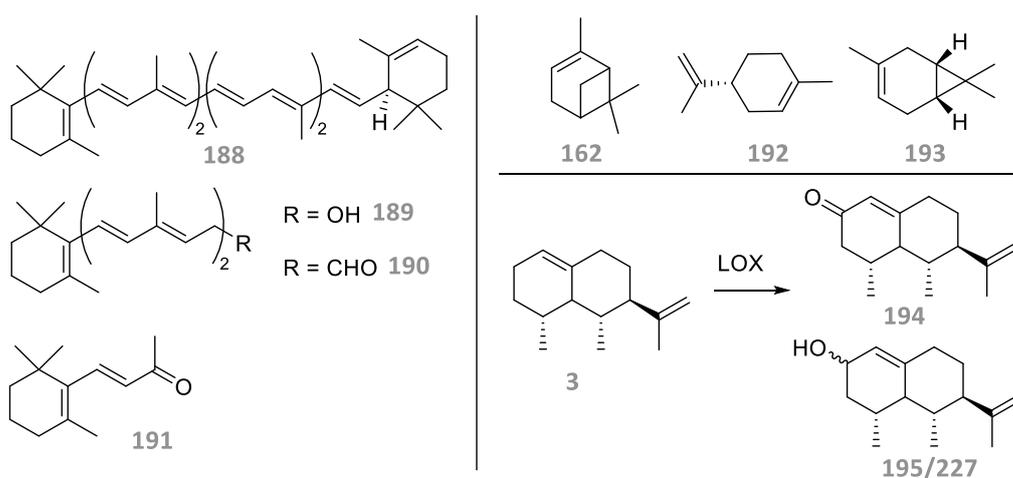


Abbildung 89: Substrate, die durch die Cooxidation mit einer LOX in Gegenwart einer mehrfach ungesättigten Fettsäure erfolgreich oxidiert wurden.

Als Substrate für die Cooxidation wurden neben β -Carotin (**188**) auch Retinol (**189**), Retinal (**190**) und β -Ionon (**191**) verwendet (**Abbildung 89**).^[257,273,274] Diese werden heutzutage als Radikalfänger eingesetzt, um die induzierten Oxidationen von intrinsischen LOXn zu vermindern.^[258] Auch Mono- und Sesquiterpene dienen bereits als Substrate für die Cooxidation, wobei in diesem Fall eine allylische Oxidation beobachtet wurde.^[275,276] So konnten (+)-Valencen (**3**), (+)-Limonen (**192**), α -Pinen (**162**) und (+)-Car-3-en (**193**) bereits erfolgreich mit der Basidiomycete *Pleurotus sapidus* umgesetzt werden, die über eine LOX-Aktivität verfügt.^[275–277,278a,279,278b] Das Sesquiterpen Valencen (**3**) wurde zudem auch mit der kommerziell verfügbaren LOX aus *Glycine max* in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Nootkaton (**194**) und Nootkatol (**195**, **227**) oxidiert.^[280] Nootkaton (**194**) weist im Gegensatz zum eingesetzten Valencen (**3**) einen ausgeprägten Grapefruitgeschmack auf, während sich das gebildete Nootkatol (**195**) durch eine zitrusartige Note auszeichnet. Daher sind diese Terpenoide von hohem Interesse in der Aromaindustrie.^[280] Die LOX-katalysierte Biotransformation böte somit eine nachhaltige und natürliche Alternative gegenüber der chemischen Erzeugung.^[276]

5.3 Etherische Öle

Ein etherisches Öl wird gemäß der ISO 9235:2013 als „ein Erzeugnis, welches aus einem pflanzlichen, natürlichen Rohstoff gewonnen wird“ definiert.^[281] In der Pflanze selbst agieren die Komponenten der etherischen Öle als Sekundärmetabolite mit einer Vielzahl an ökochemischen Funktionen.^[32] Anzutreffen sind die Verbindungen in allen Bestandteilen einer Pflanze, wobei sich diese signifikant bezüglich der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung unterscheiden.^[282] Zu den konventionellen Gewinnungsmethoden der etherischen Öle zählen neben verschiedenster Destillationsarten auch mechanische Verfahren wie das Kaltpressen, welches bevorzugt bei Zitrusfrüchten angewendet wird.^[281,283] Aufgrund von geringen Ausbeuten, toxischen Rückständen, der Erzeugung von Artefakten sowie der Verlust flüchtiger Verbindungen wird heute oftmals die überkritische Fluidextraktion (SFE) gewählt.^[284,285] Diese stellt eine alternative und effiziente Methode dar mit der die Nachteile der konventionellen Techniken überwunden und größere Ausbeuten an etherischen Öl mit höherer Selektivität und verkürzten Extraktionszeiten generiert werden können.^[285,286]

Bei einem etherischen Öl handelt es sich häufig um Vielkomponentengemische mit weit mehr als 100 Verbindungen.^[287] Allen gemeinsam ist, dass sie zu einem überwiegenden Anteil aus Mono- und Sesquiterpenoiden³¹ bestehen, jedoch auch Isoallyl- und Allylphenole enthalten können.^[288] Je nach angewandeter Isolations-technik können zudem auch nichtflüchtige Bestandteile enthalten sein.^[288] Neben der Gewinnungsmethode wird die Zusammensetzung der etherischen Öle maßgeblich durch die geographische Lage, der Erntezeit, dem Alter der Pflanze sowie dem verwendeten Pflanzenbestandteil geprägt.^[282,288,289]

³¹ Die Entstehung und Bildung der Terpenoide wurde bereits eingehend unter Kap. 1 erläutert.

5.3.1 Vetiver Öl

Das etherische Vetiver Öl wird aus getrockneten Wurzeln der *Vetiveria zizanioides*³² durch Wasserdampfdestillation gewonnen.^[290,291] Die Pflanzengattung zählt zur Familie der *Graminaceae* und ist ein immergrünes büschelartiges Grasgewächs ähnlich dem Zitronengras, das sowohl in tropischen als auch subtropischen Regionen wächst.^[291] *V. zizanioides* hat einen hohen ökologischen und physiologischen Nutzen, da es Bodenerosionen vorbeugt und durch eine ausgeprägte Toleranz gegenüber Blei und Zink zur Regenerierung von schwermetallkontaminierten Böden genutzt wird.^[290] Die Produktion des etherischen Vetiver Öls beläuft sich auf etwa 80-120t p.a., wobei für die Parfümerie hauptsächlich Vetiver aus Haiti³³, Indonesien (Java) und Indien genutzt wird.^[291,292] Das etherische Öl weist eine sehr komplexen Geruch mit einer charakteristischen holzig-erdigen Note auf, die eindeutige Aspekte von Grapefruit und Rhabarber enthält.^[291] Je nach Herkunftsland weisen die etherischen Öle verschiedenste weitere Nuancen auf. So zeichnet sich das Vetiver Öl Haiti durch eine zusätzliche rosige Note aus und verfügt zudem über schwefelartige Töne sowie Aspekte von Jute und gerösteten Erdnüssen.^[293]

Vetiver Öl besteht aus einer Mischung von mehr als 150 Sesquiterpenoiden, die sich je nach Herkunftsland und Kultivierung maßgeblich in der Zusammensetzung unterscheiden.^[291] Allerdings enthalten alle etherischen Öle die Verbindungen (+)- α -Vetivon (**196**), (-)- β -Vetivon (**197**) und Khusimol (**198**) in einem Gesamtanteil von bis zu 35 % (**Abbildung 90**).^[291,294] Die Verbindungen sind jedoch nicht an den olfaktorischen Eigenschaften des Öls beteiligt. Stattdessen konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der typische Geruch hauptsächlich durch das Sesquiterpen (-)-Khusimon (**199**) erzeugt wird.^[291,295] Das etherische Öl besitzt weiterhin starke entzündungshemmende, antioxidative, antimykotische sowie antimikrobielle Wirkung und wird in Lebensmitteln als Konservierungs- und Aromastoff und auch als Bestandteil von Pharmazeutika eingesetzt.^[290] Ein großes Einsatzgebiet hat das Vetiver Öl zudem in der Parfümerie, wo es als Ausgangsstoff für die Produktion von Vetiverestern und aufgrund der ausgeprägten holzigen Note zur Kreation neuer Duftstoffe verwendet wird.^[291,292]

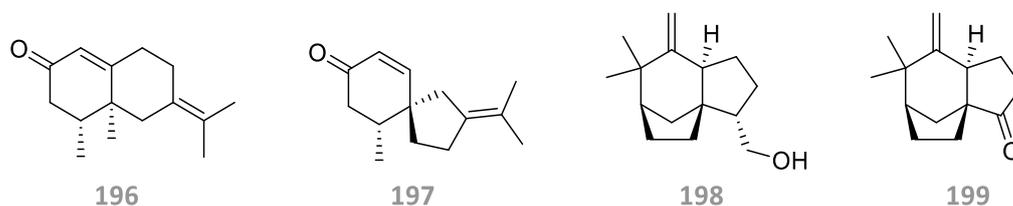


Abbildung 90: Hauptinhaltsstoffe des Vetiveröls: (+)- α -Vetivon (**196**), (-)- β -Vetivon (**197**) und Khusimol (**198**). Das Geruchsprofil von **196** wird als Grapefruit, blumig und holzig beschrieben, während **197** eine styra, grün-holzige und Grapefruit Note zeigt. **198** ist nahezu geruchslos. Das (-)-Khusimon (**199**) weist den charakteristischen Geruch des Vetiver Öls auf.^[291]

³² Auch als *Chrysopogon zizanioides* bezeichnet^[290]

³³ Vetiver Öl Haiti macht etwa 50% der globalen Produktion aus^[291]

5.3.2 Guajakholzöl

Das etherische Guajakholzöl wird vorwiegend aus dem endemischen Baum *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb gewonnen, der in der Region Gran Chaco in Lateinamerika wächst und dort auch als „*Palo santo*“ bezeichnet wird.^[296–298] In der Industrie wird die Bezeichnung Guajakholzöl zudem auch für etherische Öle der Gattung *Gaiacum* verwendet, die ebenso wie *B. sarmientoi* zur Familie der *Zygophyllaceae* zählt.^[298,299] Die jährliche Produktion des etherischen Öls beläuft sich auf 130–180 t p.a. und wird zu einem Großteil aus Paraguay exportiert.^[297,298] Die Gewinnung des Guajakholzöls erfolgt durch Wasserdampfdestillation von Holzresten und Sägemehl, wobei die Ausbeute im Bereich von 3.5 – 4.0 % liegt.^[298] Aufgrund der intensiven landwirtschaftlichen Rodung der Wälder sowie einer hohen Nachfrage auf dem asiatischen Markt nach dem dichten und aromatischen Holz der Spezies gilt *B. sarmientoi* heutzutage als gefährdete Art.^[297]

Bei dem etherischen Öl handelt es sich um ein nahezu monoterpenfreies Öl, das größtenteils aus Sesquiterpenen mit tertiären Hydroxy- oder Oxidfunktionen besteht, die zumeist den Strukturgruppen der Guaine und Eudesmole zugeordnet werden können.^[296,297] So stellen die isomeren bicyklischen tertiären Alkohole Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) mit mehr als 70 % die Hauptkomponenten des Öls dar (**Abbildung 91**).^[297] Zudem konnte durch TISSANDIÉ gezeigt werden, dass das etherische Öl ein breites Spektrum an Isomeren der Sesquiterpenoxide Guaioxid (**202**) und Hanamyol (**203**) aufweist.^[297] Der Geruch des etherischen Öls wird als holzig mit charakteristischen Noten von Veilchen und Rose beschrieben, weshalb das etherische Öl als Verfälschungsmittel für Rosenöl verwendet wurde.^[296,297] Heutzutage wird es insbesondere aufgrund seiner ausgeprägten fixierenden Eigenschaften in der Parfümerie eingesetzt.^[297] Zudem konnten dem etherischen Öl antibakterielle, entzündungshemmende, antiseptische und wundheilungsfördernde Wirkungen nachgewiesen werden.^[296,299,300] Wässrige Extrakte der Rinde von *B. sarmientoi* verfügen außerdem über eine krebshemmende Wirkung.^[301]

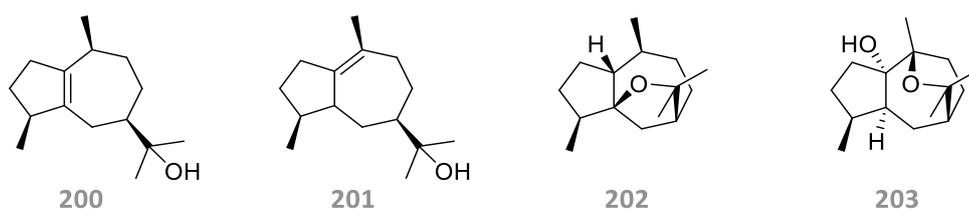
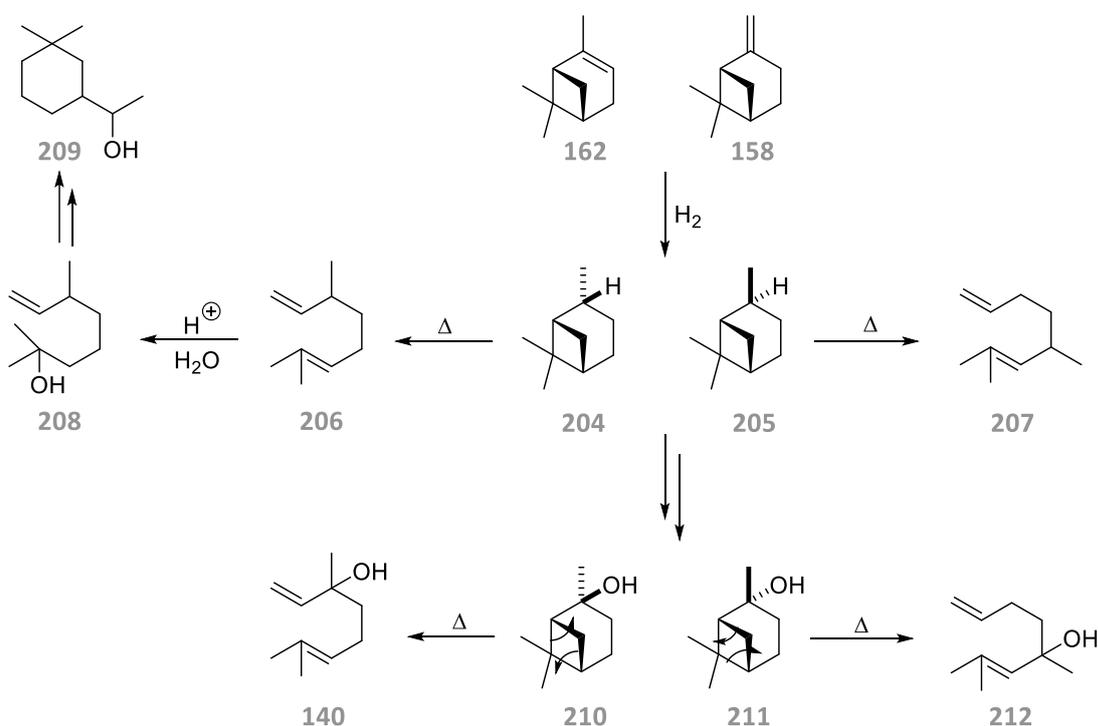


Abbildung 91: Hauptprodukte Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) des Guajakholzöls aus *B. sarmientoi* sowie die Sesquiterpenoxide Guaioxid (**202**) und Hanamyol (**203**).

5.4 Seitenströme Anomadien, Cyclademol und Isolinalool

Die Terpene Anomadien (**207**), Cyclademol (**209**) und Isolinalool (**212**) verfügen über ein von der Isopren-Regel abweichendes Kohlenstoffgrundgerüst und werden als Seitenströme bei der Produktion der Monoterpene Dihydromyrcen (**206**), Dihydromyrcenol (**208**) und Linalool (**140**) erhalten.^[302] Diese Terpene können ausgehend von den in der Umwelt ubiquitär vorkommenden Strukturisomeren α -Pinen (**162**) und β -Pinen (**158**) aus erneuerbaren Rohstoffen gewonnen werden (**Schema 33**). Die Pinene zeichnen sich durch ein labiles Bicyclo[3.1.1]-Grundgerüst aus, welches zu thermisch erzeugten Ringöffnungen und Umlagerungen neigt, wodurch neben den genannten Terpenen eine Vielzahl weiterer azyklischer, mono- und bicyklischer Terpene gebildet werden können.^[302]



Schema 33: Produktion der Monoterpene Dihydromyrcen, (**206**), Dihydromyrcenol (**208**) und Linalool (**140**) ausgehend von den Strukturisomeren α -Pinen (**162**) und β -Pinen (**158**). Als Nebenprodukte bei der Produktion der Monoterpene fallen die Seitenströme Anomadien (**207**), Cyclademol (**209**) und Isolinalool (**212**) an.

Durch eine initiale selektive katalytische Hydrierung werden in einem ersten Schritt die (*E*)- und (*Z*)-Pinane (**204,205**) ausgebildet. Eine Pyrolyse führt anschließend zur Bildung von Dihydromyrcen (**206**), wobei aus **205** als Nebenprodukt das Anomadien (**207**) hervorgeht, welches durch Destillation abgetrennt werden kann.^[302] Das Dihydromyrcen (**206**) dient wiederum als Startmaterial für die Produktion des Dihydromyrcenol (**208**).^[302] Dieses wird durch Umsetzung mit konzentrierter Schwefelsäure, gefolgt von einer Hydrolyse des Sulfataddukts ausgebildet, wobei als Nebenprodukt Cyclademol (**209**) entsteht.^[303] Durch eine aerobe Oxidation mit einer darauffolgenden Hydrierung können zudem ausgehend von den Pinanen (**204,205**) die (*Z*)- und (*E*)-Pinanole (**210,211**) erzielt werden, die als Schlüsselintermediate für eine Vielzahl weiterer Terpene dienen.^[302] So führt eine thermische Umlagerung zur Ausbildung des azyklischen Linalool (**140**), wobei gleichzeitig aus **211** als Nebenprodukt das Isolinalool (**212**) erzeugt wird.^[302,304]

6 Zielsetzung – Thema II

Die biotechnologische Herstellung von Terpenoiden ermöglicht die Funktionalisierung bereits verfügbarer Terpene durch enzymatische Katalyse. Dadurch kann die strukturelle Diversität der Naturstoffklasse stetig erweitert und Terpene mit olfaktorischen Eigenschaften gebildet werden. Insbesondere oxyfunktionalisierte Terpene zeichnen sich oftmals durch bemerkenswerte sensorische Profile aus.^[149,150] Auch veresterte Terpene sind von Interesse, da sich die Verbindungen häufig durch einen Geruchseindruck und eine hohe Flüchtigkeit auszeichnen.^[305] Durch die Anwendung einer Biokatalyse besteht die Möglichkeit Terpene ohne duftstoffrelevante Funktionen in Terpene mit Sauerstofffunktionalitäten zu überführen, die über potentielle olfaktorische Eigenschaften verfügen und somit als Einsatzstoffe in der Duft- und Aromaindustrie dienen können. Gleichzeitig zeichnet sich die Biokatalyse durch milde Reaktionsbedingungen aus und ermöglicht einen natürlichen Weg zur Bildung von Aromaprodukten für die Industrie.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit werden in Zusammenarbeit mit der Symrise AG (Holzminden) Terpene und ätherische Öle durch kommerziell verfügbare Enzyme oxyfunktionalisiert, um deren Einsatzspektrum in der duftstoffverarbeitenden Industrie zu erweitern. Dabei werden neben bereits verwendeten Duftstoffkomponenten auch Terpene genutzt, die als Nebenströme bei der Produktion relevanter Verbindungen anfallen, aber bisher aufgrund fehlender olfaktorischer Aspekte selbst keine Anwendung in der verarbeitenden Industrie finden. Als kommerzielle Enzyme wurden nach einer vorhergehenden Recherche eine Lipase aus *Candida rugosa* und eine Lipoxygenase aus *Glycine max* ausgewählt.

Durch die Biokatalyse mit einer Lipase können unter Wasserausschluss und in organischen Lösemitteln Veresterungen und Umesterungen durchgeführt werden, wodurch flüchtige Terpene erzeugt werden.^[218,305] In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde mit Vinylacetat als Acyldonor gearbeitet. Zunächst wird eine Optimierung der Biotransformation durch Überprüfung verschiedenster Reaktionsparameter durchgeführt, um die Produktausbeute zu maximieren. Anschließend wird die Substratazeptanz der Lipase *Candida rugosa* gegenüber Terpenen mit primären, sekundären und tertiären Alkoholen betrachtet. Das als Nebenstrom anfallende Cyclademol (**209**) wird zudem hinsichtlich der absoluten Stereochemie untersucht. Dazu wird das Cyclademol (**209**) isoliert und zur Ermittlung der absoluten Stereochemie eine MOSHER-Ester Analyse durchgeführt. Zusätzlich werden quantenmechanische Berechnungen angestrebt.

Die Lipoxygenase (LOX) ermöglicht hingegen allylische Oxidationen und Epoxidierungen in Gegenwart einer ungesättigten Fettsäure mit einer 1,4-Pentadieneinheit.^[240] Dabei soll zunächst überprüft werden, ob die LOX direkt an der Cooxidation beteiligt ist oder lediglich an der Bildung der Hydroperoxide (HPOD). Zudem wird ein Enzymtest entwickelt, der die Cooxidation ausgewählter Mono- und Sesquiterpene ermöglicht. Dazu wird zunächst gesondert die HPOD-Bildung betrachtet und danach die Cooxidation anhand ausgewählter Reaktionsparameter und Reaktanden optimiert. Anschließend wird die Substratazeptanz verschiedenster Mono- und

Sesquiterpene überprüft und das Produktspektrum chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. Für identifizierte Produkte werden postulierte Reaktionsmechanismen aufgestellt. In einem weiteren Schritt wird das LOX-HPOD-System auf komplexe etherische Öle angewendet, die zuvor charakterisiert werden. Bei der Cooxidation soll die Veränderung des sensorischen Profils begutachtet und entstehende Produkte massenspektrometrisch aufgeklärt werden. Zudem sollen postulierte Reaktionsmechanismen für die Bildung der zuordbaren Produkte aufgestellt werden. Anschließend wird das Testsystem auf semi-präparative Umsetzungen skaliert, um unbekannte Verbindungen zu isolieren und die Strukturen mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären.

7 Ergebnisse und Diskussion – Thema II

7.1 Lipase *Candida rugosa*

Durch eine Veresterung von in etherischen Ölen enthaltenen Terpenalkoholen kann die Flüchtigkeit der Verbindungen erhöht und somit der Geruchseindruck beeinflusst werden, da dieser abhängig von der Konzentrationszusammensetzung der einzelnen riechenden Komponenten ist.^[305] Für die Durchführung einer enzymatisch katalysierten Veresterung wurde die kommerziell erhältliche Lipase *Candida rugosa* Typ VII von Sigma Aldrich (CrL) ausgewählt. Die Lipase zeichnet sich durch hohe Umsetzungsraten und eine hohe Substrattoleranz aus.^[111] Arbeiten von LÓPEZ konnten bereits zeigen, dass sich die Lipase aus den verschiedenen Isoenzymen zusammensetzt, wobei LIP1 das Hauptisoenzym stellt.^[306] Die nachfolgenden Versuche wurden daher allesamt mit einer Charge des Enzyms durchgeführt, um eine abweichende Isoenzymzusammensetzung³⁴ zu vermeiden, da diese mit einer Variation an biokatalytischen Eigenschaften einhergehen würde.^[307] Da für die Lipasenaktivität in einer organischen Phase geringfügige Anteile an Wasser unerlässlich sind, liegt die Lipase weiterhin als Gemisch mit Lactose vor, welches als Wasserreservoir fungiert.^[307]

In der Literatur wurden bereits eine Vielzahl an möglichen Acyldonatoren eingesetzt.^[308] Ein optimaler Acyldonor zeichnet sich dabei durch eine schnelle und irreversible Acylierung sowie einer fehlenden Reaktivität bei Abwesenheit der Lipase aus.^[309] Die einfachste Variante ist dabei die Nutzung von Säuren oder einfachen Estern. Allerdings verläuft die Umsetzung oftmals reversibel und sehr langsam. Eine Verschiebung des Gleichgewichts kann allerdings durch eine stetige Entfernung des entstehenden Wassers bzw. Alkohols erzielt werden.^[309] Eine Alternative stellen aktivierte Acyldonatoren dar, bei denen die Abgangsgruppe funktionalisiert wurde.^[310] Allerdings nehmen bspw. Thioester einen Einfluss auf das sensorische Profil^[311], während Oximester zwar eine schnellere Acylierung ermöglichen, gleichzeitig jedoch aufgrund der geringen Flüchtigkeit des entstehenden Oxims und der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit neue Nachteile erzeugen.^[309,312] Die Nutzung von Säureanhydriden führt ebenfalls zu einer irreversiblen Acylierung von Alkoholen^[309,313], wobei jedoch Carbonsäuren freigesetzt werden, die wiederum Einfluss auf die Enantioselektivität und Aktivität des Enzyms nehmen können.^[310,314] Optimal ist hingegen die Nutzung von Enolestern als Acyldonatoren. Der hierbei entstehende Alkohol tautomerisiert zur entsprechenden Carbonylverbindung, wodurch es der Gleichgewichtsreaktion entzogen wird.^[309,315,222] In der vorliegenden Arbeit wurde als Acyldonor Vinylacetat ausgewählt, da es identische Produkte liefert, wie die Umsetzung mit Ethylacetat, welches bereits erfolgreich als Acyldonor bei der Umsetzung von Geraniol und Citronellol zu den entsprechenden Acetaten angewendet wurde und somit die Möglichkeit eines natürlichen Prozesses bietet.^[315,305] In den Umsetzungen zeigte sich jedoch, dass deutlich größere Katalysatormengen und Reaktionszeiten benötigt wurden. Zur Erprobung der Umsetzungen und für die Analyse des Produktspektrums wurde daher zunächst Vinylacetat verwendet.^[315,305] Allerdings konnten Studien mit der CrL bereits

³⁴ Eine Nutzung von rekombinanter CrL ist aufgrund eines nicht-universellen genetischen Codes nicht möglich, da das Codon CUG als Serin anstelle von Leucin exprimiert werden würde.

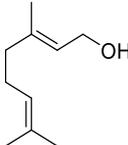
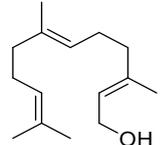
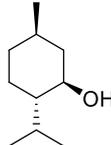
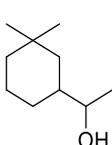
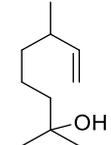
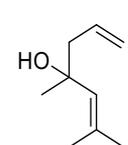
zeigen, dass die Lipase das entstehende Acetaldehyd nur bedingt toleriert.^[237] Es wird angenommen, dass es mit den Lysinresten nahe des aktiven Zentrums Schiff'sche Basen ausbildet, die ein Verlust an Aktivität bedingen.^[316]

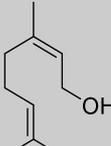
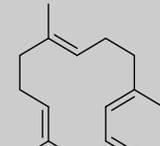
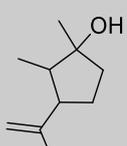
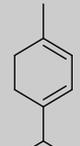
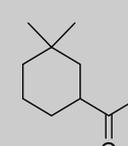
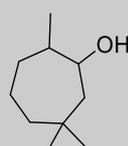
7.1.1 Auswahl und analytische Charakterisierung geeigneter Testsubstrate

Neben dem Enzym und dem eingesetzten Acyldonor wird die Produktausbeute entscheidend durch die Wahl des eingesetzten Terpenalkohols geprägt.^[317] Hierbei zeigen Lipasen eine bevorzugte Spezifität gegenüber primären Alkoholen, gefolgt von sekundären Alkoholen.^[220,318] Tertiäre Alkohole werden hingegen von den meisten Lipasen oftmals gar nicht oder nur bedingt akzeptiert.^[220,319] Im Falle der CrL wurden allerdings bereits erfolgreiche Umsetzungen mit tertiären Alkoholen bzw. mit deren Estern beschrieben.^[319–321] DOMÍNGUEZ DE MARÍA konnte zudem zeigen, dass das Isoenzym LIP1 bevorzugt azyklische primäre Alkohole als Substrat akzeptiert, während die weiteren Isoenzyme LIP2 und LIP3 auch sterisch anspruchsvollere Alkohole als Substrate erkennen.^[237] Arbeiten von HENKE bestätigten die Substratazeptanz von tertiären Estern gegenüber der Lipase CrL.^[322] Untersuchungen anhand der Kristallstruktur offenbarten eine vergrößerte Alkoholbindetasche sowie ein GGGX-Motif anstelle eines GX-Motifs, welches an der Oxyanion-Bindetasche beteiligt ist.^[322,323] Es wird vermutet, dass das GGGX-Motif für die katalytische Eigenschaft der CrL, auch tertiäre Alkohole und deren Ester zu akzeptieren, verantwortlich ist. Diese Annahme wird auf die Glycin-Reste des GGGX-Motifs zurückgeführt, wodurch das Enzym flexiblere Konformationen einnehmen und genügend Platz innerhalb der Oxyanion-Bindetasche für sperrige tertiäre Alkoholfunktionen schaffen kann.^[322] Zudem konnte bereits eine Abhängigkeit der Ausbeute von der Kettenlänge des eingesetzten Alkohols beobachtet werden.^[324] Die verringerte Substratazeptanz bei steigender Kettenlänge wird zum einen auf eine erschwerte Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes zurückgeführt, andererseits auf eine Abnahme der Nucleophilie des Substrates und einer damit einhergehenden verminderten Diffusionsfähigkeit in die aktive Tasche.^[218]

Als Substrate für die nachfolgenden Optimierungen wurden daher jeweils zwei primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole ausgewählt (**Tabelle 32**). Als primäre Alkohole wurden die bereits in der Literatur erfolgreich verwendeten Substrate Geraniol (**141**) und das um eine Isopreneinheit längere (*E,E*)-Farnesol (**96**) verwendet^[305,317,324,325], um den Einfluss der Substratazeptanz gegenüber Mono- und Sesquiterpenen zu untersuchen. Als sekundäre Alkohole wurde neben dem bereits in der Literatur umgesetzten *L*-Menthol (**1**)^[326], das bei der Produktion von Dihydromyrcenol als Seitenstrom anfallende Cyclademol (**209**)^[327] ausgewählt. Als tertiäre Alkohole dienten das Dihydromyrcenol (**208**) und das bei der Produktion von Linalool entstehende Nebenprodukt Isolinalool (**212**). Die eingesetzten Substrate wurde vor Beginn der Biotransformationen mit der Lipase CrL zunächst chromatographisch analysiert und dabei der prozentuale Anteil der Verbindungen bestimmt.

Tabelle 32: Analytische Charakterisierung der eingesetzten primären, sekundären und tertiären Alkohole als Substrate für die Lipase CrL. Die Bestimmung der RI und prozentualen Flächenanteile erfolgte auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität. Zudem ist eine Übersicht der mittels RI und MS-Spektren identifizierten Nebenprodukte **200-205** abgebildet.

						
	(141)	(96)	(1)	(209)	(208)	(212)
RI_{DB1}	1236	1731 ^A	1160	1136	1059	1071
A[%]	95.8	98.5	99.9	67.9	98.5	89.4
RI_{WAX}	1828	2371	1639	1612	1465	1500 ^B
A[%]	96.4	98.2	99.8	13.6	98.7	86.5
				53.0		

						
	(213)	(214)	(215)	(216)	(217)	(218)

^A Messung auf DB5-Trennsäule; ^B Messung auf FFAP-Trennsäule.

Anhand der **Tabelle 32** konnte mit Ausnahme der Seitenströme Cyclademol (**209**) und Isolinalool (**212**) prozentuale Anteile von über 90 % für die jeweiligen eingesetzten Substrate ermittelt werden. Anhand einer massenspektrometrischen Untersuchung konnten die Nebenprodukte identifiziert werden. So konnten im Falle des Geraniols (**141**) Anteile des (*Z*)-konfigurierten Doppelbindungsisomers Nerol (**213**) sowie die entsprechenden Aldehyde nachgewiesen werden. Für das verwendete (*E,E*)-Farnesol (**96**) konnte als Nebenprodukt (*E,E*)-Farnesal (**214**) identifiziert werden. Dihydromyrcenol weist vier unbekannte Begleitverbindungen auf, die analog wie die Hauptverbindung einen Molpeak von *m/z* 156 aufweisen. Das Isolinalool enthält zudem Diastereomere des Plinol (**215**) sowie Linalool (**140**) und α -Terpinen (**216**). Bei dem Cyclademol konnte anhand einer Analyse auf einer unpolaren DB1-Säule zunächst nur ein Hauptpeak mit einem prozentualen Flächenanteil von 67.9 % ermittelt werden. Ein Wechsel auf eine polare Trennsäule offenbarte allerdings, dass beide Diastereomere des Cyclademol gebildet wurden. Eines der Diastereomere (RI_{WAX} 1617) liegt dabei mit einem Anteil von 53.0 % vor, während das zweite Diastereomer (RI_{WAX} 1612) mit 13.6 % enthalten

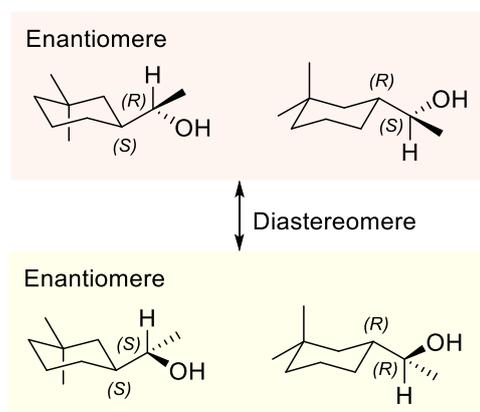


Abbildung 92: Vier mögliche Stereoisomere des Cyclademol (**197**), die als zwei Enantiomerenpaare zusammengefasst sind, welche sich zueinander diastereotop verhalten und daher als zwei Signale im Chromatogramm ersichtlich sind.

ist. Um zu überprüfen ob die Diastereomere jeweils als Enantiomere existieren, wurde eine chirale GC mit einer Octakis-(2,3-di-*O*-methoxymethyl-6-*O*-*t*-butyldimethylsilyl)- γ -CD durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass alle vier Stereoisomere des Cyclademol vorliegen. Die *ee*-Werte konnten auf 37.4 % (R_{WAX} 1617) für das Hauptdiastereomer und auf 3.0 % (R_{WAX} 1612) für das Nebendiastereomer ermittelt werden.³⁵ Welches Diastereomer durch welches Enantiomerenpaar dargestellt wird, wurde bisher noch nicht näher verifiziert (**Abbildung 92**). Neben den Diastereomeren des Cyclademol wurden zudem weitere Nebenprodukte mittels GC-MS identifiziert. Hierbei konnte das Monoterpen Herbac (**217**) mit einem Anteil von 3.8 % nachgewiesen werden, sowie die Diastereomere des 2,6,6-trimethylcycloheptan-1-ol (**218**), die mit 17.3 % und 2.8 % enthalten sind. Durch eine chirale GC konnte für das Hauptdiastereomer des 2,6,6-trimethylcycloheptan-1-ol ein *ee*-Wert von 38.0 % ermittelt werden.

7.1.2 Biotransformationen und Optimierung

Da die Lipasen-katalysierte Veresterung zu den wichtigsten biotechnologischen Prozessen zählt, wurden die Eigenschaften der Lipasen bereits eingehend untersucht. So konnte bereits festgestellt werden, dass die gewählten Reaktionsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Umsetzung in organischen Lösemitteln nehmen und neben der Ausbeute auch die Selektivität beeinflussen.^[111] Insbesondere die Parameter Temperatur und Substratverhältnis tragen neben der Reaktionszeit, der Enzymmenge sowie einer möglichen Immobilisierung zu einer erfolgreichen Umsetzung bei.^[328] Ein weiterer entscheidender Faktor ist der Wassergehalt, da Wasser ein besseres Nucleophil als der zu veresternde Alkohol darstellt und die Umsetzung hemmt.^[230,231] Neben der Enzymaktivität wird durch den Wassergehalt zudem die Thermostabilität und Stereoselektivität der Lipasen beeinflusst.^[228] Da die Lipasen in organischen Lösemitteln unlöslich sind, liegt zudem ein heterologes System vor.^[324] Einerseits ist dadurch eine einfache Abtrennung des Katalysators gewährleistet, andererseits ist der durch Diffusion erzeugte Massentransfer erniedrigt.^[218] Letzterer kann allerdings durch Schütteln des Reaktionsansatzes erhöht werden. Anstelle einer Zugabe eines internen Standards für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde diese anhand der integrierten Peakflächen der eingesetzten Substrate und Produkte ermittelt.^[329]

Um eine Vergleichbarkeit der Umsetzungen zu gewährleisten wurden die Enzymmengen genau abgewogen und das Gesamtvolumen sowie die Stoffmengen an Substrat und Acyldonor auf die Menge an Enzym berechnet. Zusätzlich wurden zu jeder Optimierung Negativkontrollen durchgeführt, die analog wie die Enzymtests jedoch ohne die Lipase CrL umgesetzt wurden. Hierbei konnte bestätigt werden, dass ohne die Zugabe des Enzyms keine Produktumsetzung stattfindet und somit eine Autokatalyse ausgeschlossen werden konnte.

In einem ersten Schritt erfolgte anschließend eine Optimierung des Substrat-Acyldonor Verhältnisses. Hierbei wird oftmals ein Überschuss an Vinylacetat als Acyldonor gewählt, da dieser mit vorhandenem Wasser als Nebenprodukt Essigsäure erzeugt, welches die Enantioselektivität der

³⁵ Für die Bestimmung der *ee*-Werte wurden die reinen Peakflächen der entsprechenden Enantiomere verwendet.

Reaktion negativ beeinflussen kann.^[310] Durch einen Überschuss an Acyldonor sowie dem arbeiten mit trockenen Lösemitteln kann diese Problematik jedoch umgegangen werden.^[310,315] Daher wurden insgesamt sechs verschiedene Verhältnisse an Substrat und Acyldonor mit einer Enzymkonzentration von 1 mg/mL Lipase CrL in einer Dreifachbestimmung umgesetzt (**Abbildung 93**).³⁶ Bei der Biotransformation der primären Alkohole zu den entsprechenden Acetaten (**219, 220**) zeigte sich, dass oberhalb einem Verhältnis von 1:2 an Substrat zu Acyldonor eine nahezu vollständige Veresterung beobachtet werden konnte. Folglich werden sowohl azyklische Mono-als auch Sesquiterpenoide mit einer primären Hydroxyfunktion sehr gut von der CrL akzeptiert. Eine Kettenverlängerung um eine Isopreneinheit scheint somit keinen signifikanten Einfluss auf die Substratazeptanz zu nehmen.

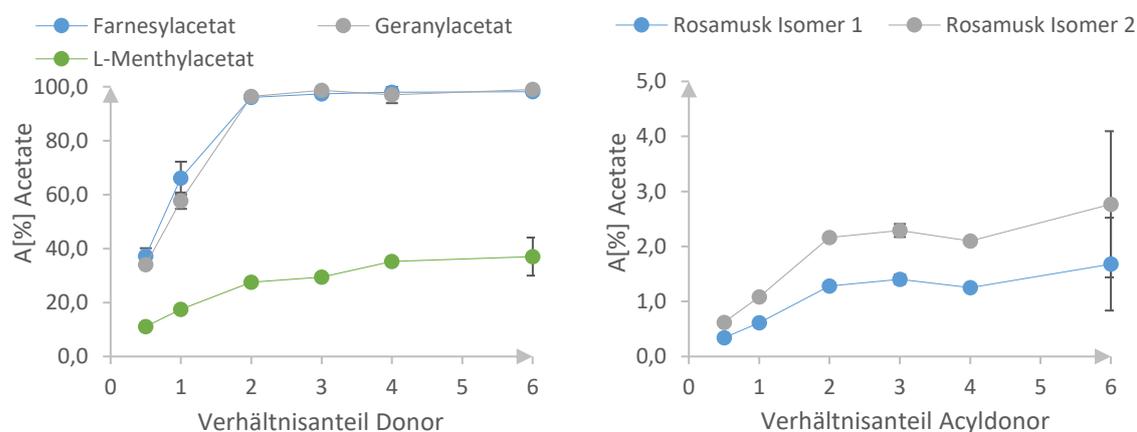


Abbildung 93: Prozentuale Flächenanteile der entstehenden Acetat-Produkte bei der Umsetzung von Geraniol, (E,E)-Farnesol, L-Menthol und Cyclademol mit dem Acyldonor Vinylacetat.

Im Falle der sekundären Alkohole *L*-Menthol (**1**) und Cyclademol (**209**) zeigt sich eindeutig eine Präferenz für das *L*-Menthol. Als Produkte der Biotransformation von Cyclademol (**209**) werden die Diastereomere des Rosamusk³⁷ (**222**) erhalten, einem für die Parfümerie und Aromenindustrie interessanten Duftstoff, dessen olfaktorischer Eindruck als rosig, fruchtig, moschusartig sowie mit Noten von Rhodinol und Garanien beschrieben wird (**Abbildung 94**).^[330] Während Rosamusk (**222**) bereits mehrfach synthetisch erzeugt wurde,^[330] gelang es nun erstmalig Rosamusk durch eine enzymatisch katalysierte Umsetzung mit der Lipase CrL zu erzeugen. Sowohl beim *L*-Menthol (**1**) als auch beim Cyclademol (**209**) deutet sich eine Erhöhung der Ausbeute mit steigendem Acyldonor an. Bei der Umsetzung mit den tertiären Alkoholen Dihydromyrcenol (**208**) und Isolinalool (**212**) kann hingegen keine Produktbildung beobachtet werden.

³⁶ Eine ausführliche Erläuterung zur Durchführung kann dem experimentellen Teil unter Kap. 11.1.1 entnommen werden.

³⁷ Bei der Bezeichnung Rosamusk handelt es sich um einen Trivialnamen des Cyclademolacetat.

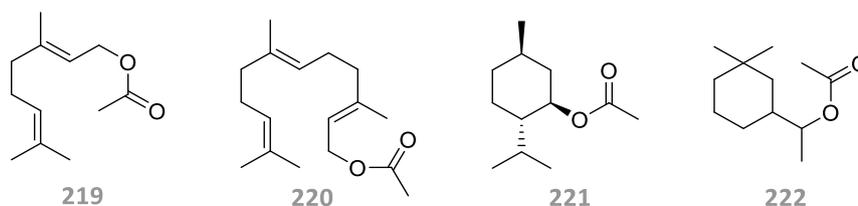


Abbildung 94: Acetylierte Produkte Geranylacetat (**219**), (E,E)-Farnesylacetat (**220**), L-Menthylacetat (**221**) und Rosamusk (**222**) der Biotransformation der Lipase CrL mit den entsprechenden primären und sekundären Alkoholen.

Da sowohl die Produktausbeute als auch die Reaktionszeit durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration positiv beeinflusst werden kann, wurde in einer weiteren Optimierung die Enzymkonzentration auf $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhöht.^[331] Dazu wurde für die primären Alkohole ein Substrat-Acyldonor Verhältnis von 1:3 und für die sekundären und tertiären Alkohole ein Verhältnis von 1:6 angewendet.³⁸ Anhand der **Abbildung 95** zeigt sich, dass bei einer Inkubationszeit von 115 h unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration eine nahezu quantitative Umsetzung mit den primären Alkoholen erzielt werden kann. Mit den sekundären Alkoholen L-Menthol (**1**) und Cyclademol (**209**) kann hingegen bei einer Steigerung der Enzymmenge eine Ausbeuteerhöhung von 22 % für L-Menthylacetat (**221**) und von 49 % für die Rosamusk Diastereomere (**222**) erzielt werden. Folglich werden für die nachfolgenden Optimierungen $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Lipase CrL für die primären und $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Lipase CrL für die sekundären Alkohole eingesetzt. Bei der Biotransformation der tertiären Alkohole kann erneut keine Produktbildung bestätigt werden, sodass die in der Literatur beschriebene Substratazeptanz gegenüber tertiären Alkoholen unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht bestätigt werden kann. Daher werden die tertiären Alkohole bei der weiteren Optimierung nicht mehr als Substrate verwendet. Dennoch kann anhand der Acetatbildung der akzeptierten Alkohole die Präferenz gegenüber den primären Alkoholen bestätigt werden. Dies kann auf das hauptanteilig enthaltene Isoenzym LIP1 zurückgeführt werden.^[237,306]

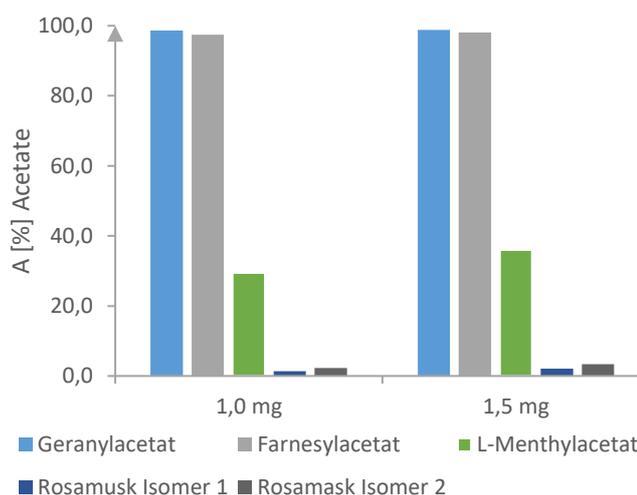


Abbildung 95: Vergleich der Acetatausbeute mit einer Enzymkonzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ und mit $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Lipase CrL.

Des Weiteren wurde eine zeitabhängige Temperatur-Optimierung durchgeführt (**Abbildung 96**). Dazu wurden über einem Zeitraum von 24 h – 188 h jeweils in einer Doppelbestimmung fünf Temperaturreihen für die primären und sekundären Hydroxy-Testsubstrate aufgenommen. Hierbei wurden Temperaturen bis 50°C gewählt, da die Enzyme aufgrund einer Konformationsstabilität in hydrophoben Umgebungen oftmals eine höhere Stabilität erfahren und somit selbst bei hohen

³⁸ Entsprechend den Ergebnissen aus der vorhergehenden Optimierung des Substrat-Acyldonor-Verhältnisses. Das Verhältnis von 1:3 für die primären Alkohole wurde ebenfalls durch Studien von RAMILJAJONA bestätigt.^[315]

Temperaturen aktiv sind.^[332] Weiterhin sollten anhand der zeitabhängigen Umsetzung die optimalen Inkubationszeiten für die primären und sekundären Alkohole ermittelt werden, wobei bereits gezeigt wurde, dass die Ausbeuten mit zunehmender Reaktionsdauer erhöht werden können.^[315]

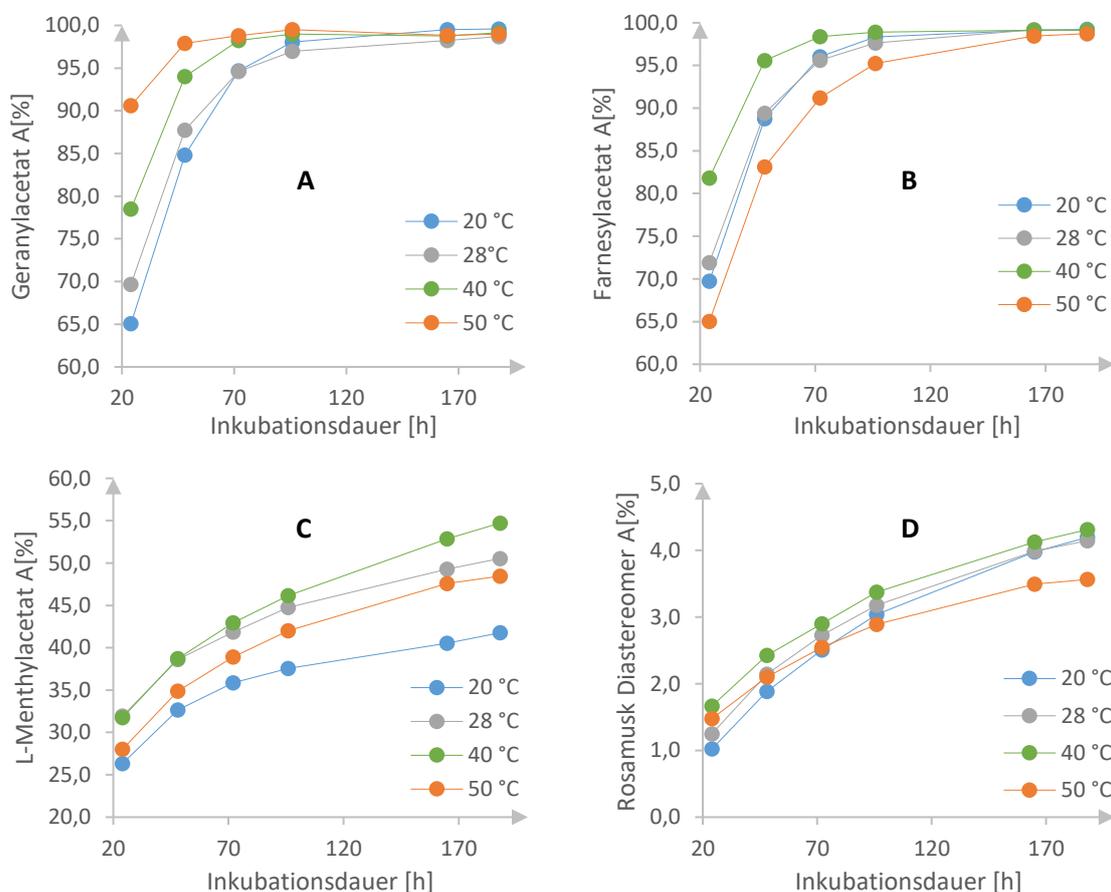


Abbildung 96: Zeitabhängige Optimierung der Temperatur ausgewählter primärer und sekundärer Alkohole mit der Lipase CrL. **A:** Biotransformation von Geraniol zu Geranylacetat, **B:** Biotransformation von (*E,E*)-Farnesol zu (*E,E*)-Farnesylacetat, **C:** Biotransformation von L-Menthol zu L-Menthylacetat, **D:** Biotransformation von Cyclademol zu Rosamusk. Die Umsetzung ist beispielhaft für das Diastereomer 2 abgebildet. Für das weitere Diastereomer ergibt sich ein identisches Verhalten.

Anhand der **Abbildung 96** ist ersichtlich, dass die primären Alkohole Geraniol (**141**) und (*E,E*)-Farnesol (**96**) bereits ab einer Reaktionszeit von 72 h quantitativ zu den entsprechenden Acetaten (**219**, **220**) umgesetzt wurden. Hierbei konnte für Geraniol (**141**) eine optimale Temperatur von 50°C verifiziert werden, während für die Umsetzung mit dem Sesquiterpen (*E,E*)-Farnesol (**96**) die höchsten Umsatzraten bei einer Inkubationsdauer von 72 h und 40°C erzielt wurden. Beide zeigen zudem, dass quantitative Umsetzungen mit fortschreitender Inkubationszeit auch bei den weiteren überprüften Temperaturen erzielt wurden. Bei den sekundären Alkoholen L-Menthol (**1**) und Cyclademol (**209**) wurden die höchsten zeitlich abhängigen Ausbeuten an Acetaten bei einer Temperatur von 40°C erhalten. Allerdings zeigte sich, dass das Maximum der Ausbeute selbst nach einer Inkubationsdauer von 188 h nicht erreicht wurde. Daher würden bei der Biotransformation sterisch anspruchsvollerer Alkohole eine längere Inkubationszeit zu einer steigenden Produktausbeute beitragen. Auch eine weitere Erhöhung der eingesetzten Enzymkonzentration könnte die Produktausbeute erhöhen und gleichzeitig die Reaktionszeit verringern.^[331]

Weiterhin wurden verschiedenste organische Lösemittel als potentielle Reaktionsmedien getestet. Neben den unpolaren Lösemitteln Toluol, *n*-Hexan und *n*-Heptan wurden auch die polaren Lösemittel Diethylether und Ethylacetat ausgewählt. Letzteres hat zudem den Vorteil, dass es gleichzeitig als Lösemittel und Acyldonor fungieren kann, wobei eine Natürlichkeit des Prozesses gewährleistet wird.^[292,305,315] Allerdings zeigten bereits mehrere Studien, dass die Polarität des Lösemittels Einfluss auf die Reaktionskinetik und die Enzymstabilität des Biokatalysators nimmt.^[222,227]

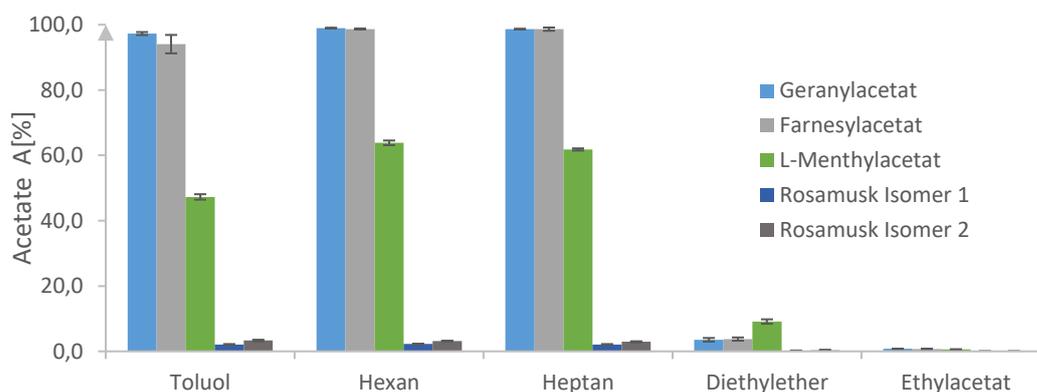


Abbildung 97: Überprüfung des Einflusses von organischen Lösemitteln unterschiedlicher Polarität auf die Produktbildung bei der enzymatischen Katalyse von primären und sekundären Alkoholen mit der Lipase CrL und dem Acyldonor Vinylacetat.

Anhand der **Abbildung 97** zeigt sich eindeutig, dass die Aktivität der Lipase CrL von der Polarität und demzufolge von dem logP-Wert³⁹ der eingesetzten Lösemittel abhängig ist.^[125,314] Je hydrophiler das Lösemittel, desto eher trägt es zu einer Denaturierung bei, indem die funktionale Struktur des aktiven Zentrums beeinflusst und die für die Aktivität der Lipase notwendige Hydrathülle von der Oberfläche des Enzyms abgelöst wird.^[222,227,308,321,329] Durch eine Nutzung der Lipase CrL in immobilisierter Form sowie einer erhöhten Enzymkonzentration könnte die Enzymaktivität in polaren Lösemitteln verbessert werden.^[222,227,310,329] Hinsichtlich der Akzeptanz der primären Alkohole Geraniol (**141**) und (*E,E*)-Farnesol (**96**) konnte bereits nach einer Inkubationsdauer von 24 h eine quantitative Umsetzung zu den Acetaten in den Lösemitteln *n*-Hexan und *n*-Heptan beobachtet werden. Mit Abnahme des logP-Werts, sinkt entsprechend auch die Produktbildung. Die höchsten Umsetzungen wurden bei *L*-Menthol (**1**) ebenfalls mit den unpolaren Lösemitteln erzielt. Im Gegensatz zu den weiteren Testsubstraten konnte mit *L*-Menthol (**1**) zudem eine akzeptable Acetylierung in Diethylether nachgewiesen werden. Ursächlich könnte eine Beeinflussung der Enantioselektivität oder auch eine durch das Lösemittel hervorgerufene Konformationsänderung der Lipase CrL sein.^[227] Die Substratakzeptanz des Cyclademol (**209**) wird ebenfalls durch die Wahl unpolarer Lösemittel begünstigt, allerdings kann keine signifikante Steigerung der Produktbildung beobachtet werden. Bei Verwendung der polaren Lösemittel Diethylether und Ethylacetat kann keine Umsetzung für das Substrat Cyclademol (**209**) nachgewiesen werden. Zusammenfassend wurden die in der **Tabelle 33** aufgeführten Bedingungen

³⁹ Der logP-Wert wurde bereits eingehend unter Kapitel 3.4.2 behandelt.

für die Umsetzungen primärer und sekundärer Alkohole mit der Lipase CrL bestimmt. Eine Substratazeptanz tertiärer Alkohole konnte hingegen nicht bestätigt werden. Hinsichtlich des Reaktionsmediums konnte in Übereinstimmung mit der Literatur festgestellt werden, dass die Lipase CrL stabil gegenüber unpolaren organischen Lösemitteln ist.^[217,218,310,333]

Tabelle 33: Optimierte Bedingungen für die Biotransformation der Lipase CrL mit primären und sekundären Alkoholen. Neben dem Verhältnis von Substrat zu Acyldonor (S:AD) wurde die Enzymkonzentration (c(CrL)), die Inkubationsdauer (t), die Temperatur (T) und das Lösemittel (LM) optimiert. Bei der Wahl des Lösemittels fiel die Entscheidung auf *n*-Hexan, da es gegenüber *n*-Heptan über eine bessere Flüchtigkeit verfügt und somit leichter zu entfernen ist.

Alkohol	S:AD	c(CrL) [mg·mL ⁻¹]	t [h]	T [°C]	LM
primär	1:3	1.0	> 24	40	<i>n</i> -Hexan
sekundär	1:6	1.5	> 180	40	<i>n</i> -Hexan

7.1.3 Isolierung und Biotransformation des Cyclademol-Hauptdiastereomers

Da das Cyclademol (**209**) bereits ohne vorherige Reinigung von der Lipase CrL akzeptiert wurde, die Produktausbeuten mit prozentualen Flächenanteilen unter 4 % allerdings sehr gering ausfielen, wurde das Hauptdiastereomer des Cyclademols (**209**) isoliert. Das gereinigte Diastereomer wurde anschließend erneut unter den zuvor optimierten Bedingungen mit der Lipase CrL transformiert, um einerseits den Umsetzungsgrad zu beurteilen und andererseits die gebildeten Rosamusk-Diastereomere (**222a,b**) denen des Cyclademols zuordnen zu können. Ferner wurden durch eine chirale GC die *ee*-Werte des isolierten Cyclademol Hauptdiastereomers vor und nach der Biotransformation bestimmt, um Informationen zur Stereopräferenz der eingesetzten Lipase CrL unter den gewählten Bedingungen zu erhalten.

Für die Isolierung des Cyclademol Hauptisomers wurde eine präparative HPLC (pHPLC) durchgeführt. Insgesamt wurden 65 mg des Isomers isoliert, wobei die Reinheit des Diastereomers von 53.0 % auf 98.1 % gesteigert wurde. Um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten erfolgte anschließend eine enzymatische Katalyse der Lipase CrL sowohl mit dem isolierten Hauptisomer als auch mit dem als Seitenstrom erhaltenen Diastereomergemisch. In der **Tabelle 34** ist eine graphische Überlagerung der beiden Biotransformationen ersichtlich sowie die prozentualen Flächenanteile der eingesetzten Substrate und der entstehenden Rosamusk-Diastereomere (**222a,b**). Während mit der DB5-Säule eine Trennung der Rosamusk-Diastereomere möglich gewesen ist, konnte analog zur unpolaren DB1-Säule keine Auftrennung der Cyclademol-Diastereomere (**209**) erreicht werden, sodass diese coeluierten. Anhand des Chromatogramms sowie der RI zeigt sich, dass dem isolierten Hauptdiastereomer Cyclademol eindeutig das Rosamusk Diastereomer **222a** zugeordnet werden kann. Folglich wird das Stereoisomer **222b** aus dem Cyclademol-Nebendiastereomer gebildet. Eine Umsatzerhöhung durch eine vorhergehende Isolierung des Substrates trägt zu keiner signifikanten Ausbeutesteigerung von **222a** bei. Ein möglicherweise auftretender inhibitorischer Effekt gegenüber der Lipase CrL durch die enthaltenen

NebenkompONENTEN ist demnach nicht ersichtlich. Anhand der Umsatzrate⁴⁰ zeigt sich außerdem, dass das Cyclademol-Nebendiastereomer bevorzugt von der Lipase CrL akzeptiert wurde, da das entsprechende Rosamusk-Stereoisomer **222b** zu einem signifikant höheren Anteil gebildet wurde.

Tabelle 34: Bestimmung der Retentionsindices (RI) und prozentualen Flächenprozent A[%] nach der Biotransformation der Lipase CrL mit dem Seitenstrom Cyclademol sowie dem isolierten Cyclademol-Hauptdiastereomer. Für die Bestimmung der prozentualen Peakflächen wurden nur der Peak des eingesetzten Substrats Cyclademol sowie die entstehenden Rosamusk-Diastereomere integriert. Der Umsatzrate (X) wurde anhand der prozentualen Flächenanteile der eingesetzten Edukte vor der Biotransformation und den entstehenden Rosamusk-Peakflächen nach der Biotransformation ermittelt. Bei dem im Seitenstrom sichtbaren Nebenprodukt **218** handelt es sich um 2,6,6-Trimethylcycloheptan-1-ol.

	RI _{DB5}	A [%] _{DB5}	X [%]	Chromatogramm
209	1164	91.8		
222a	1289	3.4	6.4	
222b	1293	4.7	34.6	
209	1164	92.9		
222a	1289	7.1	7.2	
222b	1293	4.7	34.6	

Zudem wurden mittels chiraler GC die *ee*-Werte vor und nach der Biotransformation des hauptanteiligen Cyclademol Enantiomerenpaares bestimmt. Hierbei konnte lediglich ein geringfügiger Anstieg des *ee*-Wertes von 37.4 % auf 39.7 % festgestellt werden, sodass keine eindeutige Stereopräferenz der Lipase CrL bestätigt werden konnte. Ob das Rosamusk (**222a,b**) insgesamt ebenfalls als vier Stereoisomere vorliegt, konnte aufgrund fehlender Referenzsubstanzen und zu geringer Substanzmengen nicht verifiziert werden.

7.2 Studien zur absoluten Stereochemie des Cyclademol (209)

Die vorliegenden Stereoisomere des Cyclademols (**209**) wurden bisher nicht hinsichtlich deren absoluter Konfiguration untersucht. Daher erfolgte eine Bestimmung der absoluten Stereochemie anhand des isolierten Cyclademol-Diastereomers, indem eine MOSHER-Ester-Analyse durchgeführt wurde. Die MOSHER-Methode ist eine absolute Methode, die hauptsächlich dazu verwendet wird die absolute Konfiguration von sekundären Alkoholen zu bestimmen.^[334] Dazu wird der chirale Alkohol sowohl mit dem (*S*)- als auch mit dem (*R*)-konfigurierten MTPA(-Cl)⁴¹ umgesetzt und in die entsprechenden diastereomeren MOSHER-Ester überführt. Anschließend werden die chemischen Verschiebungen relevanter Protonen im ¹H-NMR-Spektrum miteinander verglichen. Hierbei wird die unterschiedliche Wechselwirkung des Phenylrings mit den Resten des sekundären Alkohols ausgenutzt, welche zu abweichenden chemischen Verschiebungen im ¹H-NMR-Spektrum führen. So liegt die Phenylgruppe im Falle des (*S*)-MOSHER-Esters mit der Alkylrest R¹ in einer Ebene, sodass

⁴⁰ Die Umsatzrate wurde anhand der prozentualen Flächenanteile der Cyclademol-Diastereomere sowie den entstehenden prozentualen Peakflächen des Diastereomere des Rosamusk ermittelt.

⁴¹ MTPA: α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetat; MTPA-Cl: α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid

die Protonen aufgrund des induzierten Ringstromeffekts eine Abschirmung erfahren und im Vergleich zum R²-Alkylrest diamagnetisch zu kleineren Frequenzen verschoben sind (**Abbildung 98**). Bei dem (*R*)-MOSHER-Ester verhält es sich hingegen umgekehrt, sodass durch Differenzbildung der chemischen Verschiebungen die absolute Konfiguration des stereogenen Zentrums ermittelt werden kann.

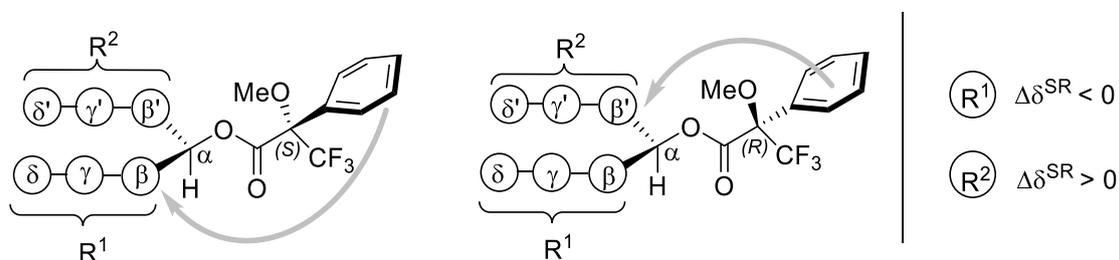


Abbildung 98: Die Trifluormethylgruppe, der Ester und das C_α-H-Wasserstoffatom liegen in einer Ebene, während die Alkylreste R¹ und R² vor bzw. hinter der Ebene liegen und bei gleicher Orientierung wie die Phenylgruppe einen diamagnetischen Effekt (grauer Pfeil) erfahren. Durch Differenzbildung ($\Delta\delta^{SR}$) der chemischen Verschiebungen der Protonen der Reste R¹ und R² beider MOSHER-Ester kann die absolute Konfiguration des stereogenen Zentrums α bestimmt werden.

Das Cyclademol-Hauptdiastereomer (**209**) wurde mit den Enantiomeren des MTPA-Cl in die jeweiligen MOSHER-Ester (**223**) überführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde der (*R*)-Ester in quantitativer Ausbeute und der (*S*)-Ester in 71 % Ausbeute erhalten. Da das eingesetzte Cyclademol (**209**) ein *ee*-Wert von 37.4 %⁴² aufweist wurden für jede Umsetzung zwei komplette ¹H-NMR-Signalsätze erhalten. Diese weisen ein Verhältnis von 2:1 auf, was eine gute Übereinstimmung mit dem über chirale GC ermittelten *ee*-Wert darstellt. Anhand eines Vergleichs der chemischen Verschiebungen konnte ein Effekt durch die Phenylgruppe für die drei endständigen Methylgruppen beobachtet werden. Durch eine Differenzbildung konnte anschließend für das Hauptenantiomer (**223a**) eine (*S*)-Konfiguration ermittelt werden, während das weitere Enantiomer (**223b**) ein (*R*)-konfiguriertes stereogenes Zentrum aufweist (**Abbildung 99**).

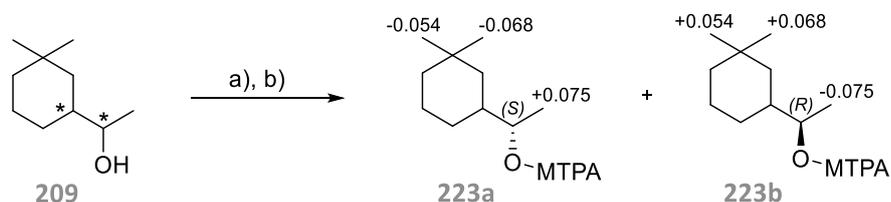


Abbildung 99: Synthetische Umsetzung des Cyclademol mit den Enantiomeren des MTPA-Cl zu den entsprechenden diastereomeren (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Estern: a) (*S*)-MTPA-Cl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → RT, 4 h, quant.; b) (*R*)-MTPA-Cl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C, 2 h, 71 %. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem eingesetzten Cyclademol um Enantiomere handelt, wurden zwei diastereomere Ester je Umsetzung erhalten.

⁴² Die Bestimmung des *ee*-Wertes erfolgte anhand der prozentualen Flächenanteile der Peaks mittels chiraler GC. Hierbei konnte für das Hauptenantiomer ein Anteil von 68.7 % (**209a**) und für das weitere Enantiomer ein Anteil von 31.3 % (**209b**) bestimmt werden.

Anschließend wurde anhand ausgewählter 1D-noe-Experimente und Kopplungskonstanten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum versucht, dass über den MOSHER-Ester aufgeklärte Carbinol-Stereozentrum als stereogenen Anker für die Bestimmung des weiteren Stereozentrums zu nutzen. Hierbei konnte die relative Konfiguration des Cyclohexanrings einwandfrei ermittelt werden (**Abbildung 100**). Allerdings zeigte sich, dass aufgrund der freien Drehbarkeit des Methylcarbinolrests keine aussagekräftigen Magnetisierungstransfers in den Cyclohexanring erhalten wurden, sodass eine Aufklärung des weiteren Stereozentrums verwehrt blieb.

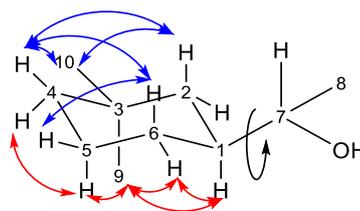
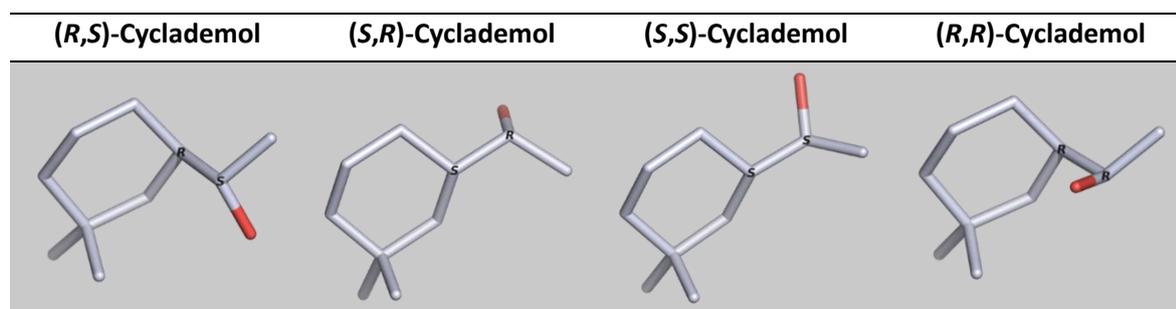


Abbildung 100: Bestimmung der relativen Stereochemie des Cyclohexanrings von Cyclademol. Die freie Drehbarkeit verhindert die Bestimmung der absoluten Konfiguration.

Daher wurden in einem weiteren Schritt quantenmechanische Berechnungen mit den vier möglichen Stereoisomeren des Cyclademol (**209**) durchgeführt (**Tabelle 35**).⁴³ Erstaunlicherweise offenbarte sich anhand der Kraftfeldberechnungen, dass bei einem (*R*)-konfigurierten Stereozentrum des Cyclohexanrings eine axiale Ausrichtung des Methylcarbinolrests wahrscheinlicher zu sein scheint, während bei einer (*S*)-Konfiguration die vermutete äquatoriale Orientierung energetisch begünstigt ist. Allerdings konnten bei Vergleich der einzelnen Stereoisomere keine signifikanten Abweichungen in Bezug auf die thermodynamischen Kenngrößen festgestellt werden, sodass erneut keine weiteren Anhaltspunkte zur absoluten Konfiguration erhalten wurden.

Tabelle 35: Durch Kraftfeldberechnungen ermittelte wahrscheinlichste Konformationen der vier möglichen Stereoisomere des Cyclademol. Die Isomere (*R,S*)- und (*S,R*)- bzw. (*S,S*)- und (*R,R*)- bilden jeweils ein Enantiomerenpaar, die sich diastereotop zueinander verhalten.



Als weitere zukünftige Möglichkeiten zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des Cyclademol (**209**) könnte neben der Verwendung von NMR-Shift-Reagenzien auch eine Derivatisierung mit anschließende Röntgenkristallstrukturanalyse⁴⁴ in Frage kommen.

⁴³ Die Berechnungen erfolgten mittels dem Programm SCHRÖDINGER Suite Maestro und unter Verwendung der Standardparametersätze.

⁴⁴ Unter der Voraussetzung das lediglich eines der beiden Enantiomere nach der Derivatisierung auskristallisiert und dadurch eine Enantiomerentrennung erzeugt wird.

7.3 Enzymatische Umsetzungen mit der Lipoxygenase

Die Eigenschaft zur Cooxidation der LOX-katalysierten HPOD-Bildung in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ermöglicht die Oxidation von Terpenoiden in allylischer Position.^[275,276] Durch die Einführung einer Sauerstofffunktionalität, werden Verbindungen erhalten, die oftmals über ein sensorisches Profil verfügen und somit von Interesse für die Duft- und Aromaindustrie sind.^[149,150] In der vorliegenden Arbeit wurde eine LOX aus Sojabohnen (*Glycine max*) von Carl Roth verwendet, die eine Enzymaktivität von $\geq 100000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ aufweist. Die eingesetzte LOX wurde ohne weitere Reinigung für die analytischen Enzymtests und semi-präparativen Umsetzungen eingesetzt.

Sojabohnen stellen die reichste und auch bekannteste Quelle für die Isolierung einer LOX dar,^[259] weshalb die LOX aus *Glycine max* ausgiebig erforscht wurde und deren Kristallstruktur als Referenz für weitere LOXn gilt.^[244,249] Die LOXn aus Sojabohnen setzen sich aus mindestens acht⁴⁵ verschiedenen Isoenzymen zusammen, die sich hinsichtlich Cooxidationsverhalten, Regio- und Stereoselektivität sowie den optimalen Reaktionsbedingungen voneinander unterscheiden.^[244,254,256] Da es sich um eine pflanzliche LOX handelt, sind Linolensäure und Linolsäure (LA) die typischen Substrate der LOX, wobei Letzteres als das am häufigsten verwendete Substrat fungiert.^[244] Für das Isoenzym LOX-1 konnte bereits ein optimaler pH-Wert von pH 9.0 nachgewiesen werden.^[244,253,256] Zudem weist die LOX-1 eine (S)-Selektivität auf und bildet mit LA als Substrat 13(S)-HPOD als Hauptprodukt.^[244,335] GARDENER^[270] konnte allerdings zeigen, dass die Regioselektivität der LOX-1 maßgeblich durch den pH-Wert beeinflusst wird. Während oberhalb von pH 8.5 nahezu ausschließlich 13(S)-HPOD gebildet wird, kann unterhalb von pH 8.5 ein linearer Anstieg der 9(S)-HPOD-Bildung beobachtet werden, die bei pH 6.0 das Maximum (25 %) erreicht.^[270] Unterhalb von pH 6.0 konnte GARDENER keine LOX-1 Aktivität feststellen, dafür jedoch eine stark ansteigende Autoxidation. Diese kann dabei auf chemische Prozesse zurückgeführt werden, da eine racemische HPOD-Bildung ohne die für LOXn charakteristische Selektivität beobachtet wurde.^[270,335] Weiterhin zeigt die LOX-1 geringfügige cooxidative Eigenschaften gegenüber Carotenoiden unter aeroben Bedingungen.^[259] Unter Sauerstoffausschluss steigt die Fähigkeit zur Cooxidation allerdings deutlich.^[257,273] Das Isoenzym LOX-2 weist hingegen einen optimalen pH-Wert von pH 6.8 auf und bildet 9(S)- und 13(S)-HPOD in einem Verhältnis von 1:1 aus.^[244,336] Außerdem besitzt das Isoenzym LOX-2 starke cooxidierende Eigenschaften unter aeroben Bedingungen.^[273] Das Isoenzym LOX-3 zeigt hingegen die höchste Ausbeute an HPOD bei einem pH-Wert von pH 6.5.^[256] Zudem bildet LOX-3 als Hauptprodukt 9(S)-HPOD (65 %), sodass das Isoenzym eine entgegengesetzte Regioselektivität bezogen auf LOX-1 aufweist.^[256,337] Zudem zeigt LOX-3 in Analogie zur LOX-2 eine ausgeprägte Fähigkeit zur Cooxidation unter aeroben Bedingungen.^[258] Es wird hierbei angenommen, dass abweichend vom Mechanismus der HPOD-Bildung für LOX-1 (s. Kap. 5.2.3), unter aeroben Bedingungen eine Freisetzung des Fettsäureradikals erfolgt. Dieses scheint anschließend außerhalb des katalytischen Zentrums mit molekularem Sauerstoff zu

⁴⁵ Die Isoenzyme LOX-1, LOX-2 und LOX-3 wurden bereits näher untersucht.^[254]

reagieren, wodurch ein freies Peroxyradikal ausgebildet wird, welches für die Cooxidation verantwortlich gemacht wird.^[242]

Zur Beurteilung der Reinheit wurde vor Beginn der Umsetzungen zunächst eine SDS-Page mit der LOX aus *Glycine max* (**Abbildung 101**) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass keine Trennung in die einzelnen Isoenzyme erzielt werden konnte, aufgrund einer zu geringen Abweichung der einzelnen Molekulargewichte. Dennoch kann anhand der ausgeprägten Bande bei 94 kDa eine Übereinstimmung mit der molekularen Masse der LOX aus *Glycine max* nachgewiesen werden.^[254] Bei den schwach ausgeprägten Banden bei etwa 30 kDa und 53 kDa könnte es sich um die Domänen der LOX handeln. Eine weitere Bande bei etwa 79 kDa kann nicht zugeordnet werden.

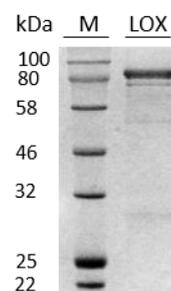


Abbildung 101: SDS-Page LOX aus *Glycine max*. M: Marker.

Die Optimierungen zur HPOD-Produktion und Cooxidation wurden separat durchgeführt, um zunächst die optimalen Bedingungen für die Bildung der HPOD zu verifizieren (s. Kap. 7.3.1). Als Substrat wurde Linolsäure ausgewählt. Im Anschluss wurde die Cooxidation näher untersucht, um die Produktausbeute zu steigern (s. Kap. 7.3.2). Dazu diente als Testsubstrat das Sesquiterpen (+)-Valencen (**3**), da dieses als einziges Terpenoid bereits erfolgreich mit der LOX aus *Glycine max* cooxidiert wurde.^[280]

7.3.1 Optimierung der HPOD-Bildung

Die Verfolgung der HPOD-Bildung erfolgte photometrisch. Dazu wurde zunächst das Absorptionsmaximum der LA-HPOD ermittelt, indem eine Absorptionskurve im Bereich von 200 nm bis 750 nm aufgenommen wurde. Hierbei konnte in Übereinstimmung mit CHOHANY^[252] ein Absorptionsmaximum von 234 nm ermittelt werden, welches durch die konjugierte Dieneinheit der (*E,Z*)-konfigurierten HPOD bedingt ist. Der Extinktionskoeffizient der LA-HPOD wurde bereits von JOHNSTON auf $\epsilon = 25000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt.^[338]

Anschließend wurde die Bildung der HPOD über einen Zeitraum von 30 min verfolgt, wobei ein Ansatz sowohl mit der LOX als auch dem Substrat LA durchgeführt wurde, während ein weiterer nur das Substrat LA enthielt. Letzterer ermöglichte dabei Aussagen zu einer möglicherweise auftretenden Autoxidation. Um eine Linearität des Photometers zu gewährleisten, wurde die Verdünnung der Proben so gewählt, dass Extinktionswerte < 1.0 erhalten wurden. Als Blindwert diente der verwendete Puffer. Anhand der **Abbildung 102** wird ersichtlich, dass die Autoxidation der

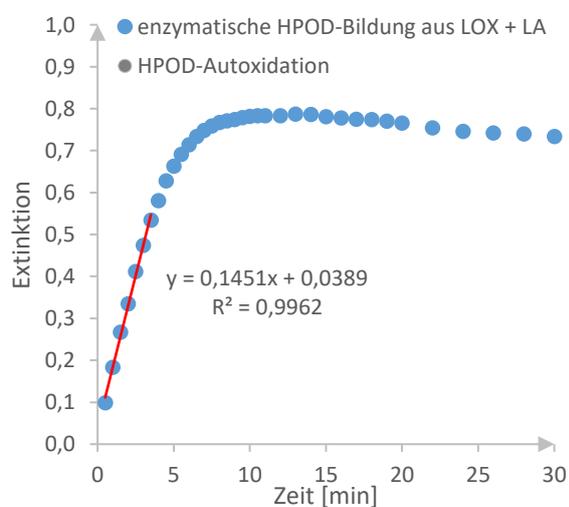


Abbildung 102: Zeitliche Verfolgung der HPOD-Bildung anhand der aufgenommenen Extinktion. Der lineare Bereich der enzymatisch erzeugten HPOD-Kurve ist rot markiert.

Linolsäure im betrachteten Zeitintervall vernachlässigbar ist und im Größenbereich des Blindwertes liegt. Die Bildung der enzymatisch erzeugten HPOD zeigte zunächst den charakteristischen linearen Anstieg, ehe die Kurve das Maximum erreicht. Mit fortlaufender Inkubationsdauer konnte allerdings ein leichter Abfall der Kurve beobachtet werden. Dies kann auf eine Metabolisierung der gebildeten HPOD durch die LOX zurückgeführt werden. LOXn sind multifunktionelle Enzyme, die neben der Dioxygenierung von Fettsäuren auch über eine Hydroperoxidasen-Aktivität verfügen, wodurch die HPOD zu Sekundärmetaboliten umgesetzt werden.^[246] Unter Einbezug des molaren Extinktionskoeffizienten kann die maximale HPOD-Konzentration auf 787 μM bestimmt werden. Dies entspricht einer Umsatzrate von 90.8 % der eingesetzten LA. Anhand des linearen Bereichs kann die Reaktionsgeschwindigkeit der HPOD-Bildung auf $5.8 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt werden.

Um die Reaktionsgeschwindigkeit der HPOD-Bildung sowie die Umsatzrate weiter zu erhöhen, wurde eine Optimierung der Reaktionsparameter Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke durchgeführt. Hinsichtlich der Ionenstärke erfolgte die pH-Wert Optimierung mit 50 mM und 0.1 M Puffern über einen pH-Bereich von pH 4.0 - 10.0. Für die Temperatur-Optimierung wurde ein Bereich von 20°C - 45°C ausgewählt. Es erfolgte eine zeitliche Verfolgung der HPOD-Bildung unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen, wobei durch eine Auftragung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit eine ansteigende Kurve erhalten wurde. Durch die Ermittlung des linearen Bereichs anhand des Bestimmtheitsmaßes R^2 konnte anschließend durch die Steigung, den Extinktionskoeffizienten sowie der Schichtdicke die Reaktionsgeschwindigkeit v ermittelt werden. Eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit entspricht hierbei einer gesteigerten LOX-Aktivität, wodurch höhere Ausbeuten an HPOD in kürzerer Zeit erzielt werden können.

Für die Temperatur-Optimierung konnten zwei ausgeprägte Maxima ermittelt werden (**Abbildung 103**). Hierbei liegt für das Maximum bei 20°C eine Übereinstimmung mit Messungen von KERMASHA vor, sodass dieses dem Isoenzym LOX-1 zugeordnet werden kann.^[339] Das weitere Temperaturmaximum im Bereich von $35 - 40^\circ\text{C}$ könnte den weiteren Isoenzymen der *Glycine max* zugeordnet werden, allerdings liegen hierzu keine Angaben bezüglich der optimalen Temperaturen dieser Isoenzyme vor.

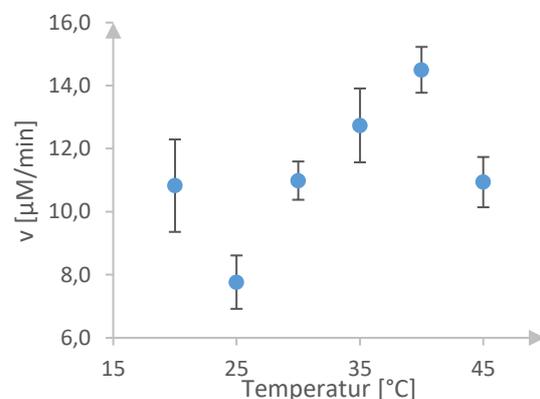


Abbildung 103: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von der Temperatur für enzymatische Katalyse der LOX mit dem Substrat LA zu den HPODn.

Für die pH-Wert Optimierung konnte das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit v zur Bildung der HPOD im Bereich von pH 8 – 10 ermittelt werden (**Abbildung 104, A**). Dieses Maximum kann auf eine erhöhte Aktivität des Isoenzym LOX-1 zurückgeführt werden, für das ein pH-Optimum von pH 9.0 durch mehrere Studien nachgewiesen wurde.^[244,252,256,270,274] Eine Auftragung der Umsatzrate der HPOD-Bildung gegen den pH-Wert zeigt, dass die höchsten Ausbeuten an HPOD im alkalischen Bereich erzielt wurden (**Abbildung 104, B**). Unterhalb von pH 7.0 wurde hingegen ein drastischer Verlust an HPOD beobachtet. Dieses Verhalten kann darauf zurückgeführt werden, dass das

Substrat LA bei hohen pH-Werten als Salz vorliegt, wodurch eine verbesserte Löslichkeit des Substrats in der wässrigen Phase sowie höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsetzungsraten erzielt werden können.^[248,340] Gleichzeitig erhöht auch die Bildung der HPOD die Löslichkeit der LA, sodass die Reaktion weiter fortschreitet.^[248] Ein Einfluss der Ionenstärke auf die HPOD-Bildung bzw. die LOX-Aktivität kann anhand der erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

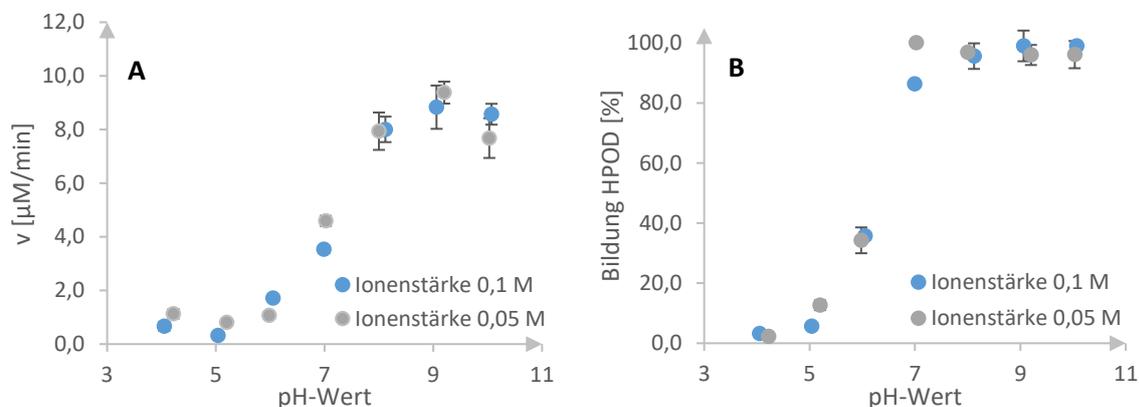


Abbildung 104: A: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v der HPOD in Abhängigkeit von dem pH-Wert bei Nutzung von Puffern mit unterschiedlicher Ionenstärke. B: Auftragung der Umsatzrate der HPOD-Bildung in Abhängigkeit von dem pH-Wert bei Verwendung von Puffern mit unterschiedlicher Ionenstärke.

Des Weiteren wurde überprüft, inwieweit eine saure bzw. basische Aufarbeitung und die Wahl des Extraktionsmittels den Übergang der HPOD in eine organische Phase begünstigen. Es ist hierbei von besonderem Interesse Bedingungen zu identifizieren, die eine Abtrennung der gebildeten HPOD von den cooxidierten Terpenoiden in einfacher Weise erlaubt. Hintergrund ist die Beeinflussung des olfaktorischen Profils durch die HPOD und LA.^[258] Zudem eignen sich LA- und HPOD-belastete Proben nicht für eine GC-Analytik mittels unpolaren Trennsäulen.

Dazu wurden zunächst die organischen Lösemittel *n*-Hexan und MtBE als Extraktionsmittel ausgewählt. Die Bestimmung der extrahierten HPOD erfolgte indirekt durch photometrische Messung der wässrigen Phase bei 234 nm nach Extraktion mit dem jeweiligen Lösemittel⁴⁶. Die Ermittlung der HPOD-Konzentration geschah anhand der LAMBERT-BEER'schen Gesetzes, wobei die erhaltenen Daten normiert wurden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Anhand der **Abbildung 105** ist ersichtlich, dass mit *n*-Hexan als Lösemittel nur 18 % der HPOD in die organische Phase überführt wurden, während mit MtBE als Extraktionsmittel 87 % extrahiert wurden. Diese Beobachtung begründet sich in der Polarität der Lösemittel. Da die HPOD in basischer Umgebung als Carboxylate vorliegen, ist die Extraktion mit aprotisch-polaren gegenüber aprotisch-unpolaren Lösemitteln begünstigt.^[270,339,341]

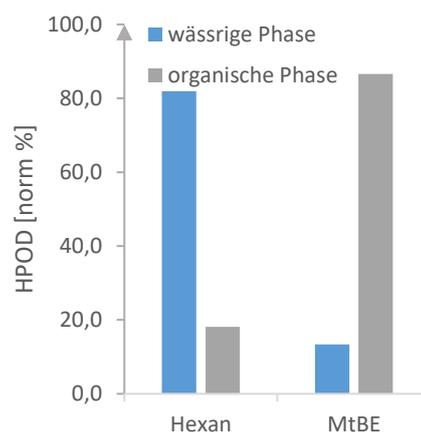


Abbildung 105: Extraktionsverhalten der HPOD bei Verwendung von *n*-Hexan und MtBE als Lösemittel. Die Bestimmung erfolgte photometrisch bei 234 nm.

⁴⁶ Der pH-Wert der analytischen Enzymtests belief sich auf pH 9.

Ferner wurde der Einfluss einer sauren und einer basischen Aufarbeitung auf die Extraktionsfähigkeit der HPOD und der LA mit *n*-Hexan beurteilt. Dazu wurden zwei identische analytische Enzymtests angesetzt und nach Beendigung der Biotransformation ein Ansatz mit 1 % Ameisensäure versetzt, sodass ein pH-Wert von etwa pH 3.0 eingestellt wurde.^[342] Die Detektion der gebildeten HPOD sowie der nicht umgesetzten LA erfolgte anhand der charakteristischen Massen von *m/z* 279 für LA und *m/z* 311 für die HPOD mittels LC-QToF. In der **Tabelle 36** sind die integrierten Peakflächen der eluierten LA und HPOD zusammenfassend aufgeführt. Es zeigte sich, dass der Anteil der extrahierten LA und HPOD stark durch die Wahl des pH-Wertes beeinflusst wird. So konnten nach der basischen Aufarbeitung deutlich geringere Anteile in die organische Phase überführt werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die HPOD und die LA tensidaktive Eigenschaften besitzen.^[340] Entscheidend für die Extraktionsfähigkeit ist dabei das Vorliegen der Verbindungen als Carbonsäuren oder Carboxylat. Während im basischen pH-Bereich die Verbindungen als Salz vorliegen und somit eine gute Löslichkeit in wässrigen Phasen gewährleistet ist, liegt im Säuren die protonierte Säure vor, wodurch eine Extraktion in die organische Phase aufgrund des langkettigen unpolaren Rests begünstigt wird.^[248,340]

Tabelle 36: Detektion von LA und HPOD mittels LC-QToF bei basischer (pH 9) und saurer (pH 3) Aufarbeitung. Es sind die integrierten Flächen (cts) der Verbindungen angegeben.

	pH 3	pH 9
LA [cts]	181	40
HPOD [cts]	635	148

Zusammenfassend lässt sich für die Optimierung der HPOD-Bildung und Aufarbeitung festhalten, dass als optimale Temperaturen 20°C bzw. 35-40°C gewählt werden sollten. In Bezug auf den pH-Wert resultierte eine maximale LOX-Aktivität im basischen pH-Bereich (pH 9.0) erzielt wurde, während die Ionenstärke der verwendeten Puffer keinen Einfluss auf die HPOD-Bildung nehmen. Insgesamt konnte durch die Temperatur- und pH-Wert-Optimierung die anfänglich ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit von $5.8 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ mehr als verdoppelt ($14.6 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) werden. Hinsichtlich der Wahl des Extraktionsmittels und der Aufarbeitung zeigte sich, dass die HPOD und LA mit einem aprotisch-polaren Lösemittel wie MtBE und unter sauren Bedingungen erfolgreich aus der wässrigen Phase extrahiert werden können. Bei einer Cooxidation ist hingegen eine Extraktion unter basischen Bedingungen mit *n*-Hexan angebracht, um einerseits die gebildeten cooxidierten Terpenoide zu gewinnen und andererseits die Mitextraktion der HPOD und LA zu vermeiden.

7.3.2 Optimierung der Cooxidation

Zur Überprüfung, ob die LOX direkt an der Cooxidation oder nur an der Bildung der HPOD beteiligt ist, wurden analytische Enzymtests in einem einstufigen und zweistufigen Prozess durchgeführt (**Abbildung 106**). Bei Letzterem wurden zunächst die HPOD gebildet, welche anschließend extrahiert wurden und in einem zweiten Schritt mit dem Cosubstrat und unter Abwesenheit der LOX umgesetzt wurden. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde zudem ein weiterer zweistufiger Prozess durchgeführt, bei dem auch bei der Cooxidation das Enzym LOX zugesetzt wurde. Bei einem einstufigen Prozess wurden hingegen das Enzym LOX, das Substrat LA und das Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) alle gemeinsam in einem Ansatz inkubiert. Die Umsatzrate der Cooxidation wurde anhand des gebildeten Hauptprodukts Nootkaton bestimmt.

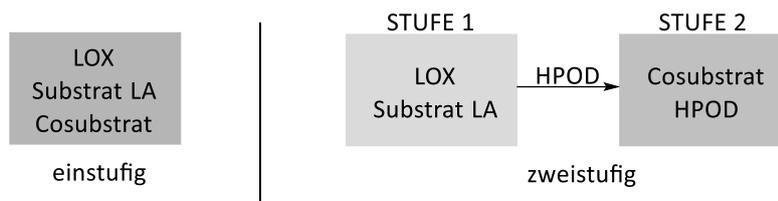


Abbildung 106: Schematische Darstellung eines ein- und zweistufigen Prozesses. Der zweistufige Prozess unterteilt sich in die HPOD-Bildung (Stufe 1) und die Cooxidation (Stufe 2), während bei dem einstufigen Prozess, beide Stufen simultan erfolgen.

Anhand der **Abbildung 107** wird ersichtlich, dass die LOX eindeutig nicht an der Cooxidation beteiligt zu sein scheint, da identische Ausbeuten an Nootkaton erzielt wurden, unabhängig davon, ob das Enzym LOX bei der Cooxidation zugegen ist oder nicht. Ein Vergleich des einstufigen mit dem zweistufigen Prozess offenbarte, dass mit Ersterem zudem höhere Ausbeuten an Nootkaton erzielt wurden. Ursächlich hierfür ist erneut die Multifunktionalität der LOX, weshalb die gebildeten HPOD durch die HPOD-Lyase-Eigenschaften der LOX zu Sekundärmetaboliten abgebaut werden.^[246] Je

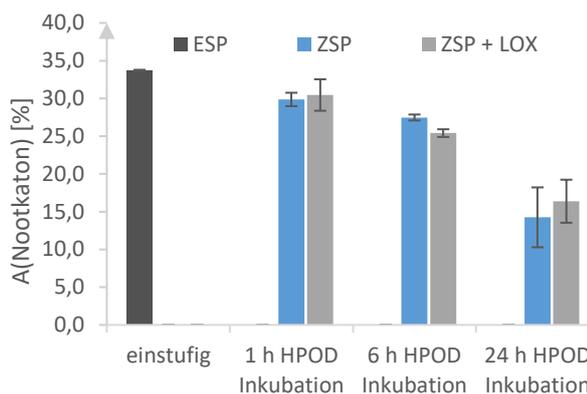


Abbildung 107: Vergleich eines einstufigen (ESP) mit einem zweistufigen (ZSP) Prozess zur HPOD-katalysierten Cooxidation. Zur Vergleichbarkeit wurde ein zweistufiger Enzymtest mit (ZSP+LOX) und ohne LOX (ZSP) bei der Cooxidation durchgeführt. Zudem wurden unterschiedliche Inkubationszeiten für die erste Stufe (HPOD-Bildung) gewählt, um den Einfluss auf die Ausbeute an Nootkaton zu beurteilen.

länger hierbei die erste Stufe (HPOD-Bildung) des zweistufigen Prozesses inkubiert wurde, desto geringer ist die Ausbeute an Nootkaton, da folglich weniger HPOD für die nachfolgende Cooxidation zur Verfügung stehen. Daher wurden die nachfolgenden analytischen Enzymtests als einstufige Prozesse durchgeführt, um einerseits einen Abbau der HPOD durch die LOX zu verringern und andererseits eine Vereinfachung des Reaktionssystems zu ermöglichen.

Zusätzlich erfolgte eine chemische Oxidation der Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) mit Wasserstoffperoxid. Ein Vergleich der Produktspektren zeigte, dass sowohl durch die enzymatisch katalysierte LOX-HPOD-Bildung als auch durch die chemische Oxidation mit H_2O_2 ein nahezu identisches Produktspektrum erzeugt wurde (**Tabelle 37**). Dies kann als ein weiterer Anhaltspunkt auf einen freien Peroxyradikalmechanismus der HPOD-induzierten Cooxidation gedeutet werden, der auch von WALDMANN und AZIZ angenommen wurde.^[257,273] Folglich sollte das Enzym LOX nicht direkt an der Oxidation des Terpenoids beteiligt sein, sondern lediglich an der Bildung der HPOD.

Die resultierenden Produkte beider Umsetzungen wurden anschließend hinsichtlich der prozentualen Flächenanteile näher bestimmt. Dazu wurde zunächst versucht einzelne Produkte anhand von RI und MS-Spektren zu identifizieren. Hierbei konnten Aristol-1(10)-en-12-ol (**226**), Nootkatol (**195**), α -Cyperon (**228**) und Nootkaton (**194**) eindeutig nachgewiesen werden. Nootkaton (**194**) wurde zudem durch eine Coinjektion verifiziert. Die weiteren Produkte

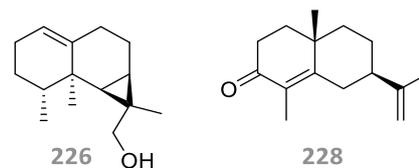
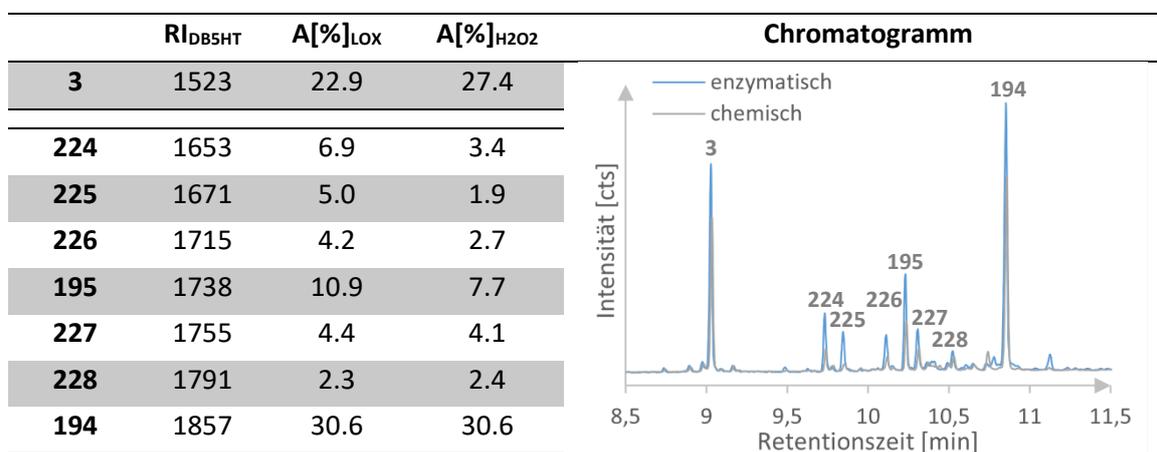


Abbildung 108: Über RI und MS-Spektren identifizierte Produkte Aristol-1(10)-en-12-ol (**226**) und α -Cyperon (**228**).

224, **225** und **227** konnten massenspektrometrisch nicht aufgeklärt werden. Da α -Cyperon (**228**) ein vom Edukt (+)-Valencens (**3**) abweichendes Kohlenstoffgrundgerüst aufweist (**Abbildung 108**), sollte dieses durch die Oxygenierung einer enthaltenen Nebenkomponente gebildet worden sein.⁴⁷

Tabelle 37: Überlagerung der enzymatisch katalysierten Peroxidation des (+)-Valencens (**3**) durch das LOX-Cooxidationssystem mit der chemisch induzierten Oxygenierung durch H_2O_2 . Weiterhin sind die prozentualen Flächenanteile des Valencens (**3**) sowie weiterer Produkte (**194**, **195** und **224-228**) für die enzymatische und chemische Peroxidation aufgelistet. Die Messungen erfolgten mit einer mittelpolaren DB5-HT Trennsäule.



Anhand der **Tabelle 37** zeigte sich, dass durch die enzymatisch produzierten HPOD höhere prozentuale Flächenanteile an den Produkten **195** und **224-227** erzielt wurden als durch die chemische induzierte Peroxidation mit H_2O_2 . Dies spiegelt sich zudem in der höheren Umsatzrate des (+)-Valencens (**3**) wider, welches bei der enzymatischen Peroxidation in geringeren Anteilen im Chromatogramm nachgewiesen wurde. Interessanterweise konnten sowohl mit der enzymatischen als auch mit der chemisch induzierten Oxygenierung identische Flächenanteile an Nootkaton (**194**) erhalten werden, sodass sich die Umsetzungen lediglich hinsichtlich der prozentualen Anteile der Nebenprodukte unterscheiden. Da diese jedoch durch die LOX-katalysierte HPOD-Cooxidation bevorzugt gebildet wurden, bietet die enzymatische Peroxidation eine natürliche Alternative zur chemischen Oxidation mit H_2O_2 .

⁴⁷ Die Reinheit und Zusammensetzung des verwendeten (+)-Valencens (**3**) wird unter Kap. 7.3.2 näher betrachtet. Postulierte Reaktionsmechanismen zur Bildung der Produkte **225-227** und **194** werden unter Kap. 7.5.3 angeführt.

Zur Überprüfung einer möglicherweise stattfindenden Autoxidation wurden vor Beginn der nachfolgenden Optimierungen analytische Enzymtests nur mit dem Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine weitere Umsetzung mit dem Substrat LA und (+)-Valencen (**3**), um eine Aussage zur Einflussnahme der Autoxidation der LA zu ermöglichen. Anhand der **Abbildung 109** zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Kap. 7.3.1, eine Autoxidation des Substrats LA vernachlässigbar klein ist. Stattdessen ist jedoch eine nicht unerhebliche temperaturabhängige Autoxidation des (+)-Valencen (**3**) zu Nootkaton (**194**) beobachtbar.⁴⁸ Daher wurden für die Optimierungen jeweils Negativkontrollen mit dem Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) angesetzt, um so eine Bestimmung der rein enzymatischen Umsetzung durch Subtraktion der Autoxidation zu ermöglichen.

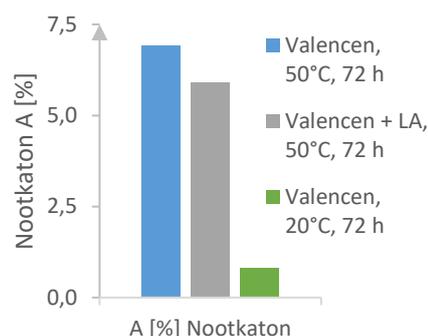


Abbildung 109: Überprüfung der Autoxidation des (+)-Valencen (**3**).

Hinsichtlich der Aufarbeitung der analytischen Enzymtests wurden verschiedenste Extraktionsvorgänge durchgeführt und anhand einer externen Kalibrationskurve die WFR ermittelt. Die WFR ermöglicht eine Aussage zur Wirksamkeit des Extraktionsprozesses. Als Testsubstanz wurde (+)-Valencen (**3**) eingesetzt. Zudem wurden unterschiedliche Reaktionszeiten und -volumina überprüft. Anhand der **Tabelle 38** wird ersichtlich, dass die WFR bei einer einmaligen Extraktion (I, 100 µL *n*-Hexan) aufgrund der hohen Standardabweichung selbst bei einer Verdopplung der Extraktionszeit nicht reproduzierbar ist. Dies kann auf eine unzureichende Phasentrennung zurückgeführt werden. Eine Volumenerhöhung des Extraktionsmittels führt hingegen zu einer deutlichen Steigerung der WFR ($82.1 \pm 9.2\%$).

Tabelle 38: Überprüfung des Extraktionsverhaltens bei Verwendung von (+)-Valencen (**3**) als Testsubstanz.

Extraktion	V [µL]	t [sek]	WFR [%]
I	100	30	33.4 ± 13.4
I	100	60	43.3 ± 20.7
I	200	30	82.1 ± 9.2
II	200	60	96.7 ± 4.0
	100	60	

I: Einmalige Extraktion, II: Zweimalige Extraktion

Eine zusätzliche Erhöhung der Extraktionsdauer trägt zu einer weiteren Verbesserung der Extraktionsgüte ($92.2 \pm 3.2\%$) bei. Durch eine zweimalige Extraktion (II) kann die WFR gemäß dem NERNST'schen Verteilungssatz auf $96.7 \pm 4.0\%$ erhöht werden, sodass diese für die Aufarbeitung der LOX-katalysierten Cooxidation angewendet wird.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, inwieweit ein Ein- oder Zweiphasensystem einen Einfluss auf die Produktausbeute nimmt. Ein Zweiphasensystem hat hierbei den Vorteil, dass das Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) eine verbesserte Löslichkeit erfährt. Gleichzeitig zeigten bereits Studien von WACHÉ, dass die gebildeten HPOD in organischen Lösemitteln inaktiv sind.^[274] Analytische Enzymtests zeigten, dass mit einem Einphasensystem ein Nootkaton-Anteil von $11.5 \pm 1.5\%$ erzielt werden konnte. Mit einem Zweiphasensystem waren hingegen nur $2.1 \pm 0.7\%$ Nootkaton (**194**)

⁴⁸ Mechanistische Überlegungen zur Bildung des Nootkatons (**194**) werden unter Kap. 7.5.37.5.3 näher betrachtet.

nachweisbar, sodass diese Ergebnisse mit denen von WACHÉ übereinstimmen. Neben einer deutlich verringerten Aktivität der HPOD in der organischen Phase scheint allerdings auch das Vorliegen der HPOD und des (+)-Valencen (**3**) in unterschiedlichen Phasen zu einen Umsatzverlust beizutragen. Während das (+)-Valencen (**3**) in der organischen Phase eine bessere Löslichkeit aufweist, verhält es sich bei den HPOD entgegengesetzt, wodurch der Massentransfer zwischen den Phasen stark erschwert und der Kontakt der Reaktionspartner auf die Phasengrenze beschränkt wird.

Des Weiteren wurde der optimale pH-Wert für die Cooxidation ermittelt. Dafür wurde als Ausgangspunkt für die Optimierungen die Studien von AZIZ und WACHÉ herangezogen, die bereits eine erfolgreiche Cooxidation bei pH 6.5 nachgewiesen haben.^[273,274] Die pH-Optimierung wurde daher im Bereich von pH 5.5 bis pH 7.5 mit GOOD-Puffersystemen durchgeführt.^[134] In der **Abbildung 110** sind die prozentualen Anteile des gebildeten Nootkaton (**194**) in Abhängigkeit von dem gewählten pH-Wert ersichtlich. Das über die LOX-Katalyse cooxidativ gebildete Nootkaton ergibt sich durch Subtraktion der detektierten autoxidativen Nootkatonbildung von dem Gesamtumsatz. Durch die Negativkontrollen konnte für jeden pH-Wert der Anteil an autoxidativ gebildeten Nootkaton bestimmt werden. Hierbei zeigte sich eine deutliche pH-Abhängigkeit der Autoxidation. So überwiegt unterhalb von pH 6.0 eindeutig die Autoxidation. Mit steigendem pH-Wert sinkt hingegen der Anteil an autoxidativ gebildetem Nootkaton. Dieses Verhalten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit Beobachtungen von GARDNER^[270] bezüglich mehrfach ungesättigter Fettsäuren, sodass auch dem (+)-Valencen (**3**) eine hohe Empfindlichkeit gegenüber autoxidativen Prozessen zugesprochen werden kann. Ursächlich für die gesteigerte Autoxidation könnten demzufolge auch hier chemische Prozesse sein, die die Bildung von Hydroperoxiden begünstigen.^[270]

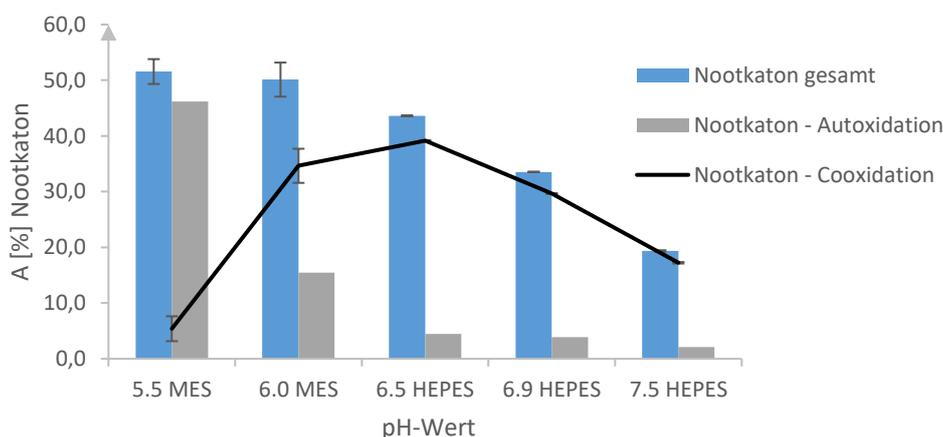


Abbildung 110: pH-Wert Optimierung der Cooxidation von (+)-Valencen (**3**) mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD. Als Balkendiagramm sind die prozentualen Flächenprozentanteile von Nootkaton (**194**) durch Autoxidation (grau) sowie die Summe des cooxidativ und autoxidativ gebildeten Nootkatons (blau) abgebildet. Durch Subtraktion des autoxidativen Anteils wird das durch LOX-Cooxidation gebildete Nootkaton erhalten (schwarze Linie).

Ebenso wie bei AZIZ^[273] und WACHÉ^[274] konnte auch bei den Umsetzungen mit Valencen ein pH-Optimum bei pH 6.5 für die LOX-katalysierte Cooxidation festgestellt werden. Dieses pH-Optimum steht zudem im Einklang mit dem Isoenzym LOX-3, welches starke cooxidierende Eigenschaften unter aeroben Bedingungen aufweist und dessen pH-Optimum ebenfalls bei pH 6.5 liegt.^[256,258,343]

Es wird hierbei angenommen, dass die Fähigkeit zur Cooxidation des Isoenzym LOX-3 auf der Freisetzung von Fettsäureradikalen beruht, die außerhalb des aktiven Zentrums mit molekularem Sauerstoff reaktive Peroxyradikale ausbilden.^[242] Diese Peroxyradikale könnten anschließend als Initiator für die Peroxidation des (+)-Valencen (**3**) fungieren und somit zur Ausbildung des pH-Maximums bei pH 6.5 beitragen. Eine chemische Peroxidation mit H₂O₂ zeigte hingegen ein Optimum von pH 9.0 (**Abbildung 111**), während bei der Cooxidation mit den Lipid-HPOD in diesem pH-Bereich keine Umsetzung beobachtet wurde. Folglich scheint die pH-Aktivität der Peroxyradikale entscheidend von der Art der Peroxide geprägt zu sein.

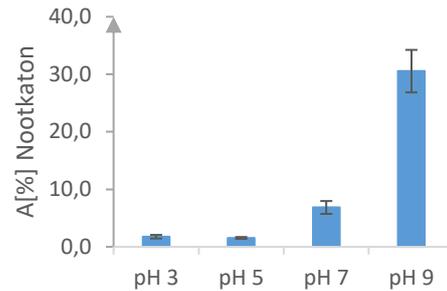


Abbildung 111: Chemische Peroxidation von (+)-Valencen (**3**) mit H₂O₂ zu Nootkaton (**194**) bei unterschiedlichen pH-Werten.

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedenster Puffersysteme auf die Aktivität der HPOD bei einem pH-Wert von pH 6.5 untersucht (**Abbildung 112**). Hierbei zeigte sich, dass die höchsten Ausbeuten an cooxidativ gebildeten Nootkaton mit einem 0.1 M HEPES Puffer erzielt wurden. Mit einem biologischen 50 mM MOPS-Puffer konnten vergleichbare Ausbeuten erhalten werden, allerdings zeigte das System eine Zunahme an Autoxidation mit steigender Pufferkapazität, sodass eine Einflussnahme auf die Empfindlichkeit des (+)-Valencens (**3**) gegenüber einer Autoxidation zu bestehen scheint. Ein anorganischer Phosphatpuffer katalysiert hingegen eindeutig die autoxidativen Prozesse zur Bildung des Nootkatons, weshalb der Puffer für die Cooxidation ungeeignet ist. Dies steht im Widerspruch zu Arbeiten von Aziz, in denen ein Phosphatpuffer als Reaktionsmedium gewählt wurde.^[273] Mit dem Citratpuffer konnte hingegen der geringste Anteil an autoxidativ induzierter Nootkatonbildung (1.5 %) nachgewiesen werden. Allerdings ist der Anteil der HPOD-katalysierte Cooxidation zur Bildung von Nootkaton geringer als mit den biologischen Puffern HEPES und MOPS. Für die weiteren Umsetzungen bietet sich daher ein 0.1 M HEPES Puffer an, dessen autoxidative Kapazität gegenüber dem (+)-Valencen (A[%] < 5 %) ebenfalls als gering einzustufen ist.

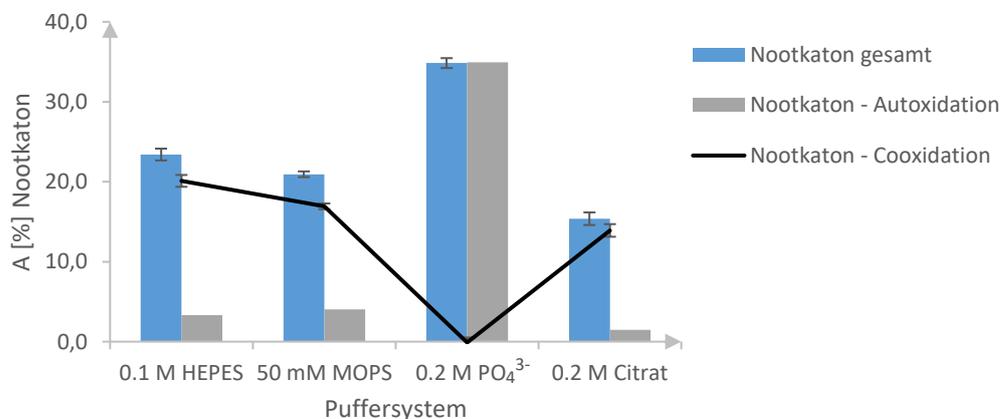


Abbildung 112: Einfluss des Puffersystems auf das autoxidativ (grau) und cooxidativ (schwarz) gebildete Nootkaton. In blau ist die Summe an Nootkaton abgebildet. Als Puffer wurde ein 0.1 M HEPES, ein 50 mM MOPS, ein 0.2 M Citratpuffer sowie ein anorganischer 0.2 M Phosphatpuffer (PO₄³⁻) getestet.

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur wurden einstufige analytische Enzymtests in einem Bereich von 4°C – 60°C durchgeführt. Hierbei konnte ein Anstieg des prozentualen Flächenanteils an Nootkaton mit steigender Temperatur verzeichnet werden (**Abbildung 113**). Da für die LOX-Aktivität bereits zwei definierte Temperaturmaxima bei 20°C und 40°C festgestellt werden konnte (s. Kap. 7.3.1), scheint die Cooxidation nicht ausschließlich von der Konzentration der HPOD in der Reaktionslösung abhängig zu sein. Stattdessen scheint die Reaktivität der HPOD und die damit verbundene Eigenschaft zur Cooxidation mit steigender Temperatur zuzunehmen. Dies könnte darin begründet sein, dass die homolytische Spaltung der HPOD zur Ausbildung eines Alkoxy- oder Peroxyradikals durch die Temperaturerhöhung erleichtert wird. Zudem wird die Entropie des Reaktionssystems durch die Wärmezufuhr erhöht, wodurch auch radikalische Kettenreaktionen begünstigt würden. Gleichzeitig konnte jedoch auch eine Zunahme der (+)-Valencen-Autoxidation mit steigender Temperatur verzeichnet werden. Das Potential der Verbindung zur Autoxidation scheint somit sowohl durch niedrige pH-Werte als auch durch eine erhöhte Temperatur begünstigt zu werden. Um eine akzeptable Nootkatonbildung durch cooxidierende Prozesse bei einer gleichzeitig geringen autoxidativen Kapazität zu gewährleisten, wurde für die weiteren Umsetzungen eine Temperatur von 50 °C gewählt. Insbesondere bei der Cooxidation von thermolabilen Komponenten wie etherischen Ölen sollte die gewählte Temperatur nicht überschritten werden, um mögliche Umlagerungen oder Zersetzungen auszuschließen.

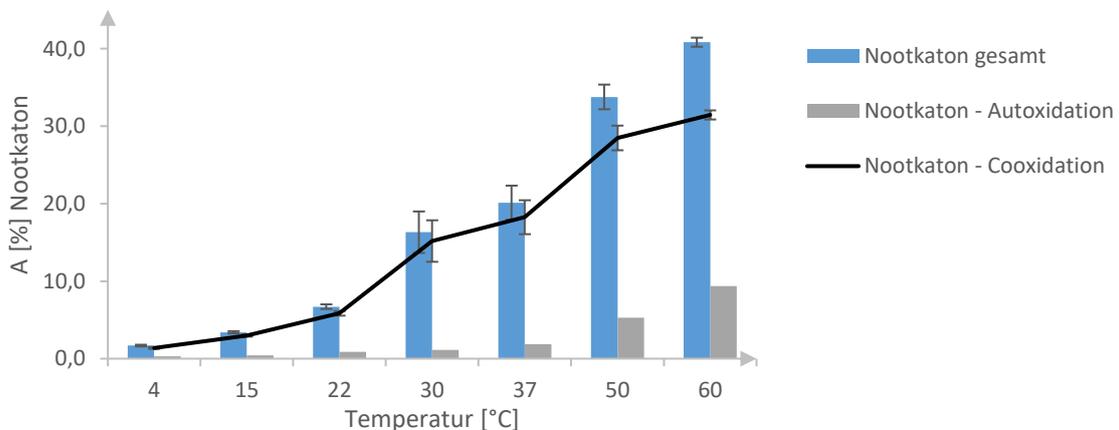


Abbildung 113: Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die cooxidative (schwarz) und autoxidative (grau) Bildung von Nootkaton aus (+)-Valencen. Die Summe an gebildeten Nootkaton aus Autoxidation und Cooxidation ist in blau abgebildet.

Hinsichtlich der Inkubationsdauer der analytischen Enzymtests zeigte sich erneut eine Zunahme der autoxidativen Eigenschaft des (+)-Valencens (**3**). Oberhalb einer Inkubationsdauer von 72 h überwiegt hierbei die Autoxidation des (+)-Valencens (**3**) gegenüber der HPOD-induzierten Cooxidation (**Abbildung 114**). Da keine signifikante Zunahme der cooxidierten Nootkatonbildung bei einer Inkubation über 48 h bzw. 72 h beobachtet

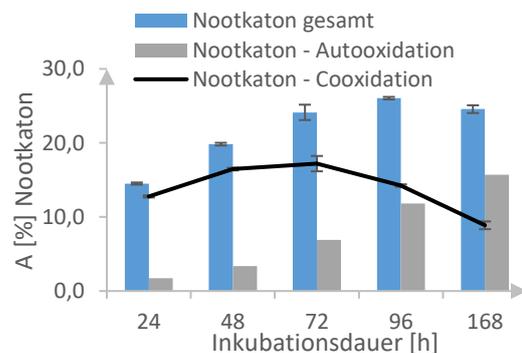


Abbildung 114: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Nootkatonbildung.

wurde, sollten die Enzymtests zur Verringerung der autoxidativen Kapazität über eine Dauer von 48 h inkubiert werden.

Nach erfolgreicher Optimierung der Reaktionsparameter pH-Wert, Temperatur und Inkubationsdauer erfolgte in einem weiteren Schritt die Ermittlung des optimalen Verhältnisses von LA zu Cosubstrat. Hierbei konnte AZIZ bereits zeigen, dass ein Überschuss an LA zu einer verbesserten Cooxidationsrate beiträgt.^[273] Anhand der **Abbildung 115 A** zeigte sich, dass ebenfalls die höchsten prozentualen Anteile an cooxidativ gebildeten Nootkaton mit einem Überschuss an LA erzielt wurden. Das optimale Verhältnis belief sich hierbei auf 1:2 an Cosubstrat zu Substrat (LA). Weiterhin wurde die optimale LOX-Aktivität für die Bildung des Cooxidationsprodukts in einem einstufigen analytischen Enzymtest bestimmt. Hierbei konnte ein eindeutiges Maximum bei 100 U LOX ermittelt werden (**Abbildung 115, B**). Wie vorhergehende Experimente bereits zeigten, ist die LOX nur an der Bildung der HPOD beteiligt, nicht jedoch an der eigentlichen Cooxidation des Cosubstrats. Folglich hat die LOX-Aktivität nur Einfluss auf die Konzentration der in Lösung befindlichen HPOD, deren Gegenwart für die Cooxidation unerlässlich sind.^[244,273,280]

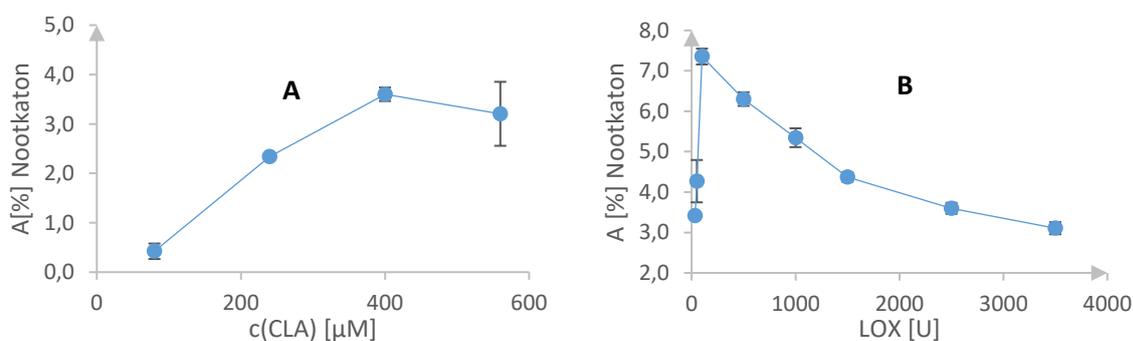


Abbildung 115: A: Bestimmung des optimalen Verhältnisses an LA und Cosubstrat (+)-Valencen. Die analytischen Enzymtests erfolgten mit 200 µM (+)-Valencen. B: Ermittlung der Enzymaktivität (U) der LOX für die einstufigen analytischen Enzymtests. Bei den abgebildeten prozentualen Flächenanteilen handelt es sich um das durch Cooxidation gebildete Nootkaton.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) in der wässrigen Phase wurden unterschiedliche Lösungsvermittler und polare Lösungsmittel eingesetzt und deren Einfluss auf den Anteil an cooxidativ und autoxidativ erzeugten Nootkaton (**194**) überprüft. Anhand der **Abbildung 116** wird ersichtlich, dass die höchsten prozentualen Umsatzraten mit Aceton erzielt wurden. Ferner konnte allerdings auch eine erhöhte autoxidative Kapazität mit diesem Lösungsmittel festgestellt werden. Mit Triton™X-100 wurde hingegen nur eine sehr geringe Autoxidation beobachtet, wobei jedoch auch der Anteil an cooxidativ gebildeten Nootkaton erniedrigt war. Enzymtests mit einem Lösungsvermittler auf Basis von Tween® zeigten wie mit Aceton eine ausgeprägtere Autoxidation des (+)-Valencen (**3**), gleichzeitig jedoch geringere Anteile

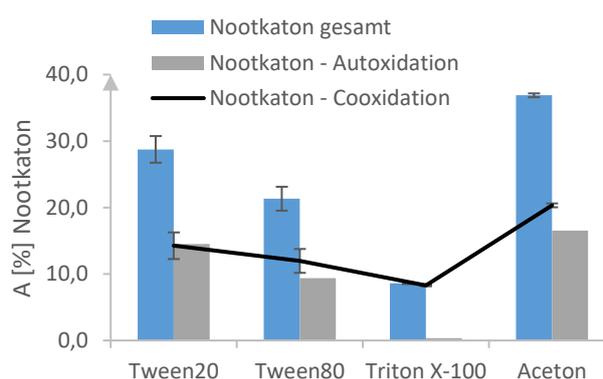


Abbildung 116: Einfluss von Lösungsvermittlern Tween® und Triton™ sowie Aceton auf die autoxidative (grau) und cooxidative (schwarz) Nootkatonbildung.

Mit Triton™X-100 wurde hingegen nur eine sehr geringe Autoxidation beobachtet, wobei jedoch auch der Anteil an cooxidativ gebildeten Nootkaton erniedrigt war. Enzymtests mit einem Lösungsvermittler auf Basis von Tween® zeigten wie mit Aceton eine ausgeprägtere Autoxidation des (+)-Valencen (**3**), gleichzeitig jedoch geringere Anteile

an cooxidativ gebildetem Nootkaton. Da sowohl mit Tween® als auch Triton™X-100 eine Phasentrennung während der Aufarbeitung erschwert wurde, erwies sich Aceton als optimaler Lösungsvermittler für die analytischen Enzymtests.

Zusammenfassend konnte für die Cooxidation des Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) mit den durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD die in der **Tabelle 39** angegebenen Bedingungen ermittelt werden. Durch die Optimierung war es möglich den anfänglichen prozentualen Flächenanteil des cooxidativ gebildeten Nootkaton von $2.1 \pm 0.7 \%$ ⁴⁹ auf $39.2 \pm 0.1 \%$ zu steigern. Des Weiteren zeigte sich durch die Anwendung eines zweistufigen Prozesses, dass die LOX nicht an der Cooxidation des Cosubstrats beteiligt zu sein scheint, sondern nur an der Bildung der HPOD. Durch eine chemische Oxidation mit Wasserstoffperoxid konnte zudem nachgewiesen werden, dass ein identisches Produktspektrum erzeugt wurde, sodass die Cooxidation auf einem Peroxyradikalmechanismus beruhen sollte. Zudem konnte eine hohe Empfindlichkeit des Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) gegenüber einer Autoxidation identifiziert werden. Da auch hierbei ein identisches Produktspektrum erzeugt wurde, die prozentualen Flächenanteile jedoch deutlich geringer ausfielen, beschleunigt die LOX-katalytische HPOD-Bildung und anschließende Cooxidation den autoxidativen Prozess.

Tabelle 39: Durch Optimierungen ermittelte Bedingungen für die Cooxidation eines Cosubstrats (CoS) in Gegenwart von durch LOX-Katalyse produzierten HPOD. Enzymaktivität: A(LOX), Verhältnis Substrat: Cosubstrat (c(LA):c(CoS)), pH-Wert (pH), Puffersystem, Temperatur (T), Inkubationsdauer (t) und Lösungsvermittler (LM).

A(LOX) [U]	c(LA):c(CoS)	pH	Puffer	T [°C]	t [h]	LM
100	2:1	6.5	0.1 M HEPES	50	48	Aceton

7.3.3 HPOD-induzierte Cooxidation ausgewählter Terpenoide

Für die Umsetzung der durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD wurden insgesamt 11 Mono- und Sesquiterpene ausgewählt. Neben dem Testsubstrat (+)-Valencen (**3**)⁵⁰ wurde (*E,E*)-Farnesol (**96**) als weiteres Sesquiterpen mit den HPOD umgesetzt. Als Monoterpene wurden Geraniol (**141**), Myrcen (**137**), Dihydromyrcenol (**208**), *L*-Menthol (**1**) sowie die beiden Enantiomere des Limonen (**192**) als Cosubstrate ausgewählt. Zusätzlich wurden die von der Isopren-Regel abweichenden Seitenstromprodukte Anomadien (**207**), Cyclademol (**209**) und Isolinalool (**212**) verwendet. Die eingesetzten Substrate wurde vor Beginn der Cooxidation zunächst chromatographisch analysiert und dabei der prozentuale Anteil der Verbindungen sowie vorhandene Nebenkomponenten bestimmt (**Tabelle 40**).⁵¹

⁴⁹ Zweiphasensystem ohne Optimierung.

⁵⁰ Eine Identifizierung des Produktspektrums erfolgte bereits unter Kap.7.3.2. Die Aufstellung von postulierten Reaktionsmechanismen zur Bildung der Produkte erfolgt unter Kap.7.5.3.

⁵¹ Die Verbindungen Geraniol (**141**), (*E,E*)-Farnesol (**96**), *L*-Menthol (**1**), Cyclademol (**209**), Dihydromyrcenol (**208**) und Isolinalool (**212**) wurden bereits unter Kap. 7.1.1 näher betrachtet.

Tabelle 40: Analytische Charakterisierung der eingesetzten Substrate für die Cooxidation mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD. Die Bestimmung der RI und prozentualen Flächenanteile erfolgte mit Ausnahme von Myrcen und Anomadien auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität. Zudem ist eine Übersicht der mittels RI und MS-Spektren identifizierten Nebenprodukte **229-236** abgebildet. Die weiteren Testsubstrate wurden bereits unter Kap. 7.1.1 näher betrachtet.

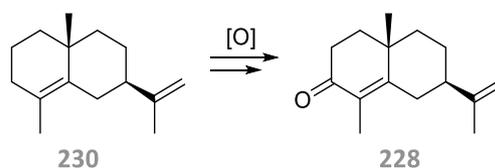
(3)	(137)	(+)-(192)	(-)-(192)	(207)	
RI_{DB5}	1523	992	1037	1037	921
A[%]	84.6	77.3	98.7	98.8	89.5
RI_{FFAP}	1776	- ^A	1208	1208	- ^A
A[%]	74.3	- ^A	97.3	94.7	- ^A

(229)	(230)	(231)	(232)	
RI	1511 _{DB5}	1783 _{FFAP}	1549 _{DB5}	1755 _{FFAP}
A[%]	4.9	6.5	2.9	1.4

(233)	(234)	(235)	(236)	
RI	1010 _{DB5}	1216 _{FFAP}	1278 _{FFAP}	932 _{DB5}
A[%]	5.6	2.1	2.6	6.9

^A Keine Messung auf FFAP-Trennsäule, da die Verbindungen im „solvent delay“ des MS-Detektors eluieren.

Die Reinheit des eingesetzten (+)-Valencen (**3**) belief sich mit einer polaren FFAP-Trennsäule auf 74.3 %. Durch einen Abgleich⁵² der RI zweier Trennsäulen unterschiedlicher Polarität sowie der MS-Spektren konnten vier Nebenprodukte eindeutig als Hinesen (**229**), α -Cypren (**230**), 3,11-Selinadien (**231**) und Aristolochen (**232**) mit prozentualen Flächenanteile zwischen 1.4 – 6.5 % bestimmt werden. Das nachgewiesene allylische Oxidationsprodukt α -Cyperon (**228**) kann daher auf das enthaltene Nebenprodukt α -Cypren (**230**) zurückgeführt werden (**Schema 34**). Weiterhin wurde anhand der chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchung eine Vielzahl weiterer Mono- und Sesquiterpene detektiert, die jedoch aufgrund zu geringer prozentualer Anteile nicht eindeutig identifiziert



Schema 34: Allylische Oxidation von α -Cypren (**230**) führt zum nachgewiesenen Produkt α -Cyperon (**228**).

⁵² Die Identifikation der Verbindungen erfolgte anhand eines Vergleichs mit den internen Datenbanken der Symrise AG, Holzminden.

werden konnten. Die Reinheit des eingesetzten Myrcen (**137**) wurde auf 77.3 % bestimmt. Als weitere Nebenkomponente konnte zudem die Verbindung *pseudo*-Limonen (**233**) ermittelt werden. Für die Enantiomere des Limonen (**192**) konnten sehr hohe Reinheiten anhand der chromatographischen Analyse ermittelt werden. Während (+)-**192** als Nebenkomponente das Monoterpen Myrcen (**137**) mit einem Anteil von 1.5 % enthält, konnten für das Enantiomer (-)-**192** die Verbindungen 1,8-Cineol (**234**) und *p*-Cymol (**235**) nachgewiesen werden. Das von der Isopren-Regel abweichende Anomadien (**207**) wurde mit einem prozentualen Anteil von 89.5 % nachgewiesen, wobei das Tricyclen (**236**) als weitere Verbindung mit einem Anteil von 6.9 % enthalten ist.

Die Identifizierung einer erfolgreichen Cooxidation erfolgte durch einen Vergleich der Ausgangs- mit den durch die HPOD-Behandlung erzielten Chromatogrammen. Eine durchgeführte Negativkontrolle ermöglichte zudem Aussagen zur Empfindlichkeit der Cosubstrate gegenüber einer Autoxidation. Bereits durchgeführte Studien zur Cooxidation der durch LOX-Katalyse produzierten HPOD mit ausgewählten Cosubstraten offenbarten eine allyliche Oxidation sowie eine Epoxidierung der im Cosubstrat enthaltenen Doppel-

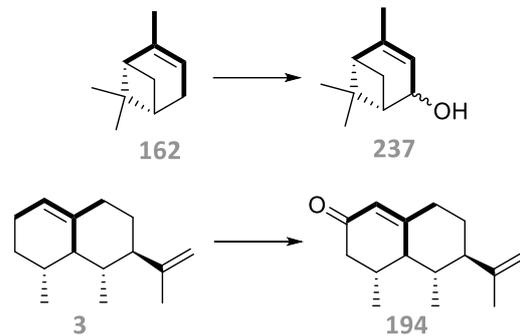


Abbildung 117: Postulierte Struktureinheit (markiert) für die Cooxidation am Beispiel der allylichen Oxidation von α -Pinen (**162**) zu Verbenol (**237**) und (+)-Valencen (**3**) zu Nootkaton (**194**).^[275]

Anhand von Cooxidationen mit der Basidiomycete *P. sapidus* postulierte KRINGS eine Struktureinheit, an dessen allylischer Position die Cooxidation stattfindet (Abbildung 117).^[277] Da für die Cooxidation mit der LOX aus *Glycine max* ein freier Peroxyradikalmechanismus angenommen wurde, beruht die Regioselektivität einer solchen allylischen Oxidation maßgeblich auf den Bindungsdissoziationsenergien (BDE) der allylischen C-H-Bindungen sowie auf der sterischen Zugänglichkeit.^[344] Die Abstraktion des Wasserstoffatoms durch freie Radikale sowie die anschließende Ausbildung des allylischen Radikals ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in vielen allylischen Oxidationen.^[345] Auch die Stabilisierungsmöglichkeiten des gebildeten Radikals sind von entscheidender Bedeutung für die Regioselektivität.^[344] Die Wasserstoffabstraktion an allylischer Position erfolgt hierbei bevorzugt, da das entstehende allylische Radikal eine Resonanzstabilisierung erfährt.^[345,346] Diese kann auf Radikal- π -Wechselwirkungen zwischen dem Radikalorbital und den π -Orbitalen der Doppelbindung zurückgeführt werden, welche in einer Ebene liegen und somit durch ihre Ausrichtung die Mesomeriestabilisierung ermöglichen.^[345] Ferner werden die gebildeten Radikale durch Hyperkonjugation stabilisiert, weshalb tertiäre Radikale gegenüber sekundären und primären bevorzugt ausgebildet werden.^[344] Quantenmechanische Berechnungen offenbarten, dass sich durch die Stabilisierungsmöglichkeiten die BDE der allylischen C-H-Bindungen deutlich reduzieren und diese Positionen an Reaktivität gewinnen.^[344]

Es ist daher nicht verwunderlich, dass für die Cosubstrate *L*-Menthol (**1**) und Cyclademol (**209**) keine Produktumsetzung beobachtet werden konnte. Aufgrund nicht existenter Doppelbindungen in **1** und **209** sind weder die für die Cooxidation typische Epoxidbildung noch allylische Oxidationen möglich. Auch für die Produkte Isolinalool (**212**),

Dihydromyrcenol (**208**) und Anomadien (**207**) konnte keine Cooxidation mit den HPOD beobachtet werden. All diesen Verbindungen ist gemein, dass sie die von KRINGS postulierte Struktureinheit aufweisen. Eine Betrachtung der allylischen Positionen bei dem Cosubstrat Anomadien (**207**) zeigte, dass die Bildung eines allylischen Radikals an der Position C-5 theoretisch begünstigt sein sollte, da das tertiäre

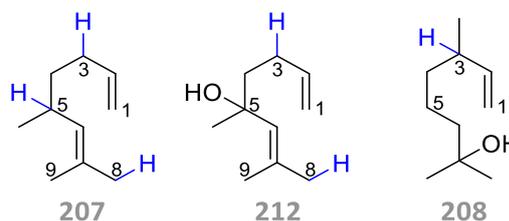


Abbildung 118: Strukturformeln der Cosubstrate Anomadien (**207**), Dihydromyrcenol (**208**) und Isolinalool (**212**). Potentielle Wasserstoffabstraktionen in allylischer Position zur Ausbildung von Radikalen sind blau markiert.

Radikal neben einer Hyperkonjugation auch eine Resonanzstabilisierung erfahren würde (**Abbildung 118**). Allerdings liegt zugleich auch eine sterische Hinderung durch die Methylgruppen vor, wodurch die Ausbildung eines Radikals erschwert werden könnte. Bei Isolinalool (**212**) kann an identischer Position (C-5) hingegen kein Wasserstoffatom abstrahiert werden, da sich in allylischer Position bereits ein tertiärer Alkohol befindet. Die Ausbildung eines primären Radikals an den chemisch äquivalenten endständigen Methylgruppen (C-8, C-9) der beiden Verbindungen **207** und **212** wäre zwar denkbar, ist allerdings trotz Resonanzstabilisierung aufgrund der wenig ausgeprägten Hyperkonjugation unwahrscheinlich. Anomadien (**207**) und Isolinalool (**212**) besitzen zudem eine weitere endständige Doppelbindung. Eine allylische Wasserstoffabstraktion würde zu einem sekundären Radikal (C-3) führen, dessen Resonanzstabilisierung jedoch in einem energetisch ungünstigen primären Radikal an der Position C-1 resultieren würde. Dihydromyrcenol (**208**) weist ebenfalls eine endständige Doppelbindung auf, die in Allylposition (C-3) über eine zusätzliche Methylgruppe verfügt. Eine Radikalbildung in allylischer Position würde dabei zu einem stabilen tertiären Radikal führen. Allerdings ist durch die vorhandene Methylgruppe erneut eine sterische Hinderung anzunehmen. Zusammenfassend lässt sich für die Verbindungen damit festhalten, dass diese zwar über die notwendige Doppelbindung und die Möglichkeit zur Ausbildung eines allylischen Radikals verfügen, diese jedoch durch mangelnde Stabilisierungsmöglichkeiten und sterische Faktoren energetisch ungünstig sind. In der Folge sollten die allylischen C-H-Bindungen erhöhte BDE aufweisen, weshalb sie nicht reaktiv genug für eine homolytische Bindungsspaltung sind. Eine Akzeptanz als Cosubstrat bleibt somit verwehrt.

Mit dem Cosubstrat Myrcen (**137**) konnte ebenfalls durch eine analytische Charakterisierung keine allylische Oxidation beobachtet werden, allerdings eine Epoxidierung zum Myrcenoxid (**238**) in einem prozentualen Anteil von 7.5 % (**Abbildung 119**). Studien von WEIDMANN konnten bereits belegen, dass bei einer sterischen Hinderung eine Epoxidierung gegenüber einer allylischen Oxidation bevorzugt wird.^[344] Da im Falle des Myrcen (**137**) allerdings keine offensichtliche sterische Hinderung ersichtlich ist, könnte die mangelnde

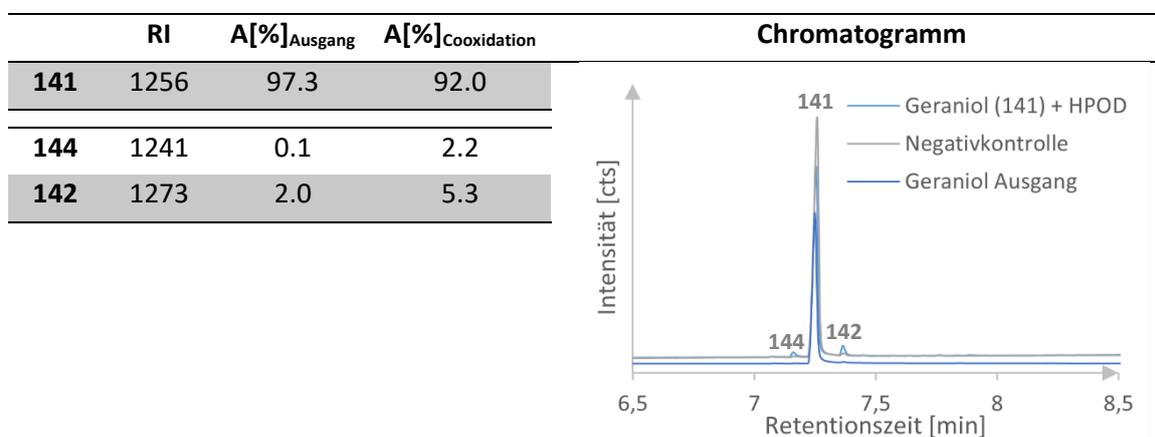


Abbildung 119: Myrcenoxid (**238**).

Akzeptanz auch auf eine zu hohe BDE zurückgeführt werden, da azyklische Verbindungen im Allgemeinen eine geringere Reaktivität hinsichtlich einer allylischen Wasserstoff-Abstraktion aufweisen.^[344] Eine allylische Radikalbildung würde, in Analogie zu den bereits betrachteten Cosubstraten Anomadien (**207**), Isolinalool (**212**) und Dihydromyrcenol (**208**), damit verwehrt bleiben.

Bei der Cooxidation von Geraniol (**141**) konnten die Oxidationsprodukte Geranial (**142**) und Neral (**144**) eindeutig anhand von RIs zweier Trennsäulen unterschiedlicher Polarität und den MS-Spektren identifiziert werden (**Tabelle 41**). Eine Autoxidation des Geraniols (**141**) über den Inkubationszeitraum konnte nicht festgestellt werden.

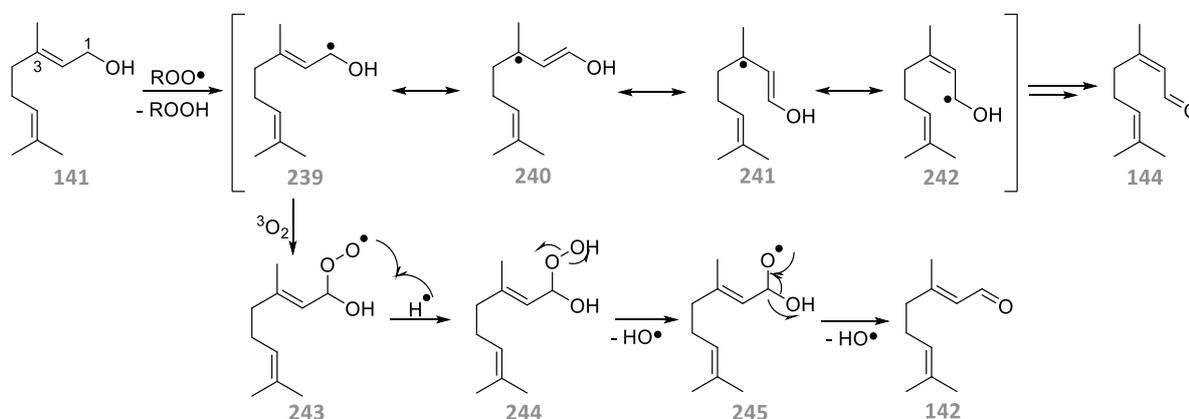
Tabelle 41: Cooxidation von Geraniol (**141**) mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD. Die Identifikation von Cooxidationsprodukten erfolgte durch Überlagerung mit einer Negativkontrolle sowie den Ausgangschromatogramm. Die Negativkontrolle diente zur Bestimmung einer möglichen Autoxidation des Geraniols (**141**).



Da die HPOD-katalysierte allylische Oxidation die Autoxidation des Cosubstrats zu beschleunigen scheint⁵³, sollte auch die Oxidation des Cosubstrats auf einem radikalischen Mechanismus beruhen (**Schema 35**).^[280,347] Als Initiator für die allylische Radikalbildung des Geraniols (**141**) könnten die durch das Isoenzym LOX-3 außerhalb der aktiven Tasche gebildeten freien Fettsäure-Peroxyradikale (ROO•) agieren.^[242,258] Das gebildete sekundäre Radikal **239** erfährt eine allylische Resonanzstabilisierung, wodurch sich ein tertiäres Radikal **240** ausbilden könnte. Dadurch könnte eine Drehung um die C-2/C-3 Bindung ermöglicht werden, sodass sich ein tertiäres Nerolyradikal (**241**) ausbildet, welches ebenfalls durch Resonanz stabilisiert ist und sich zum primären Radikal **242** umlagern kann. Die primären Radikale **239** und **242** werden zudem durch die direkte Nachbarschaft der Hydroxygruppe stabilisiert.^[344,348] Die Aktivierung der Positionen erfolgt dabei einerseits durch induktive Effekte und andererseits durch Orbitalwechselwirkungen der Elektronenpaare des Sauerstoffatoms mit den halbgefüllten Orbital des Radikals.^[348] Da die Cooxidation unter aeroben Bedingungen und unter Lichtausschluss erfolgte, sollte die Oxidation auf Triplett-Sauerstoff basieren, sodass sich das Radikal **243** ausbildet.^[347,349] Durch Übertragung eines Wasserstoffradikals würde das Hydroperoxidderivat **244** entstehen. Anstelle von Triplett-Sauerstoff wäre auch die Anlagerung eines freien Fettsäure-Peroxyradikals denkbar.^[242] Eine homolytische Spaltung des

⁵³ Es konnte unter Kap. 7.3.2 bereits gezeigt werden, dass durch die enzymatische Cooxidation ein identisches Produktspektrum erzeugt wurde wie durch eine chemische Oxidation mit H₂O₂ oder eine Autoxidation.

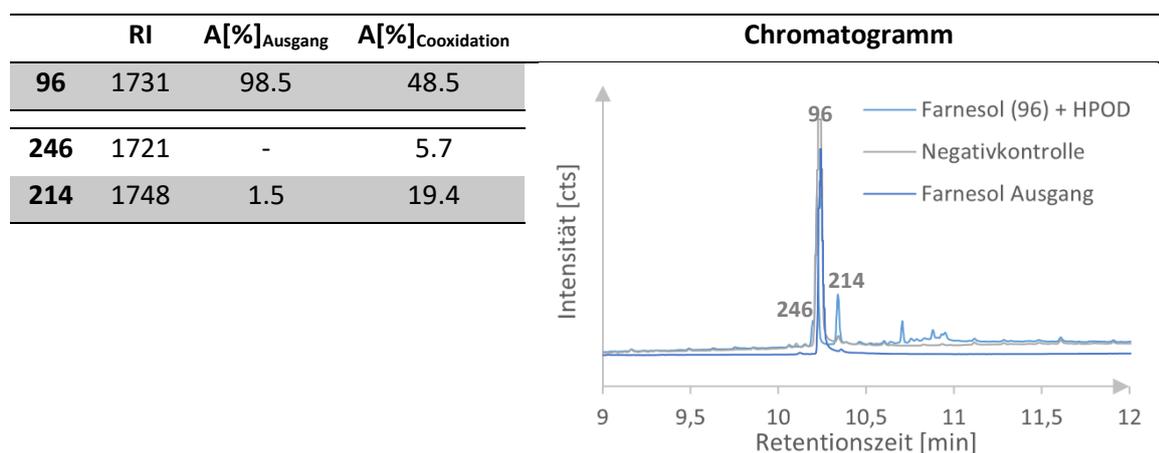
Hydroperoxidintermediats **244** würde zur Ausbildung des Radikals **245** führen, aus dem nach Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals das Geranial (**142**) bzw. ausgehend vom Radikal **242** das Neral (**144**) entstehen würde.



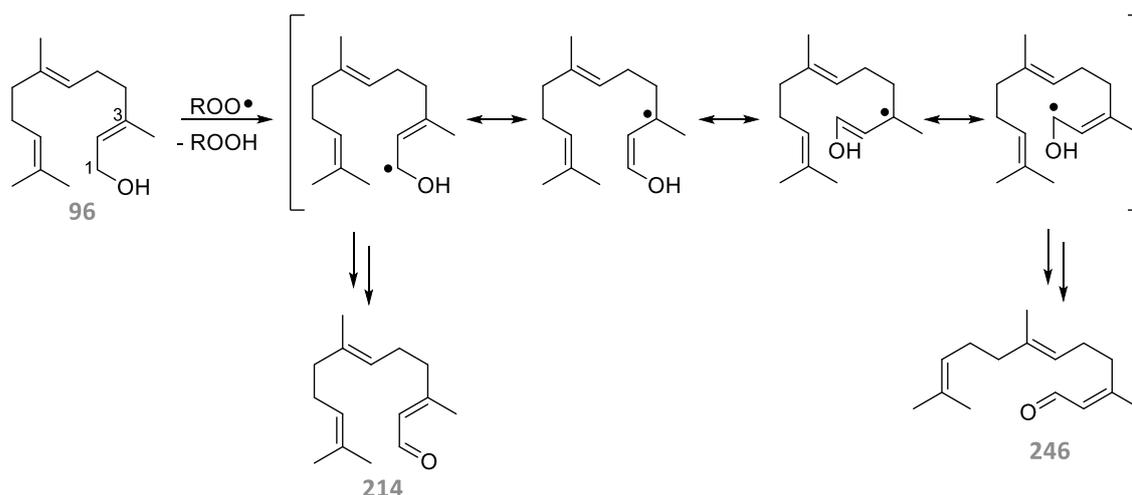
Schema 35: Postulierter Mechanismus für die radikalische allylische Oxidation von Geraniol (**141**) zu den Cooxidationsprodukten Geranial (**142**) und Neral (**144**).

Bei der Umsetzung von (*E,E*)-Farnesol (**96**) konnten durch Cooxidation als Produkte (*E,Z*)-Farnesal (**246**) und (*E,E*)-Farnesal (**214**) ermittelt werden (**Tabelle 42**). Es wurden zudem weitere Produkte identifiziert, die sich jedoch anhand der ermittelten RI und den MS-Spektren nicht eindeutig zuordnen ließen. Aufgrund von Retentionsindices oberhalb von RI 1800 sollte es sich bei diesen Verbindungen ebenfalls um Oxidationsprodukte des eingesetzten Farnesol handeln. Auch das (*E,E*)-Farnesol (**96**) zeigte bei Betrachtung der Negativkontrolle keine signifikante Empfindlichkeit gegenüber einer Autoxidation.

Tabelle 42: HPOD-induzierte Cooxidation von (*E,E*)-Farnesol (**96**) zu den Farnesal-Konfigurationsisomeren **214** und **246**.



Die identifizierten Konfigurationsisomere **214** und **246** sollten in Analogie zum postulierten Mechanismus des Geraniols (**141**) erhalten werden. Folglich sollte auch beim (*E,E*)-Farnesol (**96**) die Ausbildung eines Radikals an der Position C-1 in Folge des induktiven Effekts der Hydroxygruppe und der Mesomeriestabilisierung begünstigt sein (**Schema 36**). Durch die Ausbildung verschiedenster Resonanzstrukturen könnte erneut eine Drehung um die C-2/C-3-Einfachbindung ermöglicht werden, wodurch die Konfigurationsisomere des Farnesal gebildet würden.



Schema 36: Verkürzter postulierter Mechanismus für die radikalische allylische Oxidation von (*E,E*)-Farnesol (**96**) zu den Cooxidationsprodukten (*E,Z*)-Farnesal (**246**) und (*E,E*)-Farnesal (**214**).

Für die HPOD-induzierte Cooxidation der Enantiomere des Limonen (**192**) konnte in beiden Fällen ein identisches Produktspektrum mit vergleichbaren prozentualen Flächenprozenten erzielt werden, sodass keines der beiden Enantiomere bevorzugt akzeptiert wurde (**Tabelle 43**). Dies steht im Einklang mit den vorhergehenden Ergebnissen, wonach das Enzym LOX nicht direkt an der Cooxidation beteiligt ist, sondern lediglich an der Bildung der HPOD. Die Cooxidation folgt somit den Gesetzen einer Radikalreaktion. Insgesamt konnten acht Cooxidationsprodukte (**247-251**) für die Umsetzung des Limonen detektiert werden, die anhand von RI und MS-Spektren als *p*-Menthatrien (**247**), 1,2-Limonenepoxid (**248a,b**), 8,9-Limonenepoxid (**249a,b**), Carveol (**250a,b**) und Carvon (**251**) identifiziert wurden (**Abbildung 120**). Interessanterweise konnten jeweils die Diastereomere der gebildeten Epoxide (**248, 249**) und des Carveol (**250**) detektiert werden, sodass die Hypothese eines freien Peroxyradikalmechanismus für die Cooxidation unterstützt wird und die Oxidationen nicht enantioselektiv geführt werden können.

Tabelle 43: Ermittlung der durch Cooxidation gebildeten Produkte bei der Umsetzung von (+)/(-)-**192** mit den HPOD.

	RI _{DB5HT}	A[%] ₍₋₎₋₁₉₂	A[%] ₍₊₎₋₁₉₂	Chromatogramm
192	1033	59.6	63.6	<p>Legend: — (-)-Limonen (192) + HPOD — Negativkontrolle — (-)-Limonen Ausgang</p>
247	1123	4.7	4.6	
248a	1138	4.2	4.1	
248b	1142	1.9	2.0	
249a	1201	1.1	1.1	
249b	1205	1.6	1.6	
250a	1222	6.4	6.3	
250b	1235	2.3	2.1	
251	1249	11.5	11.1	

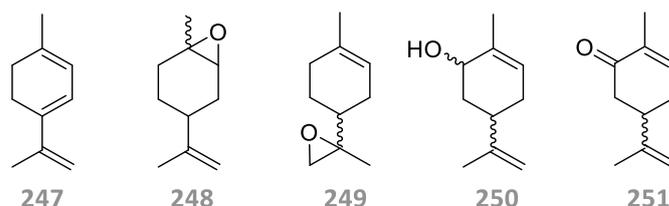
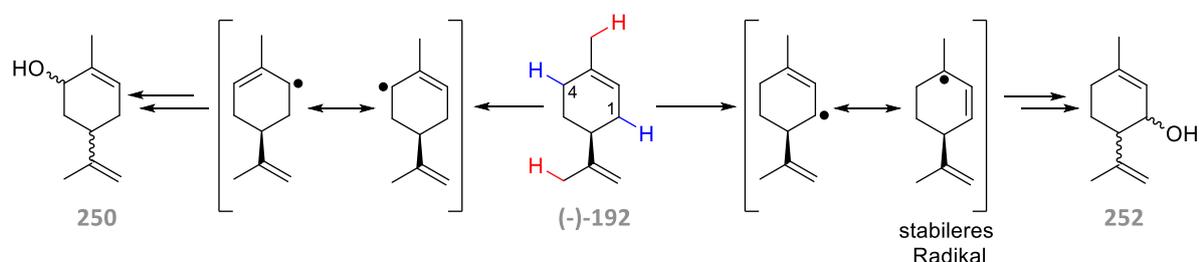


Abbildung 120: Über RI und MS-Spektren identifizierte Produkte **247-251** der Cooxidation von Limonen (**192**) mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD.

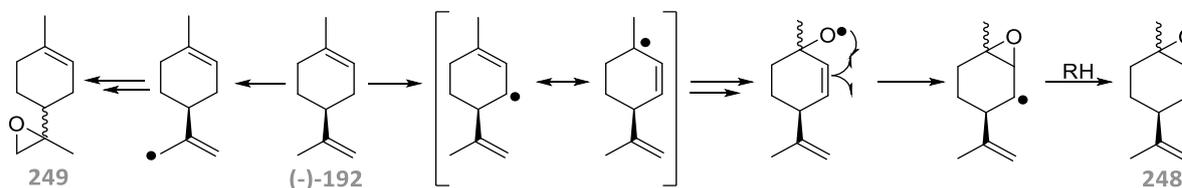
Im Vergleich zu den Umsetzungen mit Farnesol (**96**) und Geraniol (**141**) konnte für das zyklische Limonen (**192**) hinsichtlich der ermittelten Peakflächen eine größere Substratazeptanz beobachtet werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass zyklische Substrate eine höhere Reaktivität gegenüber einer allylischen Wasserstoff-Abstraktion aufweisen als vergleichbare azyklische Verbindungen. Als Ursache für die „zyklische Aktivierung“ werden die Ringspannung, Bindungsstärke sowie die Resonanzenergie und die daraus resultierenden Aktivierungsenergien und Reaktionsenthalpien angenommen.^[345] Hinsichtlich der Regioselektivität ist die Bildung des Carveol (**250**) zunächst verwunderlich, da sich kein stabileres tertiäres Radikal durch die Resonanzstabilisierung ausbilden kann (**Schema 37**). Das dennoch nicht das scheinbar bevorzugte Radikal an der Position C-1 gebildet wird, könnte auf eine sterische Hinderung durch die benachbarte *iso*-Propenylgruppe zurückgeführt werden. Zwar wurde der entsprechende Alkohol Isopiperitenol (**252**) nicht detektiert, dennoch könnte die Bildung des *p*-Menthatrien (**247**) über diesen Reaktionspfad erfolgen. Die Abstraktion eines *exo*-zyklischen Wasserstoffatoms ist hingegen in Radikalmechanismen weniger bevorzugt, sodass eine entsprechende Produktbildung ebenfalls nicht beobachtet wurde.^[344]



Schema 37: Mögliche Positionen der Wasserstoff-Abstraktion. In blau sind die bevorzugten *endo*-zyklischen Wasserstoffatome abgebildet, während in rot die weniger bevorzugten *exo*-zyklischen Wasserstoffatome gekennzeichnet sind. Die Abstraktion an Position C-4 führt zur Bildung des Carveol (**250**). Die eigentlich bevorzugte Abstraktion an C-1 ist durch sterische Faktoren gehemmt, sodass das Produkt Isopiperitenol (**252**) nicht beobachtet wurde.

Insbesondere bei Vorliegen einer sterischen Hinderung tritt eine Epoxidierung in Konkurrenz zur allylischen Oxidation auf.^[344] Die Bildung der Limonenepoxide (**248**, **249**) könnte hierbei in Analogie zur Autoxidation des Caryophyllenoxids (**100**) stattfinden, wobei anstelle von Singluett-Sauerstoff die Radikalbildung und Hydroperoxidausbildung über freie Fettsäure-Peroxyradikale erfolgen könnte.^[141] Je nachdem ob die Reaktion an der *endo*- oder *exo*-zyklischen Doppelbindung abläuft, werden die Produkte 1,2-Limonenepoxid (**248**) bzw. 8,9-Limonenepoxid (**249**) gebildet (**Schema 38**). Da die Bildung eines Limonenepoxids sowohl über die *re*- oder *si*-Seite erfolgen könnte, werden im Produktspektrum beide Epoxid-Diastereomere beobachtet. Dass 1,2-Limonenepoxid (**248**)

gegenüber dem 8,9-Limonenepoxid (**249**) bevorzugt gebildet wird, kann mit der erhöhten Reaktivität einer *endo*-zyklischen allylischen Wasserstoff-Abstraktion begründet werden sowie mit einer günstigen Stabilisierung des gebildeten Radikals durch Hyperkonjugation und Resonanz.^[344,345]



Schema 38: Postulierte Reaktionsmechanismen für die Bildung der Limonenepoxide **248** und **249** ausgehend von (-)-**192**.

Zur Überprüfung, ob es sich bei dem Carvon (**251**) um eine enantiomerenreine Verbindung handelt wurde eine chirale GC mit einer Hydrodex- β -6TBDM-Trennsäule durchgeführt. Carvon (**251**) ist ein für die Duft- und Aromaindustrie wertvoller Rohstoff. Während das sensorische Profil von (-)-Carvon eine Pfefferminz-Note aufweist, zeichnet sich das (+)-Carvon durch einen Kümmel-Geruch aus.^[279] Anhand der chiralen Chromatographie konnte festgestellt werden, dass sowohl bei der Umsetzung von (+)-Limonen (**192a**) als auch (-)-Limonen (**192b**) das gebildete Carvon (**251**) als Racemat vorliegt (Abbildung 121).⁵⁴ Eine solche Enantiomerenbildung bei der allylischen Oxidation von Limonen (**192**) wurde ebenfalls von

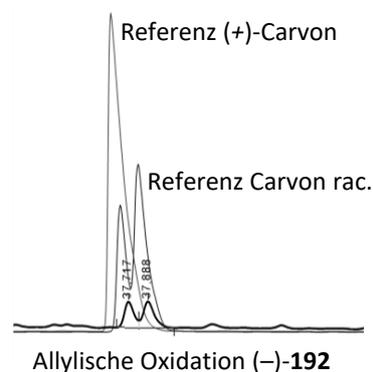
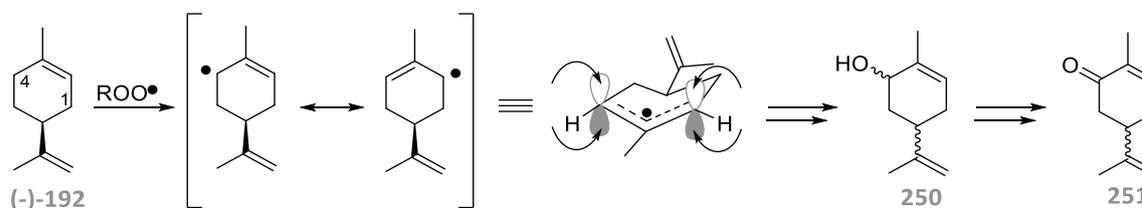


Abbildung 121: chirale GC zur Überprüfung der Enantioselektivität der allylischen Oxidation von (-)-**192**.

ONKEN mit der Basidomycete *P. sapidus* festgestellt.^[350] Die Enantiomerenbildung des Carvon (**251**) beruht hierbei auf der Bildung aller vier möglichen Stereoisomere des Carveol (**250**).^[279] Durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms an der Position C-4 können sich durch Isomerisierung zwei gleichwertige sekundäre Radikale an den Positionen C-2 und C-4 ausbilden (Schema 39).^[279] Die Anlagerung eines Triplett-Sauerstoffs bzw. eines Peroxyradikals kann anschließend an beiden Radikalpositionen sowohl von der *re*- als auch von der *si*-Seite erfolgen, sodass alle vier Stereoisomere des Carveol (**250**) ausgebildet werden.^[351] Die gebildeten Stereoisomere dienen anschließend als Edukt für die Oxidation zum Carvon (**251**).



Schema 39: Postulierter Mechanismus für die Bildung der vier Stereoisomere von Carveol (**250**) aus dem Enantiomer (-)-Limonen (**192**).^[351] Ein identisches Verhalten wurde auch mit (+)-Limonen (**192**) beobachtet. Die gebildeten Stereoisomere des Carveol (**250**) dienen anschließend als Edukt für die Oxidation zu den Carvon-Enantiomeren (**251**).

⁵⁴ Das Chromatogramm zur chiralen GC mit (+)-**192** kann unter Kap. 11.2.4 eingesehen werden.

7.4 Cooxidationen ausgewählter etherischer Öle im analytischen Maßstab

Nachdem bereits mit ausgewählten Mono- und Sesquiterpenen eine erfolgreiche Cooxidation mit den durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD durchgeführt wurde, erfolgte in einem weiteren Schritt die Umsetzung von etherischen Ölen im analytischen Maßstab. Dazu wurde neben dem Guajakholzöl das etherische Vetiver Öl Haiti ausgewählt. Die etherischen Öle wurden vor Beginn der analytischen Enzymtests zunächst mittels GC-MS-Analyse charakterisiert (**Abbildung 122**). Für

das Guajakholzöl konnten auf einer unpolaren DB1-Trennsäule insgesamt 87 Verbindungen ermittelt werden, von denen 42 anhand von RI und MS-Spektren als bekannte Verbindungen identifiziert wurden.⁵⁵ Die bekannten Verbindungen wiesen einen prozentualen Flächenanteil von 85.6 % auf. Mit einer polaren

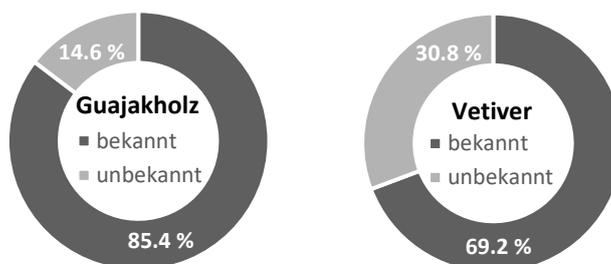


Abbildung 122: Prozentuale Flächenanteile an bekannten und unbekanntem Verbindungen in den etherischen Ölen Guajakholzöl und Vetiver Öl Haiti auf einer polaren WAX-Trennsäule.

WAX-Trennsäule wurden insgesamt 90 Verbindungen nachgewiesen. Davon wurden 43 bekannte Verbindungen identifiziert, die mit den ermittelten Verbindungen der unpolaren Trennsäule übereinstimmen. Der prozentuale Anteil der bekannten Verbindungen belief sich auf 85.4 %, sodass die 47 unbekanntem Verbindungen einen prozentualen Flächenanteil von 14.6 % des Guajakholzöls ausmachen. Der Unterschied hinsichtlich der Anzahl der enthaltenen Verbindungen bei Verwendung von Trennsäulen unterschiedlicher Polarität kann auf Coelutionen einzelner Komponenten zurückgeführt werden. Als Hauptkomponenten wurden die Verbindungen Bulnesol (**201**) und Guajol (**200**) mit Flächenprozenten von 36.8 % bzw. 21.0 % bestimmt, sodass sich das Guajakholzöl zu 47.8 % aus diesen Sesquiterpenen zusammensetzt. Als weitere Verbindungen mit Flächenanteilen zwischen 2.5 - 5.5 % konnten verschiedenste Derivate des Eudesmols ermittelt werden. Auch das für die Guajakholzöle typische Guaioxid (**202**) konnte mit einem Anteil von 0.5 % nachgewiesen werden. Insgesamt zeigt das verwendete etherische Öl somit eine gute Übereinstimmung mit denen in der Literatur charakterisierten Guajakholzölen.^[296,297]

Für das etherische Vetiver Öl Haiti konnten mit einer unpolaren Trennsäule insgesamt 130 Verbindungen nachgewiesen werden, von denen 71 als bekannte Verbindungen identifiziert wurden. Diese entsprechen einen prozentualen Flächenanteil von 75.2 % des etherischen Öls. Mit einer polaren Trennsäule wurden hingegen 177 Verbindungen ermittelt, von denen 78 Verbindungen bekannt und die restlichen 99 Verbindungen unbekannt sind. Die unbekanntem

⁵⁵ Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch einen Abgleich mit den internen Datenbanken der Symrise AG. Dazu wurden die RIs der Verbindungen auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität und die MS-Spektren miteinander verglichen.

Verbindungen entsprechen einem prozentualen Flächenanteil von 30.8 % des etherischen Öls, während 69.2 % des etherischen Öls auf bekannte Verbindungen entfallen. Als Hauptkomponenten wurden die Verbindungen Vetiverol (**252**) und *iso*-Valencenol (**253**) mit Anteilen von 9.9 % bzw. 9.6 % ermittelt (**Abbildung 123**). Auch die für Vetiver Öle typischen Verbindungen α -Vetivon (**196**, 3.8 %) und β -Vetivon (**197**, 3.1 %) sowie das für den Geruchseindruck verantwortliche Khusimon (**199**, 1.3 %) konnten nachgewiesen werden.^[291] Lediglich das ebenfalls für Vetiver Öle charakteristische Khusimol (**198**) konnte durch einen Abgleich der RI und MS-Spektren nicht identifiziert werden.^[291,294]

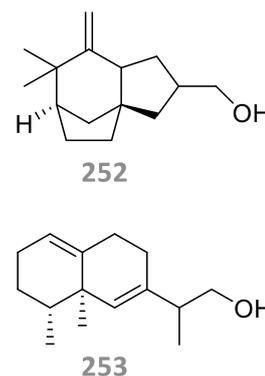
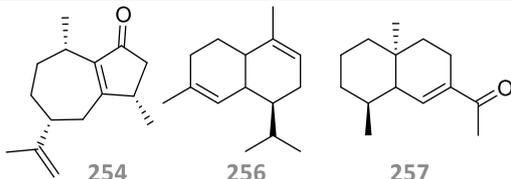
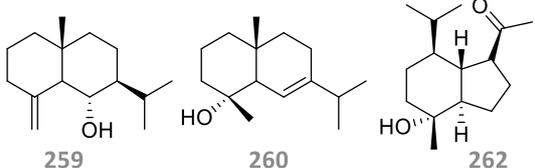


Abbildung 123: Vetiverol (**252**) und *iso*-Valencenol (**253**).

7.4.1 Fraktionierung der etherischen Öle

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der etherischen Öle wurden diese vor der Cooxidation zunächst mittels MPLC nach Polarität fraktioniert. So konnten Fraktionen mit einer geringeren Anzahl an Verbindungen erhalten werden, wodurch Coelutionen reduziert wurden und eine vollständige Charakterisierung der Öle ermöglicht wird. Das Guajakholzöl wurde in vier Fraktionen getrennt, während das Vetiver Öl Haiti aufgrund der hohen Anzahl an Verbindungen in insgesamt 10 Fraktionen unterteilt wurde. Die Fraktionen wurden anschließend mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Analyseverfahren untersucht und die Zusammensetzung der Fraktionen bestimmt. Als Hauptverbindungen der einzelnen Fraktionen wurden die in der **Tabelle 44** angegebenen Verbindungen verifiziert.

Tabelle 44: Hauptkomponenten der über MPLC gewonnenen Fraktionen von Guajakholzöl und Vetiver Öl Haiti. Die Verbindungen **255**, **258** und **261** konnten nicht qualitativ aufgeklärt werden, sodass diese unbekannt sind.

Guajakholzöl				Vetiver Öl Haiti			
Fr.	Verbindung	RI _{FFAP}	A [%]	Fr.	Verbindung	RI _{FFAP}	A [%]
1	δ -Guajen (254)	1731	17.3	1	α -Amorphen (256)	1699	15.1
2	Guajol (200)	2106	49.1	2	Eudesm-6-en-11-on (257)	2110	4.6
3	Bulnesol (201)	2232	44.9	3	258	2211	7.8
4	255	2260	47.6	4	Junenol (259)	2115	16.6
				5	Khusimon (199)	2201	17.6
				6	6-Selinen-4 α -ol (260)	2185	12.3
				7	α -Vetivon (196)	2587	15.7
					β -Vetivon (197)	2542	10.7
				8	Vetiverol (252)	2531	26.5
					<i>iso</i> -Valencenol (253)	2561	23.3
				9	261		7.7
				10	Oplopanon (262)	2557	26.7

Bei dem Guajakholzöl gelang hierbei eine Trennung der beiden Hauptkomponenten Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) in unterschiedliche Fraktionen. Zudem wurde eine weitere Fraktion mit δ -Guajen (**254**) als Hauptkomponente erhalten. Bei dem Vetiver Öl Haiti wurde für die unpolarste Fraktion α -Amorphen (**256**) als Hauptkomponente verifiziert. In der Fraktion 5 wurde das für den Geruchseindruck des Vetiver Öls verantwortliche Khusimon (**199**) mit einem Anteil von 17.6 % angereichert. Die Fraktion 7 enthielt wiederum die für Vetiver Öle typischen Vetivone (**196, 197**), deren prozentuale Anteile ebenfalls durch die MPLC erhöht wurden. Die Hauptverbindungen Vetiverol (**252**) und *iso*-Valencenol (**253**) reichert sich zusammen in einer Fraktion (Fr. 9) an. In den weiteren Fraktionen wurden die Sesquiterpenoide 12-*nor*-Eudesm-6-en-11-ol (**257**), Junenol (**259**), 6-Selinen-4 α -ol (**260**) und Oplopanon (**262**) als Hauptkomponenten nachgewiesen.

7.4.2 Cooxidation von Guajakholzöl

Die Cooxidationen des Guajakholzöls, sowie die nach Polarität getrennten Fraktionen, wurden im analytischen Maßstab und in einem einstufigen Prozess mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD umgesetzt. Neben einer GC-MS Analyse zur Verifizierung der Produktzusammensetzung erfolgte eine sensorische Prüfung des etherischen Öls und der einzelnen Fraktionen (**Tabelle 45**). Das etherische Öl wies nach der Cooxidation eine nach schwarzem Pfeffer riechende Kopfnote sowie einen dominanten fruchtigen und metallischen Eindruck auf. Auch die sensorischen Profile der einzelnen Fraktionen zeigten Veränderungen. So konnte für die Fraktion 1 eine Abnahme der Pfeffernote sowie dominante fruchtige und metallische Noten wahrgenommen werden, die auch für das reine Guajakholzöl beobachtet wurde. Zudem enthielt die Fraktion einen Nebengeruch, der als Crinipan und cremig beschrieben wurde. Die Fraktionen 2 und 3 zeichneten sich nach der Cooxidation durch eine esterartige Fruchtigkeit aus, während die Fraktion 4 einen starken fruchtigen Geruch sowie süße und grüne Noten aufwies.

Tabelle 45: Sensorische Profile von dem Guajakholzöl sowie von den über MPLC gewonnenen Fraktionen des etherischen Öls vor und nach der Cooxidation mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD.

Probe	Ausgang	nach Cooxidation
Guajakholzöl	Holzlig, rauchig, rosig	Pfeffrig, fruchtig, metallisch
Fraktion 1	Pfeffrig, holzig, etherisch	Fruchtig, metallisch crinipan, cremig
Fraktion 2	Würzig, pfeffrig, fettig	Schwach fruchtig
Fraktion 3	Würzig, süß, fettig	Schwach fruchtig
Fraktion 4	Holzlig, aromatisch, cedernartig	Fruchtig, süß, grün

Auch anhand einer GC-MS Untersuchung und einem Vergleich der Chromatogramme von Ausgang und Cooxidation wurde die signifikante Veränderung der Produktzusammensetzung bestätigt. Aufgrund der geringeren Anzahl an Verbindungen in den Fraktionen und einer damit einhergehenden geringeren Coelution einzelner Verbindungen, lieferten die Fraktionen einen genaueren Einblick in die Veränderungen der Zusammensetzung. Dadurch gelang die Detektion von

bedeutsamen Veränderungen der enthaltenen Nebenkomponenten. Durch die Fraktionierung zeigte sich zudem, dass vor allem die unpolarste Fraktion 1 die deutlichsten Veränderungen hinsichtlich einer allylischen Cooxidation und Epoxidierung erfahren hat. Da mit steigender Polarität potentielle allylische Positionen bereits oxidiert vorliegen könnten und folglich für eine HPOD-induzierte Oxidation nicht mehr zur Verfügung stünden, ist diese Beobachtung nicht verwunderlich. In allen HPOD-induzierten Cooxidationen wurde als Nebenprodukt die Verbindung Hexanal identifiziert, welches eine frische grüne Note aufweist. Hierbei handelt es sich allerdings um ein typisches Abbauprodukt der 13-HPOD, welches durch die HPOD-Lyase Eigenschaft der LOXn hervorgerufen wird.^[246]

Da für die Fraktion 1 die bedeutendsten Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung beobachtet wurden, wird diese nachfolgend näher betrachtet. Anhand des Chromatogramms zeigte sich bereits, dass eine Vielzahl der neu gebildeten Produkte eine Verschiebung zu höheren RIs aufweisen, sodass es sich bei diesen Verbindungen um oxidierte Terpene handeln sollte, die über eine oder mehrere Sauerstofffunktionen verfügen (**Abbildung 124**). Dies kann zudem durch detektierte Molpeaks von m/z 220, m/z 222 und m/z 238 bestätigt werden.

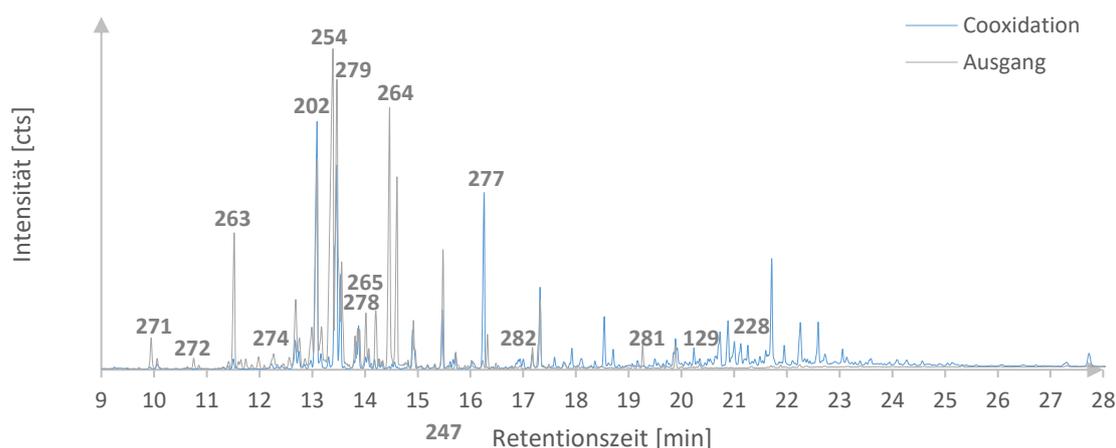
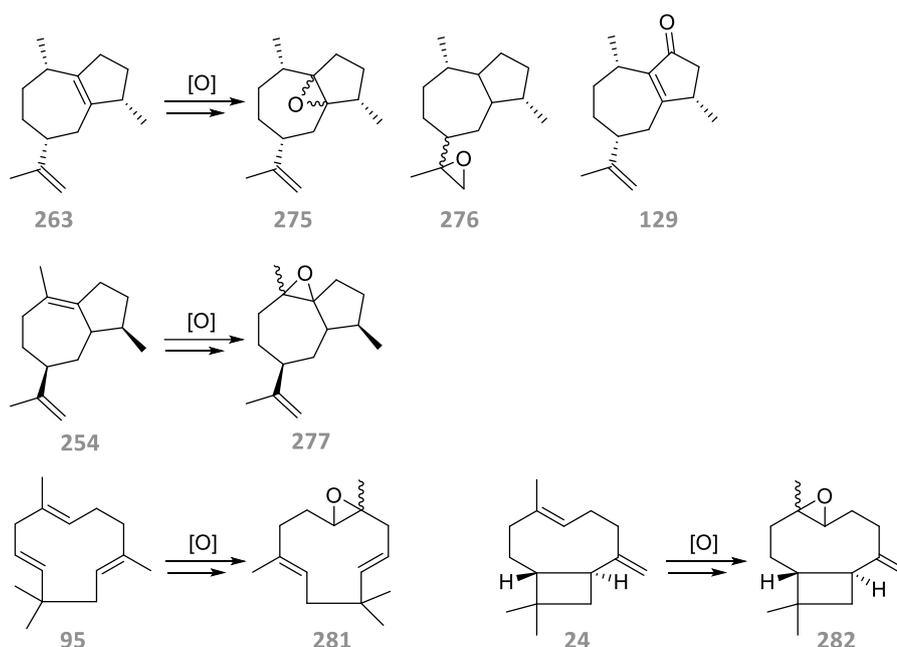


Abbildung 124: Überlagerung eines Ausgangschromatogramms (grau) mit dem Chromatogramm nach erfolgreicher Cooxidation der Fraktion 1 des Guajakholzöls (blau) mit den durch LOX produzierten HPOD auf einer polaren FFAP-Trennsäule. Es kann eine signifikante Produktbildung bei höheren Retentionszeiten beobachtet werden. Aufgrund der Nutzung einer polaren Trennsäule, sollte es sich bei den Produkten um Verbindungen mit einer Sauerstofffunktionalität handeln. Ausgewählte Cosubstrate und Cooxidationsprodukte wurden beispielhaft zugeordnet.

Durch einen Vergleich der prozentualen Flächenanteile vor und nach der Cooxidation gelang die Detektion von Verbindungen, die eine prozentuale Abnahme der Flächenanteile erfahren haben. Folglich sollten diese Verbindungen durch die HPOD allylisch oxidiert oder bei Vorliegen von sterischen Hinderungen epoxidiert worden sein. Hierbei konnte eine Abnahme der prozentualen Flächenanteile für die Verbindungen α -Guajen (**263**), δ -Guajen (**254**), β -Bulensen (**264**), Selina-4,7-dien (**265**), β -Selinen (**266**), 10-epi- γ -Eudesmol (**267**), α -Bergamoten E (**268**), Guaia-1,6-dien (**269**) und (*E*)- β -Bergamoten (**270**) beobachtet werden. Die Verbindungen β -Caryophyllen (**24**), α -Humulen (**95**), β -Patchoulen (**271**), 6,9-Guajadien (**272**), γ -Gurjunen (**273**) und δ -Patchoulen (**274**) wurden durch die Cooxidation vollständig in die entsprechenden allylischen Oxidationsprodukte oder Epoxide überführt und sind nicht mehr nachweisbar. Zudem wurde auch für eine Vielzahl von

unbekannten Verbindungen eine Abnahme der prozentualen Flächenanteile beobachtet. Gleichzeitig konnten anhand der Chromatogramme etwa 50 neu gebildete oder angereicherte Verbindungen ermittelt werden, von denen die Verbindungen α -Guajenoxid (**275**), α -Guajenoxid II (**276**), Rotundon (**129**), δ -Guajenoxid (**277**), Guaioxid (**202**), Kessan (**278**), β -dihydro-Agarofuran (**279**), *iso*-dihydro-Agarofuran (**280**), α -Humulenepoxid (**281**), β -Caryophyllenoxid (**282**) und α -Cyperon (**228**) anhand von RI und MS-Spektren identifiziert wurden. Guaioxid (**202**) wurde dabei mit einem Flächenanteil von 14.9 % gebildet, während δ -Guajenoxid (**277**) mit einem Anteil von 8.6 % nachgewiesen wurde. Bei den beiden Produkten handelt es sich nach der cooxidativen Umsetzung um die Hauptkomponenten der Fraktion. Aufgrund der Annahme eines freien Peroxyradikalmechanismus gelang eine Zuordnung der in der Fraktion enthaltenen Produkte α -Guajen (**263**), δ -Guajen (**254**), α -Humulen (**95**) und β -Caryophyllen (**24**) zu den identifizierten Cooxidationsprodukten α -Guajenoxid (**275**), α -Guajenoxid II (**276**) und Rotundon (**129**) sowie δ -Guajenoxid (**277**), α -Humulenepoxid (**281**) und β -Caryophyllenoxid (**282**) (**Schema 40**). Infolge sterischer Faktoren wurde vermehrt die Bildung von Epoxiden anstelle einer allylischen Oxidation beobachtet.^[344]

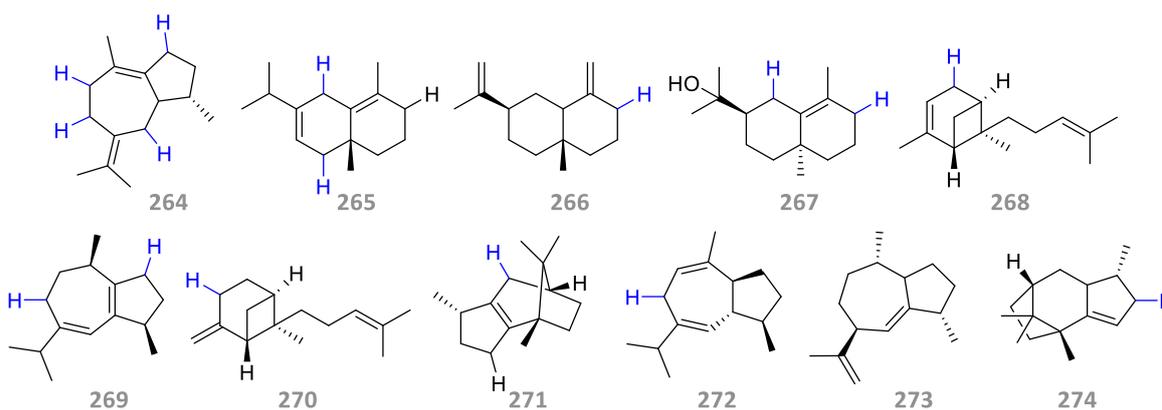


Schema 40: Zuordnung der identifizierten Cooxidationsprodukte zu den enthaltenen Terpenoiden (Fr. 1). Die Epoxidierung führt zur Bildung von Diastereomeren, da die Anlagerung sowohl von der *re*- als auch *si*-Seite erfolgen kann.

Für die weiteren Cosubstrate, die nachweislich eine Abnahme der prozentualen Flächenanteile und somit eine Cooxidation erfahren haben sollten, konnte kein passendes Oxidationsprodukt anhand der RIs und MS-Spektren identifiziert werden. Da allerdings eine Vielzahl der gebildeten Oxidationsprodukte massenspektrometrisch nicht aufgeklärt wurden, handelt es sich bei diesen Verbindungen womöglich um die entsprechenden Produkte. In der **Abbildung 125** sind die möglichen Positionen für eine Wasserstoffabstraktion unter Einbezug von Resonanzstabilisierung, Hyperkonjugation und sterischen Faktoren für die Cosubstrate gekennzeichnet. Bei den Bergamoten-Isomeren **268** und **270** sollte die *endo*-zyklische allylische Wasserstoffabstraktion

aufgrund der „zyklischen Aktivierung“ gegenüber der *exo*-zyklischen Abspaltung bevorzugt sein.^[345] Das γ -Gurjunen (**273**) ist in den allylischen Positionen sterisch gehindert, sodass die Bildung eines Epoxids wahrscheinlich ist. Die Epoxidierung kann auch bei den weiteren Verbindungen in Konkurrenz zur allylischen Oxidation auftreten.^[344] Die Cooxidation von α -Cypren (**230**) zu dem Sesquiterpen α -Cyperon (**228**) wurde bereits in Zusammenhang mit der Cooxidation des (+)-Valencen (**3**) festgestellt. Mit den weiteren Produkten Guaioxid (**202**) und **278-280** konnten zudem erstmals Sauerstoff-verbrückte Cooxidationsprodukte für das LOX-HPOD-System nachgewiesen werden.

A: Akzeptierte Cosubstrate



B: Cooxidationsprodukte

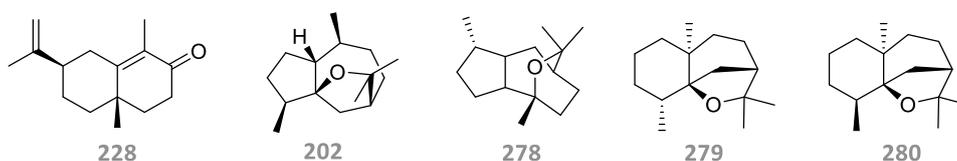
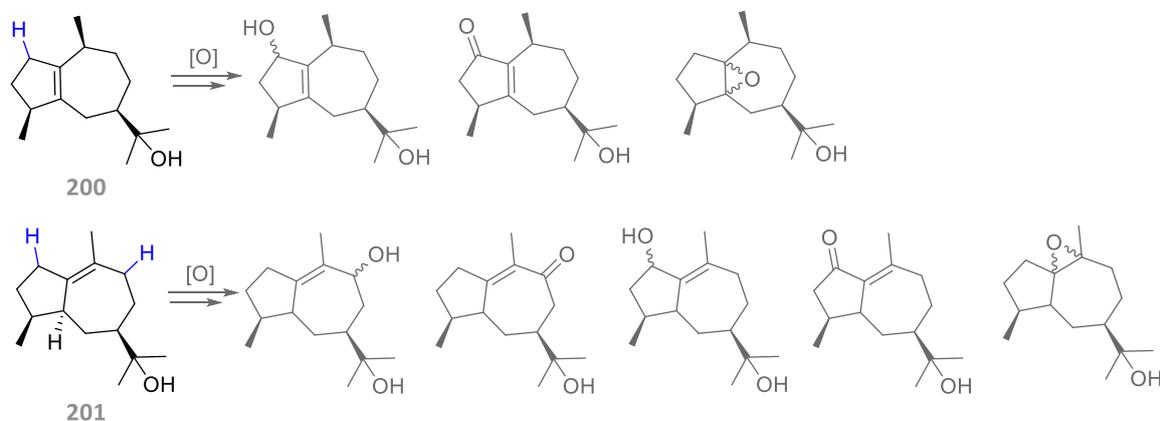


Abbildung 125: Durch GC-MS Analyse nachgewiesene Cosubstrate in der Fraktion 1 des Guajakholzöls sowie weitere Cooxidationsprodukte. **A:** Cosubstrate die durch die Behandlung mit den durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD eine Cooxidation erfahren. Die Akzeptanz der Verbindungen beruht auf einer Abnahme des prozentualen Flächenanteils im Vergleich zum Ausgang. In blau sind mögliche Positionen für eine Wasserstoffabspaltung und Ausbildung eines Radikals gekennzeichnet. Positionen, an denen eine sterische Hinderung vermutet wird, sowie *exo*-zyklische Positionen sind nicht farblich hervorgehoben. **B:** weitere Cooxidationsprodukte der HPOD-induzierten Cooxidation.

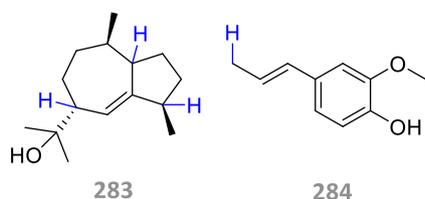
Bei der Fraktion 2 konnte eine eindeutige Cooxidation des im etherischen Guajakholzöls hauptanteilig enthaltenen Guajols (**200**) festgestellt werden. Weiterhin konnte eine prozentuale Abnahme der Verbindungen 5-Guaien-11-ol (**283**) und (*E*)-Isoeugenol (**284**) nachgewiesen werden. Von den 37 detektierten Oxidationsprodukten wurden die Verbindungen α -Agarofuran (**285**), γ -Eudesmol (**286**), Hedycayrol (**287**), α -Eudesmol (**288**) und Eremoligenol (**289**) qualitativ ermittelt (**Abbildung 126, B/C**). Mit Ausnahme des α -Agarofurans (**285**) könnten die weiteren Verbindungen **286-289** durch eine Epoxidierung der Isopropenylgruppe und einer anschließenden Ringöffnung gebildet worden sein. Oxidationsprodukte des Guajol (**200**) konnten nicht massenspektrometrisch identifiziert werden. In der Fraktion 3 konnte zudem eine deutliche Abnahme des Bulnesol (**201**) festgestellt werden. Da die Fraktionen 2 und 3 viele identische Produkte enthielten, wurden ferner die zuvor beobachteten Cooxidationen bestätigt. Weiterhin wurde β -Eudesmol (**290**) als Oxidationsprodukt nachgewiesen (**Abbildung 126, C**). Die Verbindung **290** könnte durch eine

Epoxidierung und anschließende Ringöffnung aus β -Selenen (**266**) gebildet worden sein. Für Bulnesol (**201**) konnten in Analogie zum Guajol (**200**) keine Oxidationsprodukte zugeordnet werden.

A: Postulierte Cooxidationsprodukte von 200 und 201



B: Weitere akzeptierte Cosubstrate



C: Cooxidationsprodukte

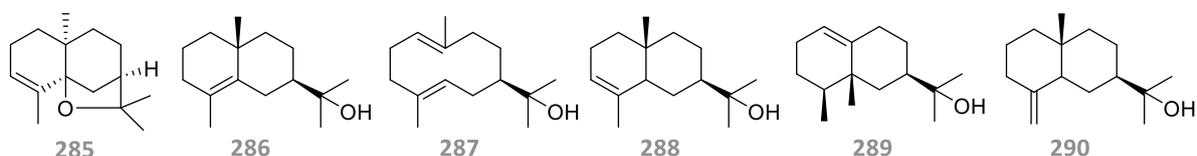


Abbildung 126: A: Postulierte Cooxidationsprodukte für die allyliche Oxidation bzw. Epoxidierung der Hauptprodukte Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**). Die wahrscheinlichsten Positionen für eine Wasserstoffabstraktion sind farblich gekennzeichnet (blau). Die Festlegung der vermuteten Wasserstoffabstraktion basiert auf den Möglichkeiten der Resonanzstabilisierung und Hyperkonjugation sowie sterischen Faktoren. B: weitere nachgewiesene Cosubstrate des Guajakholzöls und gekennzeichnete Positionen für eine Wasserstoffabstraktion. C: Mittels GC-MS Analyse identifizierte Cooxidationsprodukte **285-290**.

In der **Abbildung 126 A** sind mögliche postulierte Cooxidationsprodukte der Hauptprodukte Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) abgebildet. Die Bildung der Produkte basiert auf einem freien Peroxyradikalmechanismus. Als mögliche Positionen für eine Wasserstoffabstraktion und Ausbildung eines Radikals eignen sich die farblich markierten Wasserstoffatome. Ferner können sie durch die allyliche Position resonanzstabilisiert werden, wodurch sich bei den aufgezeigten Positionen tertiäre Radikale ausbilden, die durch Hyperkonjugation stabilisiert sind. Neben einer allylichen Oxidation verbleibt weiterhin die Möglichkeit einer Epoxidierung der vorhandenen Doppelbindung. Für die Fraktion 4 konnte hingegen nur eine sehr geringe Präferenz für eine Cooxidation festgestellt werden. Da es sich hierbei um die polarste Fraktion handelt, könnten bereits eine Vielzahl von allylich oxidierten Verbindungen enthalten sein, die kein geeignetes Cosubstrat für die Cooxidation darstellen.

Die Umsetzung des Guajakholzöls mit den durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Cooxidation der einzelnen Fraktionen. Auch im Falle des Guajakholzöls konnte eine deutliche Abnahme der Verbindungen Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) beobachtet werden, sodass sich diese Verbindungen als Cosubstrate für eine HPOD-induzierte Cooxidation eignen. Diese Aussage trifft zudem auf alle weiteren Verbindungen zu, die durch die Cooxidation eine Peakflächenreduktion erfahren haben bzw. nicht mehr nachweisbar sind (**Tabelle 46**).

Tabelle 46: Tabellarische Auflistung jener Verbindungen, die durch die Cooxidation abgebaut wurden und somit durch das LOX-HPOD-System als Cosubstrate akzeptiert wurden sowie identifizierte Cooxidationsprodukte. Es sind nur Verbindungen aufgeführt, die eine signifikante Peakflächenveränderung erfahren haben und sowohl bei der Umsetzung des Guajakholzöls als auch bei der Umsetzung der Fraktionen detektiert wurden. Da viele der Nebenprodukte nur zu geringen Anteilen in dem etherischen Öl enthalten sind, wurden mit den Fraktionen signifikantere Abweichungen für diese Verbindungen nachgewiesen. Eine Ausnahme bilden die Hauptprodukte **200** und **201**, welche auch bei der Umsetzung des etherischen Öls eine deutliche Veränderung zeigten.

	akzeptierte Cosubstrate			Cooxidationsprodukte			
	RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}	RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}	
24^B	1603	0.3	-	129^B	2294	0.1	0.8
95^B	1606	0.2	-	202^B	1709	8.9	14.9
200^A	2103	21.0	-	228^B	2378	-	1.7
201^A	2232	36.8	1.1	275^B	1845	1.7	2.3
254^B	1731	17.3	0.5	276^B	1903	-	0.4
263^B	1597	4.2	0.5	277^B	1949	0.3	8.6
264^B	1810	8.7	0.1	278^B	1768	1.0	1.6
265^B	1788	1.9	0.4	279^B	1737	10.3	14.0
266^B	1713	1.9	0.6	280^B	1743	3.6	4.2
267^B	1685	1.2	0.8	281^B	2060	0.1	0.4
268^B	1590	0.3	0.1	282^B	2002	-	0.3
269^B	1613	0.3	-	285^C	1906	-	0.6
270^B	1692	0.4	0.2	286^C	2122	9.4	11.1
271^B	1490	1.0	-	287^D	2091	1.3	3.4
272^B	1546	0.3	-	288^C	2229	-	0.3
273^B	1631	0.4	-	289^C	2192	0.8	3.0
274^B	1651	0.8	-	290^D	2251	7.1	12.1
283^C	2130	1.0	0.4	^E	1732	1.2	5.8
284^C	2378	0.4	-	^E	1818	0.5	1.0
^A Flächenprozentage aus der Cooxidation des Guajakholzöls,				^E	2011	-	1.7
^{B-D} Flächenprozentage aus der Cooxidation der Fraktion 2-3,				^E	2156	0.5	1.1
^E Unbekannte Verbindungen die durch die Cooxidation eine signifikante Zunahme erfahren haben (nur Verbindungen mit einem A[%] _{Cooxidation} > 1.0 %.				^E	2353	-	1.7
				^E	2371	0.5	2.1

7.4.3 Cooxidation von Vetiver Öl Haiti

Auch bei der Cooxidation von Vetiver Öl Haiti sowie dessen nach Polarität getrennten Fraktionen konnte bereits anhand des sensorischen Profils eine signifikante Veränderung festgestellt werden, die auf eine erfolgreiche Oxidation hinweist. So zeigte das etherische Vetiver Öl Haiti nach der Cooxidation einen stark campherartigen Geruch der zudem etherische, frische, erdige und holzige Noten aufwies. Der holzige Geruchseindruck ist dabei vergleichbar mit dem des Sandelholzes. Auch die einzelnen Fraktionen zeigten deutliche Abweichungen hinsichtlich des sensorischen Profils (**Tabelle 47**). Insbesondere die Fraktion 2, die vor der Cooxidation über einen muffigen, schimmeligen und Aquaristik-ähnlichen Geruch verfügte, der zudem stechend und narkotisch wirkte, wies anschließend ein holzig, etherisches Profil auf. Die Fraktion 5 vermittelte nach der Cooxidation einen fruchtigen Geruchseindruck. Die Fraktionen 6 und 7 zeigten vor den Umsetzungen ein scharfes, mit Meerrettich und Wasabi vergleichbares Profil, das durch die Cooxidation vollständig verdrängt wurde. Insgesamt konnte bei dem Vetiver Öl Haiti der holzige Geruchseindruck um etherische und campherartige Noten ergänzt werden. Weiterhin wiesen ausgewählte Fraktionen zudem erdige, fettige und metallische Noten auf.

Tabelle 47: Sensorische Profile des Vetiver Öl Haiti sowie der Fraktionen vor und nach der Cooxidation.

Probe	Ausgang	nach Cooxidation
Vetiver Öl	Süß, holzig, würzig	Campher, etherisch, frisch, erdig
Fraktion 1	Grün, würzig	Etherisch, campher, frisch, erdig
Fraktion 2	Muffig, schimmelig, narkotisch	Holzlig, etherisch
Fraktion 3	Holzlig, krautig, bitter, campher	Holzlig, campher
Fraktion 4	Fettig, holzig, wachsig, aldehydisch	Fettig, holzig, grün
Fraktion 5	Grün, fettig, holzig, gurkig	Fruchtig
Fraktion 6	Grün, scharf, stechend	Grün, stechend, fettig, holzig
Fraktion 7	Scharf, süß, holzig, leicht sandelartig	Campher, pfeffrig, buttrig, holzig, cremig
Fraktion 8	Süß, grün, schwach holzig, sandelartig	Etherisch, campher, pfeffrig, süß
Fraktion 9	Grün, krautig, holzig, sandelartig	Holzlig, fettig, leicht metallisch
Fraktion 10	Schwer holzig, süß	Metallisch, fettig

Eine anschließende GC-MS Analyse bestätigte die HPOD-induzierte Cooxidation. Insgesamt konnte eine Verschiebung der Produkte zu höheren RIs beobachtet werden, sodass es sich bei den Produkten um sauerstofffunktionalisierte Verbindungen handeln sollte. Als Produkte können somit allylische Alkohole, Aldehyde und Ketone erwartet werden. Da viele der enthaltenen Terpene zudem zyklischer Natur sind und über Alkyl- und Alkenylreste verfügen sind, insbesondere bei sterisch anspruchsvollen Verbindungen, Epoxidierungen möglich. Letztere treten dabei in Konkurrenz zur allylischen Oxidation auf.^[343] Da durch die Fraktionierung einzelne Komponenten angereichert wurden und Coelutionen aufgrund einer geringeren Anzahl an Verbindungen reduziert wurden, erfolgte eine Identifikation von Cosubstraten und Cooxidationsprodukten

anhand der einzelnen Fraktionen. Die nachgewiesenen Verbindungen wurden anschließend auf das etherische Vetiver Öl Haiti übertragen und mit der Cooxidation des Öls verglichen. In Bezug auf die einzelnen Fraktionen konnten in Analogie zum Guajakholzöl die signifikantesten Umsetzungen mit der unpolarsten Fraktion beobachtet werden. Mit zunehmender Polarität zeigte sich hingegen eine sinkende Akzeptanz der enthaltenen Verbindungen gegenüber einer Cooxidation.

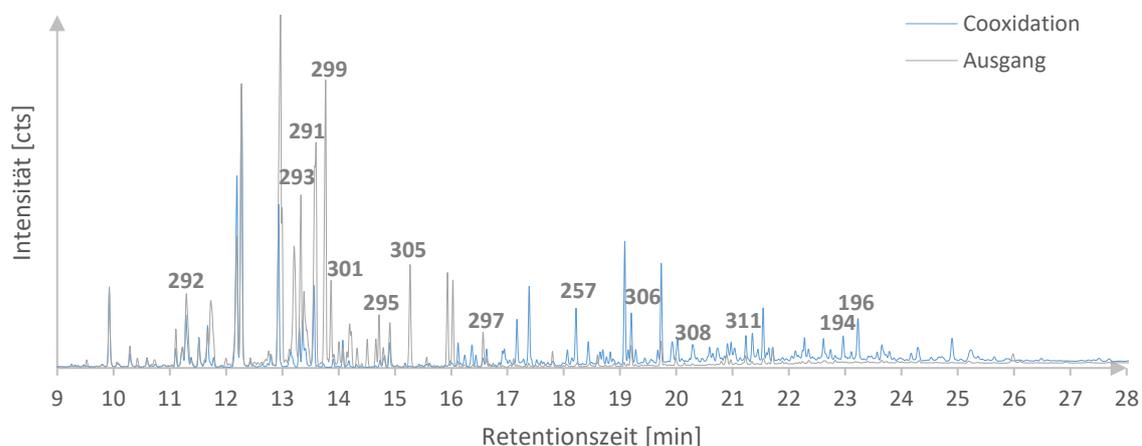


Abbildung 127: Überlagerung der Cooxidation der Fraktion 1 (blau) des etherischen Vetiver Öl Haiti mit dem Ausgangschromatogramm (grau) der Fraktion 1 vor HPOD-induzierten Oxidation. Ausgewählte Cosubstrate und Cooxidationsprodukte sind beispielhaft gekennzeichnet.

Anhand der **Abbildung 127** kann eine deutliche Abnahme der prozentualen Flächenanteile für die unpolaren Verbindungen der Fraktion 1 beobachtet werden. Gleichzeitig können eine Vielzahl von neuen Verbindungen nachgewiesen werden die, aufgrund einer ausgeprägteren Wechselwirkung mit der polaren Trennsäule, verzögert von der Säule eluieren und somit größere RI aufweisen. Für insgesamt 28 Verbindungen konnte eine Abnahme der prozentualen Flächenanteile infolge der Cooxidation ermittelt werden, wovon auch die Hauptkomponente α -Amorphen (**256**) betroffen ist. Weitere Verbindungen, die ebenfalls ein Potential als Cosubstrat für die HPOD-induzierte Cooxidation aufweisen sind *iso*-Valencen (**291**), 1,7-diepi- β -Cedren (**292**), γ -Cadinen (**293**), (+)-Valencen (**3**), β -Guajen (**294**), Nootkaten (**295**), (*E*)-Calamenen (**296**) und α -Calacoren (**297**). Zudem wurden die anfänglich in der Fraktion enthaltenen Verbindungen 5,11-Selinen (**298**), β -Vetispiren (**299**), α -Humulen (**95**), α -Cadinen (**300**), δ -Cadinen (**301**), δ -Selinen (**302**), (*Z*)-Eudesma-6,11-dien (**303**), γ -Vetiven (**304**) und β -Vetiven (**305**) nach der erfolgreichen Cooxidation nicht mehr nachgewiesen, sodass auch diese als Cosubstrate für die allylische Oxidation fungieren. Dem gegenüber stehen die Bildungen von 51 Oxidationsprodukten. Hierbei konnten qualitativ die Verbindungen Humulenepoxid (**281**), 4A,8-dimethyl-2-Octalinon (**306**), *noriso*-Valencenon (**307**), Muskatone (**308**), 10-*nor*-Calamenen-10-on (**309**), β -Cyperon (**310**), Nootkaton (**194**) und α -Vetivon (**196**) bestimmt werden. Zudem konnten die Stereoisomere von 10-hydroxy-Calamenen (**311**) und Nootkatol (**195**, **227**) ermittelt werden.

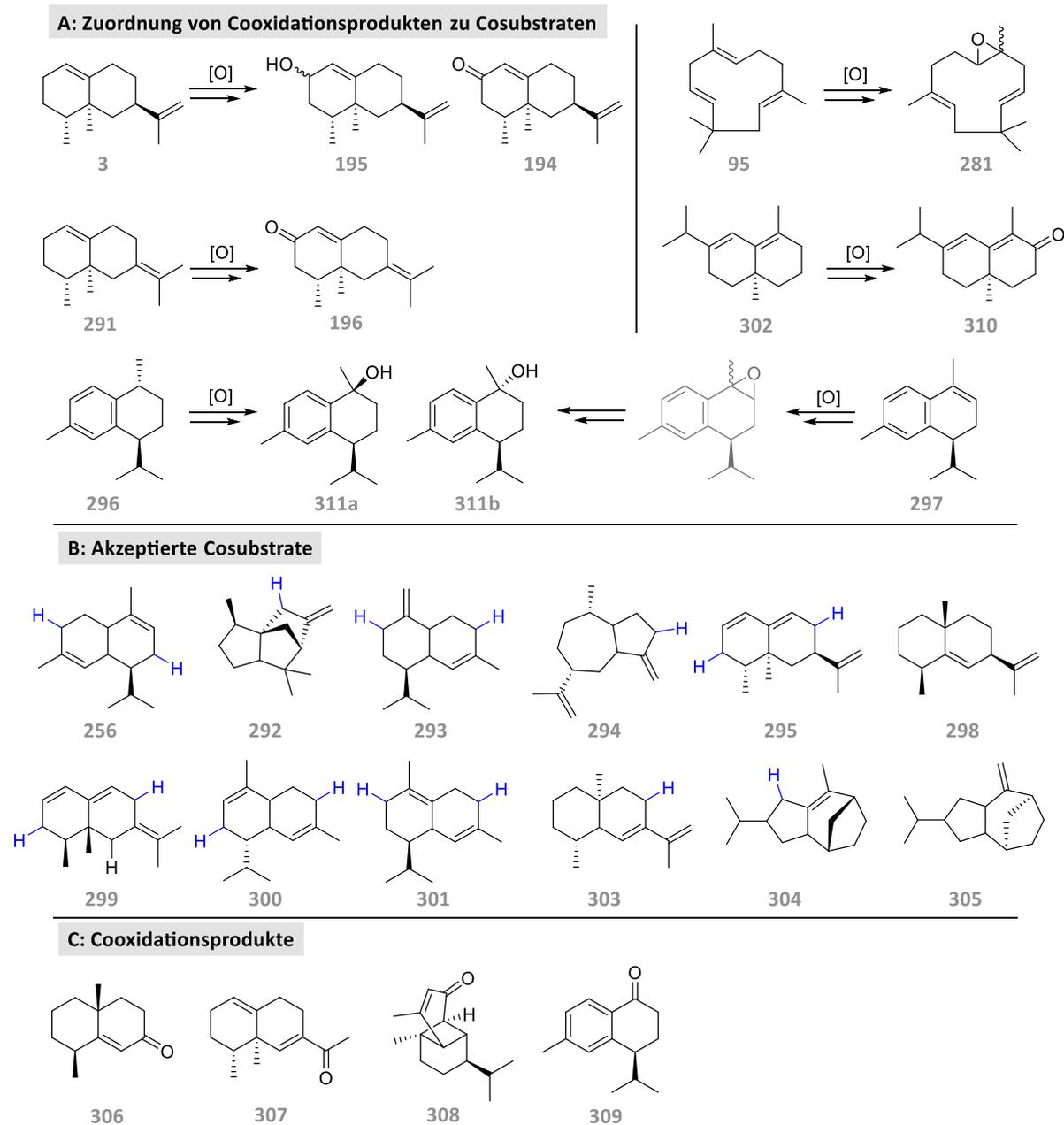


Abbildung 128: Mittels GC-MS-Analyse qualitativ identifizierte Cosubstrate und Cooxidationsprodukte der Fraktion 1. **A:** Zuordnung von nachgewiesenen Oxidationsprodukten zu den in der Fraktion 1 enthaltenen Cosubstraten. **B:** Nachgewiesene akzeptierte Cosubstrate, für die jedoch keine passenden Oxidationsprodukte identifiziert wurden. Mögliche initiale Wasserstoffabstraktionen sind farblich (blau) markiert. Die angegebenen Positionen wurde hinsichtlich sterischer Faktoren, Resonanzstabilisierung und Hyperkonjugation der entstehenden Radikale begutachtet. **C:** Weitere Cooxidationsprodukte **306-309**, die durch die Behandlung der Fraktion mit den HPOD gebildet wurden.

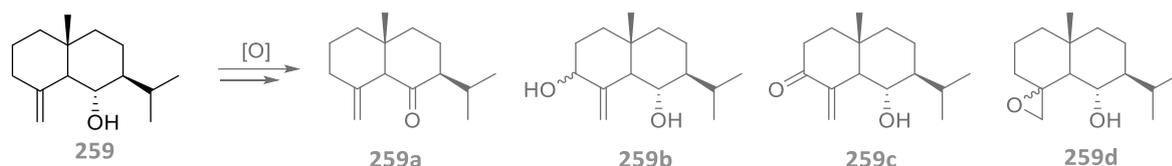
Eine Zuordnung der identifizierten Cosubstrate zu den entsprechenden Cooxidationsprodukten gelang für sechs der nachgewiesenen Sesquiterpenoide (**Abbildung 128, A**). So konnten für das bereits als Testsubstrat genutzte (+)-Valencen (**3**) die Oxidationsprodukte *exo*- und *endo*-Nootkatol (**195**, **227**) sowie Nootkaton (**194**) bestimmt werden. Für α -Humulen (**95**) konnte in Analogie zum Guajakholzöl das Humulenepoxid (**281**) als Oxidationsprodukt zugeordnet werden. α -Vetivon (**196**) und β -Cyperon (**310**) konnten als Oxidationsprodukte der Substrate *iso*-Valencen (**291**) und δ -Selinen (**302**) identifiziert werden. Eine allylische Oxidation des (*E*)-Calamenen (**296**) lieferte zudem die Stereoisomere 10- α -hydroxy-Calamenen (**311a**) und 10- β -hydroxy-Calamenen (**311b**).

Eine Bildung der tertiären Alkohole **311a** und **311b** wäre weiterhin auch ausgehend von dem Cosubstrat α -Calacoren (**297**) denkbar, indem eine radikalische Epoxidierung gefolgt von einer Ringöffnung stattfinden würde.

Für die weiteren mittels GC-MS nachgewiesenen Cosubstrate (**Abbildung 128, B**) konnten keine passenden Oxidationsprodukte identifiziert werden. Ausgehend von einem freien Peroxyradikalmechanismus bieten sich jedoch die farblich markierten Wasserstoffatome für eine initiale Abstraktion an, da die entstehenden Radikale durch Resonanz und Hyperkonjugation stabilisiert würden. Weitere potentielle allylische Wasserstoffabstraktionen wären ebenfalls möglich, sind allerdings weniger wahrscheinlich, da sterische Faktoren eine Abstraktion behindern würden. Bei den Cosubstraten 5,11-Selinen (**298**) und β -Vetiven (**305**) befinden sich in Allyl-Position zur zyklischen Doppelbindung Alkyl- bzw. Alkenylreste oder auch verbrückte Kohlenstoffatome, sodass sterische Hinderungen gegeben sind, die eine allylische Oxidation erschweren. Stattdessen ist bei diesen Verbindungen die in Konkurrenz auftretende Epoxidierung der Doppelbindung wahrscheinlicher.^[344] Für vier weitere Cooxidationsprodukte **306-309** konnte hingegen kein passendes Cosubstrat⁵⁶ über die GC-MS-Analyse identifiziert werden (**Abbildung 128, C**). Da der freie Peroxyradikalmechanismus der HPOD zu einer allylischen Oxidation führt, sollte es sich bei den entsprechenden Cosubstraten allerdings um die Verbindungen ohne Ketofunktion handeln. Wie bereits bei der Cooxidation von Geraniol (**141**) und Limonen (**192**) festgestellt wurde, könnten auch die hydroxylierten Verbindungen als Cosubstrate fungieren.

Eine Auswertung der weiteren Fraktionen lieferte zusätzliche Cosubstrate für das LOX-HPOD-System. So konnte für die Hauptkomponenten der Fraktionen eine signifikante Abnahme der Verbindungen β -Vetivon (**197**), Khusimon (**199**), *iso*-Valencenol (**253**), 12-*nor*-Eudesm-6-en-11-on (**257**), Junenol (**259**) sowie der unbekanntesten Verbindungen **258** und **261** beobachtet werden. Im **Schema 41** sind mögliche postulierte Produkte für die radikalische Oxidation des Junenol (**259**) aufgezeigt. Neben einer Oxidation der bereits vorhandenen Hydroxygruppe zum Keton (**259a**), könnte eine Hydroxylierung (**259b**) oder Ketobildung (**259c**) in Allyl-Position der *exo*-zyklischen Doppelbindung erfolgen. Weiterhin wäre zudem eine Epoxidierung (**259d**) in Konkurrenz zur allylischen Oxidation denkbar. Für die Verbindungen α -Vetivon (**196**) und Vetiverol (**252**) konnte hingegen eine Zunahme des prozentualen Flächenanteils beobachtet werden, sodass diese Verbindungen als Oxidationsprodukte gebildet wurden. Das α -Vetivon (**196**) konnte bereits auf eine Cooxidation des im etherischen Öl enthaltenen *iso*-Valencen (**291**) zurückgeführt werden. Für das Oplopanon (**262**) wurde hingegen keine signifikante Veränderung festgestellt, sodass diese Verbindung nicht als Cosubstrat für die HPOD-induzierte Cooxidation agiert.

⁵⁶ Die überwiegende Mehrheit der enthaltenen Cosubstrate und Cooxidationsprodukte konnte nicht mittels GC-MS Analyse aufgeklärt werden, sodass es sich bei diesen unbekanntesten Verbindungen um die möglicherweise passenden Oxidationsprodukte bzw. Cosubstrate handelt.



Schema 41: Postulierte Produkte **259a-d** für die HPOD-induzierte Oxidation des Junenol (**259**). Die in grau markierten Produkte konnten nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Für die weiteren Verbindungen Khusimol (**198**), 10-*epi*- γ -Eudesmol (**267**) sowie **312-321** wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme der Flächenprozentage beobachtet (**Abbildung 129**). Die Verbindungen *noriso*-Valencenon (**307**), δ -Amorphen (**322**), 1,11-Eremophiladen-9 β -ol (**323**), 13-*nor*-Eudesma-4,6-dien-11-on (**324**), *iso*-Valencenal (**325**) und α -Cadinol (**326**) konnten zudem nach der Cooxidation nicht mehr nachgewiesen werden, sodass diese Verbindungen ebenfalls als geeignete Cosubstrate für die allylische Oxidation fungieren. Da für die Verbindungen *noriso*-Valencenon (**307**) und Nootkatol (**195**, **227**) sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der prozentualen Flächenanteile nachgewiesen wurde, agieren diese Verbindungen einerseits als Cosubstrat für eine weiterführende allylische Oxidation bzw. eine Oxidation zum Nootkaton (**194**), andererseits werden sie als Cooxidationsprodukt gebildet. Bei Letzterem könnte der entsprechende Alkohol als Vorläufersubstrat für die Bildung des *noriso*-Valencenon (**307**) dienen, während Nootkatol (**195**, **227**) nachweislich aus (+)-Valencen (**3**) gebildet wird (s. Kap. 7.5).

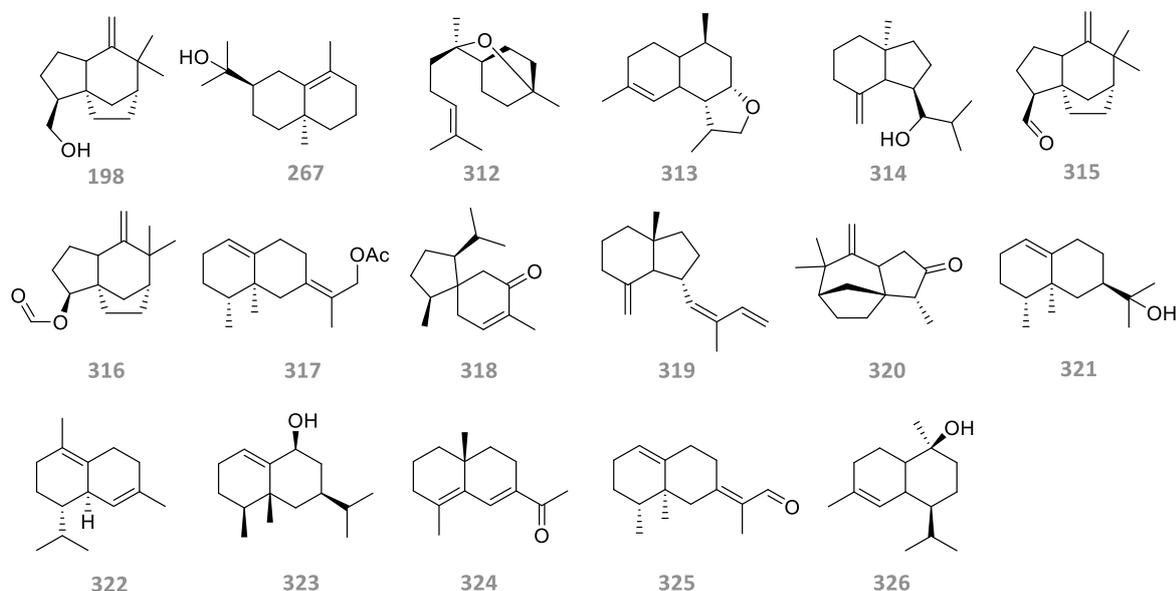


Abbildung 129: In den Fraktionen 2-10 des Vetiver Öl Haiti nachgewiesenen Verbindungen **267** sowie **316-327**, die durch die HPOD-induzierte Cooxidation abgebaut wurden und somit als Cosubstrate für das LOX-HPOD-System agieren: Khusimol (**318**), 10-*epi*- γ -Eudesmol (**267**), Sesquicineol (**312**), Brachyloxid (**313**), (*E*)-4,9-Dracunculifoliol (**314**), Khusimal (**315**), Khusimylformiat (**316**), *iso*-Vetiverylacetat (**317**), Acorenon (**318**), 4(15),10-Oppositadien-12-al (**319**), *iso*-Zizanone (**320**), Valerianol (**321**).

Des Weiteren wurden für die Fraktionen 2-10 des Vetiver Öl Haiti einige der detektierten Cooxidationsprodukte mittels GC-MS Analyse qualitativ bestimmt. So zeigte sich anhand der Detektion des Khusimon (**199**), dass es sich bei **199** um das Oxidationsprodukt des Khusimol (**198**) handelt (**Abbildung 130, A**). Die Produkte 12-*nor*-Eudesm-6-en-11-on (**257**) und *iso*-Valencenal

(**325**) zeigten in ausgewählten Fraktionen entweder eine Zu- oder Abnahme der Flächenprozent, sodass diese Verbindung in Analogie zu den Sesquiterpenen *noriso*-Valencenon (**307**) und Nootkatol (**195**, **227**) einerseits als Cosubstrat fungieren und andererseits als Cooxidationsprodukte gebildet wurden (**Abbildung 130, B**). Zudem wurden auch bei der HPOD-induzierten Cooxidation des Vetiver Öl Haiti die Produkte Kessan (**278**), γ -Eudesmol (**286**), Hedycrayol (**287**) und β -Eudesmol (**290**) nachgewiesen. Als weitere Produkte konnten die Verbindungen **327-332** identifiziert werden (**Abbildung 130, C**).

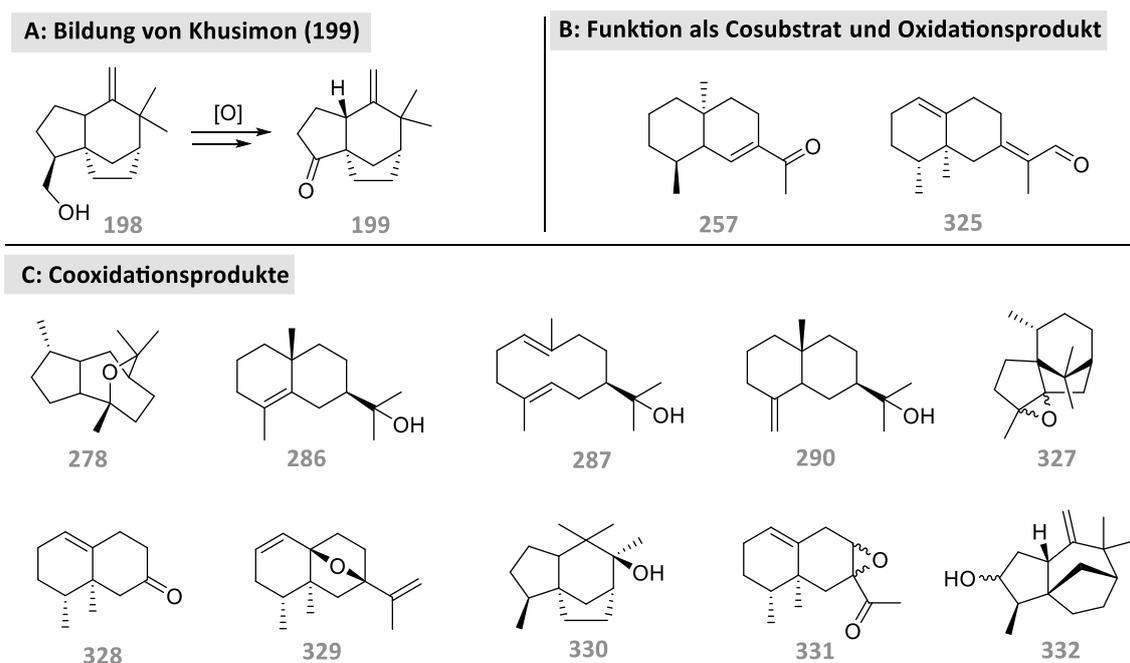


Abbildung 130: A: Cooxidation von Khusimol (**198**) zu Khusimon (**199**). B: Verbindungen 12-*nor*-Eudesm-6-en-11-on (**257**) und *iso*-Valencenal (**325**). C: Weitere über GC-MS nachgewiesene Terpene: Cyprenepoxid (**327**), 1,10-dimethyl-6-bicyclo[4.4.0]-decen-3-on (**328**), Nootkatenether (**329**), Tricyclovetivenol (**330**), 3-Acetyl-1,10-dimethyl-3,4-epoxy-6-bicyclo[4.4.0]decen (**331**) und Zizanol (**332**).

Die über die Fraktionen ermittelte Produktzusammensetzung konnte ebenfalls bei der HPOD-induzierten Cooxidation des reinen etherischen Öls Vetiver Öl Haiti beobachtet werden.⁵⁷ Durch die Fraktionierung war es allerdings möglich aussagekräftigere Umsetzungen zu erzielen, da Nebenkomponenten in angereicherter Form vorlagen. Ferner wurde die Auswertung durch eine geringere Coelution maßgeblich erleichtert.

⁵⁷ Eine tabellarische Übersicht der prozentualen Veränderung der detektierten Verbindungen kann unter Kap. 11.2.6 eingesehen werden.

7.5 Cooxidation von (+)-Valencen (3) im semi-präparativen Maßstab

Nach erfolgreicher Umsetzung der Testsubstrate und etherischen Öle im analytischen Maßstab wurden anschließend semi-präparative Cooxidationen durchgeführt, mit dem Ziel unbekannte Oxidationsprodukte zu isolieren und deren Struktur aufzuklären.

7.5.1 Vorarbeiten für die semi-präparative Umsetzungen

Vor der eigentlichen semi-präparativen Umsetzung wurden zunächst Vorarbeiten durchgeführt, die vor allem darauf abzielten, die maximal zusetzbaren Konzentrationen an Substrat LA und Cosubstrat zu bestimmen. Des Weiteren wurden alternative Lösungsvermittler getestet, da Aceton in Gegenwart von Hydroperoxiden zu explosionsfähigen zyklischen Acetonperoxiden umgesetzt werden kann.^[352]

Anstelle von Aceton wurden daher Umsetzungen unter Zusatz von Methanol bzw. Acetonitril durchgeführt. Als Testsubstrat für die Cooxidationen wurde abermals (+)-Valencen (3) eingesetzt. Mit beiden Lösungsmitteln konnte eine vergleichbare Löslichkeit des eingesetzten Cosubstrats erzielt werden. Mit Methanol als Lösungsvermittler konnten die höchsten Ausbeuten an Nootkaton (194) mit einem Anteil von 15.0 % [v/v] Methanol erreicht werden, während mit Acetonitril die höchsten Umsatzraten in einem Bereich von 5.0 - 10.0 % [v/v] Acetonitril erzielt wurden. Die prozentualen Flächenanteile der gebildeten Produkte war mit der auf Acetonbasis durchgeführten Cooxidation vergleichbar. Ein Vergleich der Produktspektren mit den unterschiedlichen Lösemitteln offenbarte, dass mit Methanol als Lösungsvermittler zwei zusätzliche Verbindungen gebildet wurden. Durch einen massenspektrometrischen Abgleich wurden die Verbindungen als *endo*- und *exo*-Nootkatolmethylether (333) identifiziert, die sich ausgehend von den Stereoisomeren des Nootkatol (195, 227) und unter den leicht acidischen Bedingungen des Enzymtests gebildet haben (Abbildung 131). Das eingesetzte Methanol verhält sich demzufolge nicht inert gegenüber den gebildeten Oxidationsprodukten, sodass es als potenzieller Lösungsmittlersatz ausscheidet. Mit Acetonitril wurden keine zusätzlichen Produktbildungen beobachtet, sodass von einer Inertheit des Lösungsmittels gegenüber der Cosubstrate und Oxidationsprodukte ausgegangen werden kann.

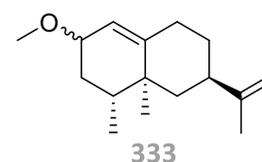


Abbildung 131: Nootkatol-methylether (333).

Weiterhin wurden die optimalen Konzentrationen an Substrat LA und Cosubstrat ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die höchsten Flächenprozentage an Nootkaton (194) mit 2.4 mM Substrat LA und 1.2 mM Cosubstrat erhalten wurden. Höhere Konzentrationen an Substrat und Cosubstrat sorgten hingegen für die Bildung einer Emulsion und zu verringerten Produktanteilen. Auch eine weitere Steigerung des Acetonitril-Anteils führte zu

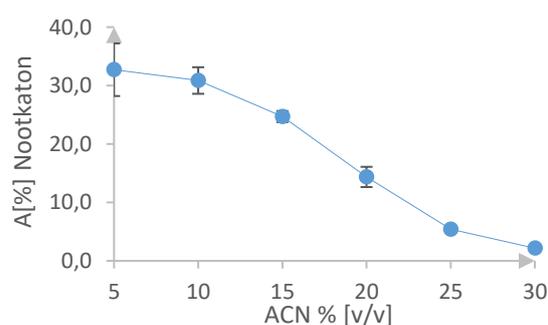


Abbildung 132: Verlauf der Nootkatonbildung (194) bei unterschiedlichen ACN-Volumenanteilen.

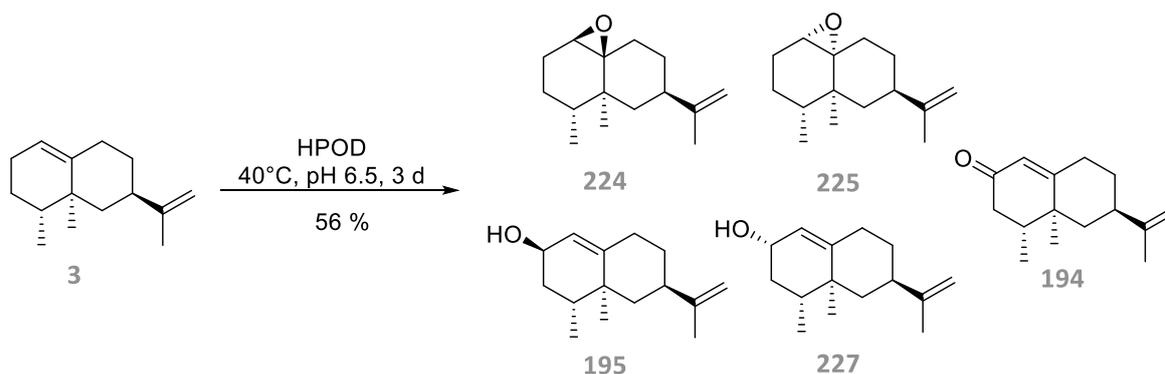
keiner gesteigerten Oxidationsrate, da die gebildeten HPOD inaktive in organischen Lösemitteln sind (**Abbildung 132**).^[274] Hinsichtlich der LOX-Aktivität konnte ein Optimum bei 400 U für die Bildung des Nootkatons (**195**) festgestellt werden.

7.5.2 Semi-präparative Cooxidation von (+)-Valencen (**3**)

Anhand der ermittelten optimalen Bedingungen wurden anschließend zwei semi-präparative Umsetzungen mit (+)-Valencen (**3**) als Cosubstrat durchgeführt, wobei einer als einstufiger und ein weiterer als zweistufiger Prozess durchgeführt wurde. Bei Letzterem wurden zunächst die HPOD unter optimalen Bedingungen bei pH 9.0 gebildet. Diese wurden anschließend in einem zweiten Schritt mit dem Cosubstrat **3** umgesetzt (s. Kap. 11.2.8). Ein Vergleich der prozentualen Flächenanteile des eingesetzten Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) und dem entstandenen Hauptprodukt Nootkaton (**194**) zeigte, dass durch den zweistufigen Prozess eine höhere Umsetzungsrate erzielt wurde (**Tabelle 48**). Daher bietet sich im Gegensatz zu den analytischen Enzymtests bei der semi-präparativen Umsetzung ein zweistufiger Prozess an. Durch die Anwendung eines zweistufigen Prozesses kann weiterhin sowohl die Bildung der HPOD als auch die anschließende HPOD-induzierte Cooxidation unter optimalen Bedingungen erfolgen. Die Cooxidation des Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) mit den durch LOX-Katalyse gebildeten HPOD lieferte ein hellgelbes Öl. Bei Anwendung eines zweistufigen Prozesses wurde eine Rohproduktausbeute von 56 % erzielt (**Schema 42**).

Tabelle 48: Prozentuale Flächenanteile an **3** und **194** nach HPOD-induzierter Oxidation und Verwendung eines einstufigen bzw. zweistufigen Prozesses.

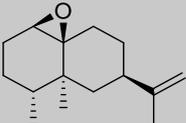
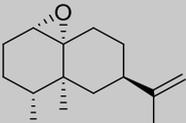
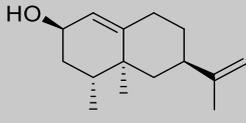
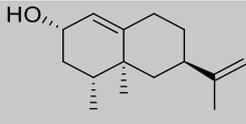
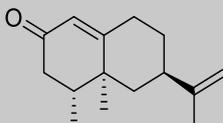
	(+)-Valencen (3)	Nootkaton (194)
einstufig	21.1 %	14.1 %
zweistufig	4.9 %	19.4 %



Schema 42: HPOD-induzierte Cooxidation von (+)-Valencen (**3**) zu den Produkten **194**, **195**, **224**, **225** und **227**.

Durch eine chromatographische Analyse wurden anschließend die Reinheiten der Verbindungen **194**, **195**, **224**, **225** und **227** ermittelt (**Tabelle 49**). Die ebenfalls gebildeten Produkte Aristol-1(10)-en-12-ol (**226**) und β -Cyperon (**228**) wurden im Rahmen der semi-präparativen Umsetzung nicht näher betrachtet, da die Produkte nicht dem Edukt (+)-Valencen (**3**) zugeordnet werden. Zudem wurden die Verbindungen **226** und **228** bereits durch eine massenspektrometrische Analyse qualitativ nachgewiesen.

Tabelle 49: Chromatographische und massenspektrometrische Charakterisierung der Oxidationsprodukte des (+)-Valencens (**3**). Zusätzlich erfolgte eine GC-Olfaktometrie zur Bestimmung des sensorischen Profils.

 (224)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pGC}
	1653	1974	5.5	80.6
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	202.1718 [M-H ₂ O] ⁺	kein sensorisches Profil	
 (225)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pGC}
	1671	2004	2.7	78.1
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	202.1722 [M-H ₂ O] ⁺	kein sensorisches Profil	
 (195)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pGC}
	1738	2373	16.5	62.9
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	202.1725 [M-H ₂ O] ⁺	citrisch, frisch	
 (227)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pGC}
	1755	2439	7.5	69.0
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	202.1718 [M-H ₂ O] ⁺	citrisch	
 (194)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pGC}
	1857	2508	19.8	92.1
	HR-GCMS		GC-Olfaktometrie	
	gefunden:	218.1669 [M] ⁺	fruchtig, grapefruitartig	

Aufgrund der teils geringeren Flächenprozentage der Oxidationsprodukte wurde eine pGC mit polarer Trennsäule zur Isolierung der Verbindungen **194**, **195**, **224**, **225** und **227** durchgeführt. Durch die pGC konnten die Reinheiten der Verbindungen auf 62.9 - 92.1 % gesteigert werden, sodass eine Strukturaufklärung der Verbindungen gewährleistet wurde. In der **Abbildung 133** ist eine Überlagerung der Cooxidation des (+)-Valencens (**3**) mit den fünf Fraktionen der pGC abgebildet. Es ist deutlich erkennbar, dass eine erfolgreiche Isolierung der Verbindungen **194**, **195**, **224**, **225** und **227** stattgefunden hat.

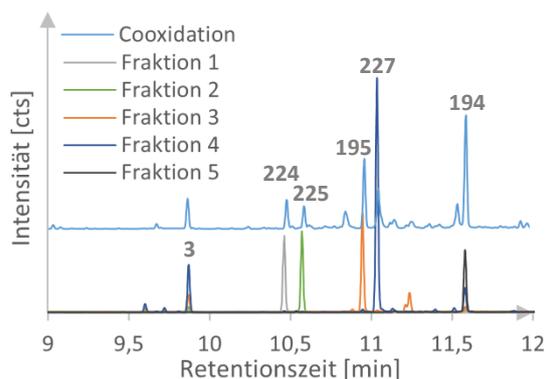


Abbildung 133: Überlagerung der Cooxidation von **3** mit den isolierten pGC-Fraktionen auf einer DB-5 Trennsäule.

Anhand des Molpeaks von m/z 220 ergibt sich für die Verbindungen **195**, **224**, **225** und **227** ein DBÄ von vier. Für die Verbindung **194** beläuft sich das DBÄ hingegen auf fünf. Für die Verbindungen **224** und **225** konnten anhand der chemischen Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwei olefinische Protonen identifiziert werden, die einer *exo*-zyklischen Methylengruppe angehören. Die *exo*-zyklische Methylengruppe ist Teil einer *iso*-Propenylgruppe, aufgrund einer charakteristischen $^3\text{J}(\text{C,H})$ -Kopplung mit der ebenfalls an dem quartären Kohlenstoff (C-11) gebundenen Methylgruppe. Zusätzlich konnten anhand des COSY- und HMBC-Spektrum zwei weitere Cyclohexanringschlüsse ermittelt werden, die über die Kohlenstoffatome C-2 und C-7 miteinander verbrückt sind. Das verbliebene DBÄ entfällt auf einen Epoxidring, welcher an die Kohlenstoffatome C-6 und C-7 gebunden ist (**Abbildung 134**). Die Position des Epoxidrings ergibt sich durch eine eindeutige Tieffeldverschiebung von $\delta(^{13}\text{C-6}) = 63.5$ ppm und $\delta(^{13}\text{C-7}) = 63.1$ ppm im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum. Folglich handelt es sich bei den Verbindungen **224** und **225** um Diastereomere, die sich lediglich in der Konfiguration des gebildeten Epoxidrings unterscheiden.

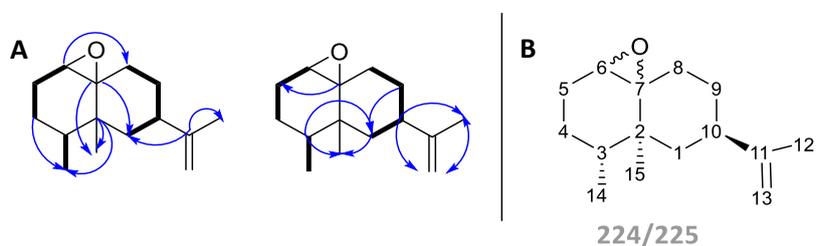


Abbildung 134: Strukturaufklärung der Verbindungen **224** und **225**. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum FPP (**12**).

Die Bestimmung der relativen Stereochemie erfolgte anhand eines NOESY-Experiments sowie der ^1H -Kopplungskonstanten. In der **Abbildung 135** sind die ermittelten relativen Stereochemien der Verbindungen aufgezeigt. Die Konfiguration des Epoxidrings ergibt sich hierbei aus den Magnetisierungstransfers des Protons an C-6. So weist dieses Proton bei der Verbindung **224** eine Wechselwirkung mit dem axial angeordneten Proton H-4 auf, welches seinerseits mit den beiden Methylgruppen 14 und 15 einen Magnetisierungstransfer zeigt. Folglich sollte das Epoxid in die gegensätzliche Richtung wie die Methylgruppen weisen. Bei der Verbindung **225** verhält es sich hingegen entgegengesetzt, sodass die Epoxidgruppe mit den Methylgruppen 14 und 15 in eine Richtung weist. Bei den isolierten Verbindungen handelt es sich um (+)-*cis*-Valencenepoxid (**224**) und (–)-*cis*-Valencenepoxid (**225**). Beide Verbindungen sind bereits literaturbekannt, wurden allerdings noch nicht im Zusammenhang mit der HPOD-induzierten Cooxidation des (+)-Valencens (**3**) isoliert und strukturaufgeklärt.⁵⁸

⁵⁸ MUELLER^[280] beschrieb zwar die Bildung eines Epoxids, konnte allerdings nicht klären ob es sich hierbei um ein Epoxid des Valencens (**3**) oder um 1,8a-epoxy-6-isopropenyl-4,4a-dimethyl-naphthalen handelt.

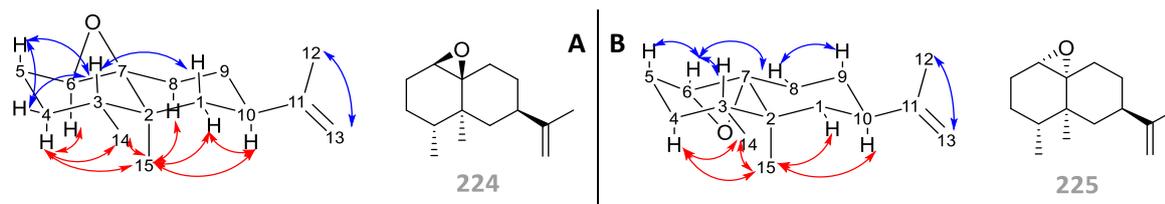


Abbildung 135: A: Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **224**. B: Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **225**.

Für die Verbindungen **195** und **227** konnten drei olefinische Protonen im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum nachgewiesen werden. Mittels HSQC konnten die Protonen einer Methylengruppe und einer CH-Gruppe zugeordnet werden. Anhand der chemischen Verschiebungen im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum zeigte sich, dass die Doppelbindungen jeweils mit einem quartären Kohlenstoffatom ausgebildet werden. Eine der Doppelbindungen konnte zudem als *exo*-Methylgruppe bestätigt werden, bei der es sich in Analogie zum eingesetzten (+)-Valencen (**3**) um einen Bestandteil eines *iso*-Propenylrests handelt, welcher an C-10 gebunden ist. Die beiden verbliebenen DBÄ verteilen sich erneut auf zwei miteinander über C-2 und C-7 verknüpfte Cyclohexanringe. Im Gegensatz zum eingesetzten Cosubstrat weisen die Oxidationsprodukte **195** und **227** zudem eine Hydroxygruppe an C-5 auf, die eindeutig anhand der chemischen Verschiebungen von $\delta(^{13}\text{C})_{195} = 64.2$ ppm und $\delta(^{13}\text{C})_{227} = 67.9$ ppm im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum identifiziert wurde (**Abbildung 136**).

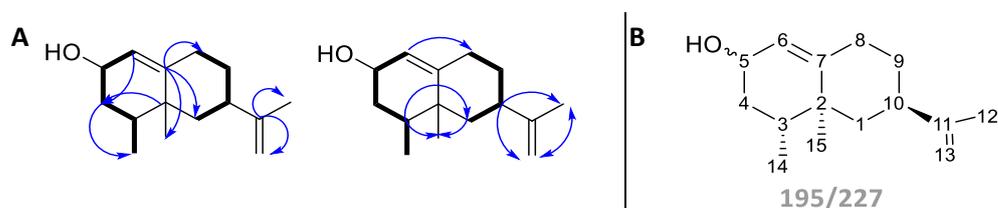


Abbildung 136: Strukturaufklärung der Verbindungen **195** und **227**. A: Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (dick) und Kopplungen im HMBC Spektrum (Pfeile), B: Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum FPP (12).

Die relative Stereochemie der Verbindungen wurde erneut durch NOESY Experimente verifiziert. Aufgrund der vorliegenden Cyclohexanringe nehmen die Ringprotonen alle eine axiale bzw. äquatoriale Positionen ein. Die relative Konfiguration der Hydroxygruppe kann anhand von Magnetisierungstransfers des Protons H-5 ermittelt werden (**Abbildung 137**). Die weiteren stereogenen Zentren des eingesetzten (+)-Valencen (**3**) wurden zudem bestätigt.

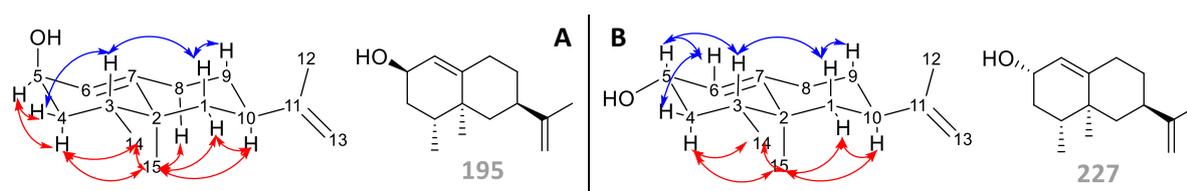


Abbildung 137: A: Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **195**. B: Bestimmung der relativen Stereochemie der Verbindung **227**.

Bei den Alkoholen handelt es sich um die literaturbekannten Verbindungen *exo*-Nootkatol (**195**) und *endo*-Nootkatol (**227**). Die Bildung der Alkohole wurde bereits im Zusammenhang mit der Cooxidation des LOX-HPOD-Systems beschrieben.^[280] Da es sich zudem bei dem eingesetzten Cosubstrat um (+)-Valencen (**3**) handelt und die stereogenen Zentren des Valencen durch die Cooxidation nicht beeinflusst wurden, können diese als stereogener Anker fungieren. Daher sollte es sich bei den ermittelten relativen Stereochemien der Verbindungen **195**, **224**, **225** und **227** um die absoluten Konfigurationen handeln.

Die weitere mittels pGC isolierte Verbindung wurde bereits über Coinjektion und massenspektrometrisch als das Sesquiterpen Nootkaton (**194**) verifiziert. Dies wurde anhand der NMR-Experimente eindeutig bestätigt. Die Ausbildung der Ketofunktion wurde anhand der Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffatoms C-5 von $\delta(^{13}\text{C}) = 197.2$ ppm bestätigt. Das weitere Kohlenstoffgrundgerüst wurde anhand ausgewählter Kopplungen im COSY- und HMBC-Spektrum ermittelt (**Abbildung 138**). Da kein zusätzliches Stereozentrum durch die Cooxidation zum Nootkaton (**194**) ausgebildet wurde, wurde die Stereochemie des (+)-Valencen (**3**) auf das Produkt (+)-Nootkaton (**194**) übertragen.

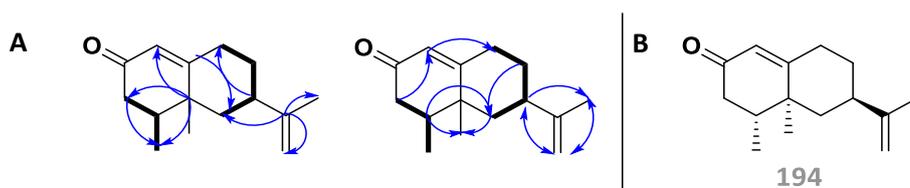


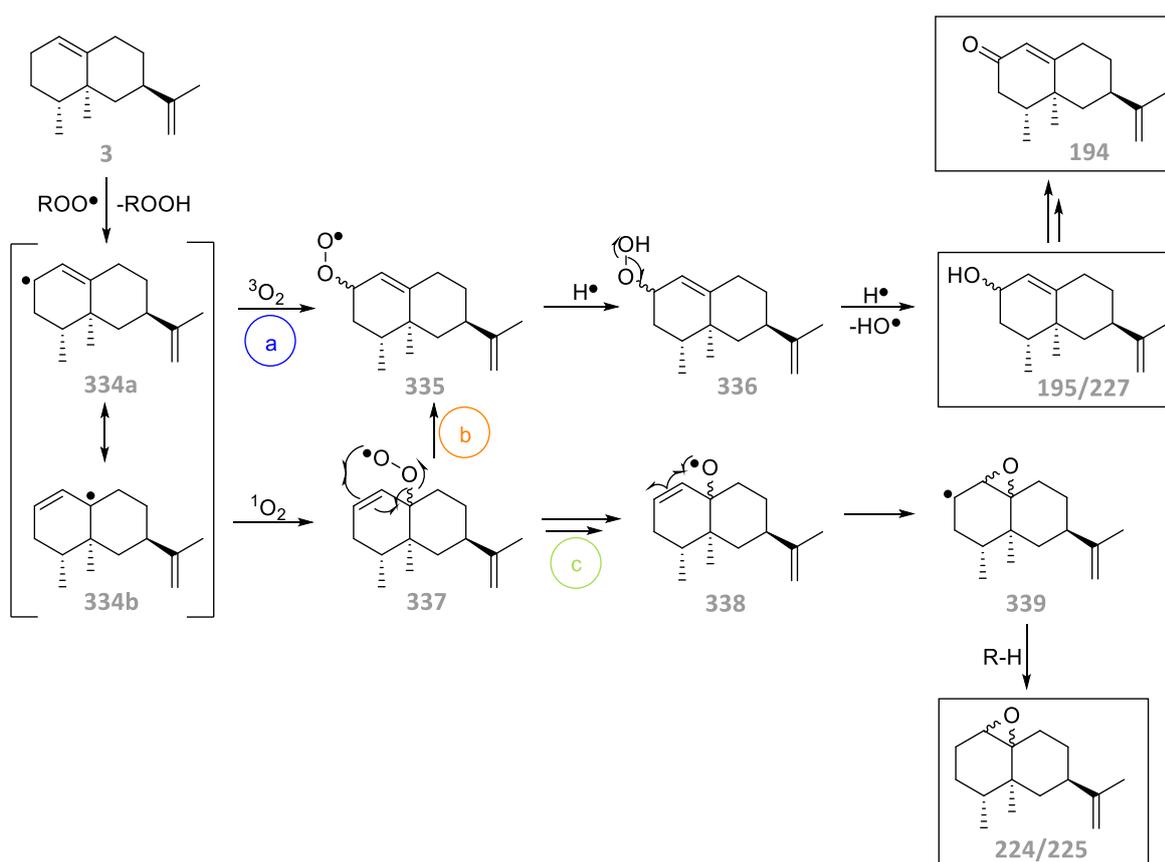
Abbildung 138: Strukturaufklärung der Verbindung **194**. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), **B:** Die absolute Stereochemie wurde von dem eingesetzten Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) übernommen.

Dass bei der Cooxidation sowohl von den Epoxiden als auch den Alkoholen beide möglichen Stereoisomeren gebildet wurden unterstützt einen freien Peroxyradikalmechanismus und bestätigt die vorhergehenden Beobachtungen, wonach das Enzym LOX nicht direkt an der Reaktion beteiligt ist. Eine mögliche Ursache für die prozentual geringeren detektierten Peakflächen der Verbindungen **225** und **227** gegenüber **224** und **195** könnte auf eine sterische Hinderung der Methylgruppen zurückgeführt werden, wodurch die Anlagerung von molekularem Sauerstoff bzw. eines Peroxyradikals von oberhalb der Molekülebene bevorzugt wird.

7.5.3 Postulierter Mechanismus zur Bildung der Produkte **194**, **195**, **224**, **225** und **227**

Die Bildung der Produkte **194**, **195**, **224**, **225** und **227** durch die HPOD-induzierte Cooxidation sollte einem freien Peroxyradikalmechanismus in Gegenwart von Luftsauerstoff unterliegen, da die durch das LOX-HPOD-System ausgelöste Cooxidation die Autoxidation des eingesetzten Cosubstrats (+)-Valencen (**3**) beschleunigt.^[347,349] Anstelle von molekularem Sauerstoff als Radikalstarter könnten die durch die LOX-Katalyse gebildeten Peroxyradikale dienen.^[258,273] Diese könnten entweder durch eine frühzeitige Freisetzung eines Fettsäureradikals aus der aktiven Tasche und Reaktion mit molekularem Sauerstoff oder durch eine homolytische Spaltung der Fettsäure-HPOD gebildet werden.^[242,258,273] Die Radikale initiieren eine allylische Wasserstoffabstraktion am

(+)-Valencen (**3**), wodurch das entstehende Radikal durch Resonanz stabilisiert wird. Die Wasserstoffabstraktion ist hierbei an *endo*-zyklischen Doppelbindungen aufgrund der „zyklischen Aktivierung“ und der damit einhergehenden Reaktivität begünstigt.^[345] Durch die Resonanzstabilisierung kann sich das sekundäre Radikal (**334a**) zum stabileren tertiären Radikal (**334b**) umlagern. In Gegenwart von Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) sollte sich ausgehend von dem weniger stabilen sekundären Radikal das Peroxyradikal **335** bilden, welches anschließend weiter zum Hydroperoxid **336** reagiert (**Schema 43**, Weg a).^[349] Die Anlagerung des molekularen Sauerstoffs könnte sowohl oberhalb als auch unterhalb der Molekülebene erfolgen, sodass es zur Ausbildung von Diastereomeren kommen sollte. Eine homolytische Spaltung des Hydroperoxids **336** unter Freisetzung eines Hydroxyl-Radikals bedingt die Bildung von *exo*- und *endo*-Nootkatol (**195**, **227**). Eine erneute allylische Wasserstoffabstraktion und Reaktion mit molekularem Sauerstoff sollte in Analogie zur Oxidation des Geraniols (**141**) zum Keton Nootkaton (**194**) führen (s. Kap. 11.2.4). Das entstehende sekundäre Radikal würde durch die Hydroxygruppe des Nootkatols (**195,227**) eine zusätzliche Stabilisierung aufgrund induktiver Effekte und Orbitalwechselwirkungen erfahren.^[344,348]



Schema 43: Postulierter Mechanismus zur Bildung der Produkte Nootkaton (**194**) *exo*- und *endo*-Nootkatol (**195**, **227**) sowie (+)- und (-)-*cis*-Valencenepoxid (**224**, **225**) durch die HPOD-induzierte Cooxidation von (+)-Valencen (**3**).

Eine Reaktion des tertiären Radikals **334b** in Gegenwart von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sollte hingegen zur Ausbildung des Peroxyradikals **337** führen.^[347,349] Dieses lagert sich anschließend in einer SCHENCK-Umlagerung zum Derivat **335** um (**Schema 43**, Weg b).^[353] Die SCHENCK-Umlagerung beschreibt eine 2,3-Umlagerung, der vermutlich über einen zyklischen Übergangszustand

verläuft.^[354] Alternativ kann das Peroxyradikal in einer Abbruchreaktion mit einem freien Wasserstoffradikal zu einem Hydroperoxid reagieren (**Schema 43**, Weg c). Dieses könnte anschließend durch eine homolytische Spaltung und unter Freisetzung eines Hydroxyl-Radikals zum Intermediat **338** reagieren.^[141] Das Derivat **338** ermöglicht die Ausbildung des sekundären Radikals **339**, das als Vorläufer für die Ausbildung der *cis*-Valencenepoxide **224** und **225** fungieren könnte. Da die Reaktion unter Lichtausschluss erfolgte, sollte eine Reaktion mit Triplett-Sauerstoff stattgefunden haben. Dass dennoch die *cis*-Valencenepoxide **224** und **225** isoliert wurden, deutet auf eine mögliche Reaktion der Radikale **334a** und **334b** mit den in Lösung vorhandenen Fettsäure-HPOD anstelle von Singulett-Sauerstoff hin.

7.6 Semi-präparative Cooxidation von Fixateur Bois

Bei der Komposition Fixateur Bois handelt es sich um eine von der Symrise AG zur Verfügung gestellte Mischung bestehend aus den Hauptkomponenten Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**). Ferner sind δ -Guajen (**254**) und verschiedenste Eudesmol-Derivate enthalten. Die Komposition weist somit die relevanten Hauptkomponenten des Guajakholzöls auf, sowie jene Verbindungen denen bei der Umsetzung des etherischen Öls bereits eine Akzeptanz als Cosubstrat (s. Kap. 7.4.2) nachgewiesen wurde. Daher wurde für die Cooxidation des Guajakholzöls im semi-präparativen Maßstab als Cosubstrat das Fixateur Bois eingesetzt.

7.6.1 Charakterisierung der Komposition Fixateur Bois

Vor Beginn der semi-präparativen Cooxidation erfolgte zunächst eine Charakterisierung des Fixateur Bois anhand einer GC-MS Analyse auf Trennsäulen unterschiedlicher Polarität (**Abbildung 139**). Für die Analyse auf einer unpolaren Trennsäule wurden insgesamt 51 Verbindungen detektiert, von denen 18 Verbindungen identifiziert wurden. Die bekannten Verbindungen entsprechen einem prozentualen Anteil von 86 % des Fixateur Bois. Mit einer polaren Trennsäule wurden hingegen 74 Verbindungen nachgewiesen, wobei 23 Verbindungen bekannt und 51 Verbindungen unbekannt sind. Auch hierbei zeigte sich, dass die bekannten Verbindungen den Großteil (88 %) des etherischen Öls ausmachen. Als Hauptkomponenten konnten in Analogie zum Guajakholzöl die Verbindungen Guajol (**200**, 26.2 %) und Bulnesol (**201**, 34.5 %) ermittelt werden.

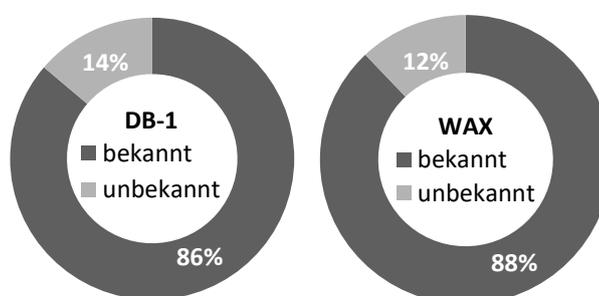


Abbildung 139: Prozentuale Flächenanteile der bekannten und unbekannt identifizierten Verbindungen des Fixateur Bois auf einer unpolaren (DB-1) und polaren (WAX) Trennsäule.

Die ebenfalls im Guajakholzöl enthaltene Verbindung δ -Guajen (**254**) weist einen Anteil von 1.6 % auf. Zudem wurden die Verbindungen α -, β - und γ -Eudesmol (**288**, **290**, **286**) sowie 10-*epi*- γ -Eudesmol (**267**) mit prozentualen Anteilen zwischen 2.0 - 5.7 % bestimmt. Weiterhin wurden die Verbindungen β -Caryophyllen (**24**), Guaioxid (**202**), α -Guajen (**263**), β -Bulnesen (**264**), Selina-4,7-dien (**265**), β -Patchoulen (**271**), 5,11-Epoxyeudesman-1-on (**340**) und Hedycaryol (**287**) ermittelt. Mit der polaren Trennsäule wurden zudem die Verbindungen 5-Guaien-11-ol (**283**), Valerianol (**321**) und Rosifoliol (**341**) nachgewiesen (**Abbildung 140**).

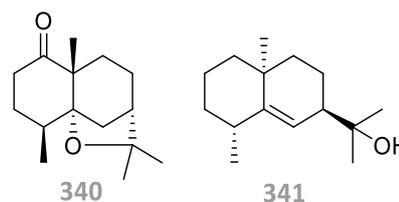


Abbildung 140: Über RIs und MS-Spektren identifizierte Verbindungen **340** und **341**.

7.6.2 Cooxidation von Fixateur Bois im analytischen Maßstab

Vor der Umsetzung im semi-präparativen Maßstab erfolgte zunächst eine Cooxidation mit den HPOD im analytischen Maßstab, wobei ein einstufiger Prozess angewendet wurde. Anhand der **Abbildung 141** wird ersichtlich, dass durch die Cooxidation der prozentuale Gesamtanteil der unbekanntem Verbindungen zunimmt. Ebenso wie bei dem Guajakholzöl hat die HPOD-induzierte Cooxidation zu einem Anstieg an oxidierten Produkten geführt, die sich durch einen erhöhten RI kennzeichnen und Molpeaks von m/z 220, m/z 222, m/z 236 und m/z 238 aufweisen. Ein Vergleich des Ausgangs mit dem Produktspektrum konnte erneut einen deutlichen Verlust der Hauptkomponenten Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**) bestätigen (**Tabelle 50**). Zudem hat δ -Guajen (**254**) durch die Cooxidation einen Verlust erfahren. Als Cooxidationsprodukte wurden Hanamyol (**203**) und δ -Guajenoxid (**277**) identifiziert, wobei Letzteres durch die Epoxidierung von δ -Guajen (**254**) gebildet wird (s. Kap. 7.4.2). Bei Hanamyol (**203**) handelt es sich hingegen um ein Oxidationsprodukt des Bulnesol (**201**).^[297] Weiterhin konnte für einige Eudesmol-Derivate (**286,290**), Guaioxid (**202**), Hedycaryol (**287**) und Rosifoliol (**341**) eine prozentuale Zunahme der Flächenanteile beobachtet werden. Die Oxidationsprodukte **342** und **343** konnten hingegen nicht anhand MS-Spektren und RIs identifiziert werden.

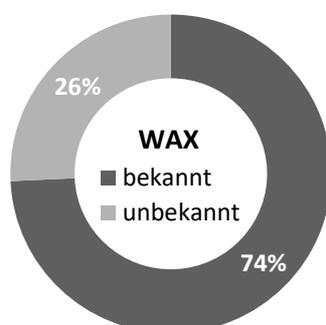


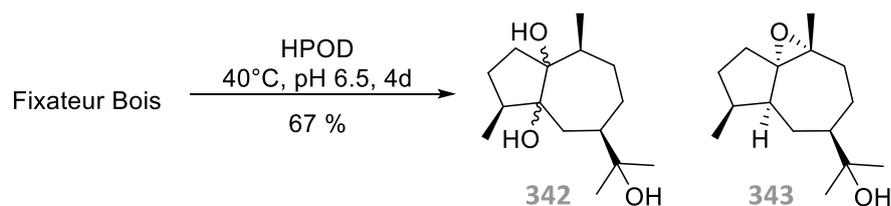
Abbildung 141: Prozentuale Flächenanteile von Fixateur Bois nach erfolgreicher Cooxidation.

Tabelle 50: Veränderungen der prozentualen Flächenanteile durch die Cooxidation mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD. Die Cosubstrate und Oxidationsprodukte sind im Chromatogramm gekennzeichnet. Das Chromatogramm wurde mit einer DB5_{HT}-Säule aufgenommen, weshalb Rosifoliol (**341**) nicht ersichtlich ist. Die Verbindung **341** konnte nur über eine polare WAX Trennsäule eindeutig identifiziert werden. Die unbekannt Produkte **342** und **343** coeluiieren auf der unpolaren Trennsäule.

	RI _{WAX}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}	Chromatogramm
200	2100	26.2	14.5	
201	2225	34.5	19.2	
254	1724	2.0	-	
202	1703	0.6	1.1	
203	2245	2.6	7.8	
277	1941	-	0.9	
286	2179	3.3	4.9	
287	2008	0.8	1.6	
290	2243	4.5	7.8	
341	2133	1.3	2.1	
342	2398	-	4.0	
343	2438	-	5.4	

7.6.3 Semi-präparative Cooxidation

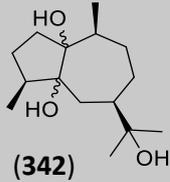
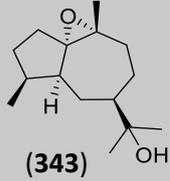
Da die Oxidationsprodukte **342** und **343** nicht anhand der chromatographischen und massenspektrometrischen Analyse identifiziert wurden, erfolgte eine semi-präparative Cooxidation mit der Komposition Fixateur Bois. Es wurde ein hellgelbes Öl in einer Rohproduktausbeute von 67 % erhalten (**Schema 44**).



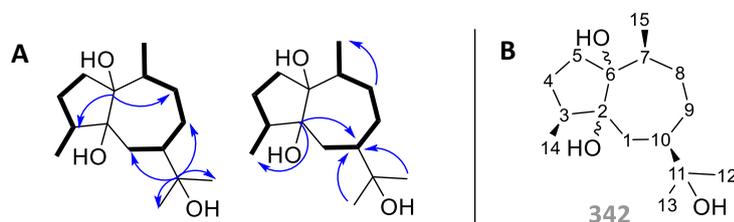
Schema 44: Semi-präparative Cooxidation der Komposition Fixateur Bois mit den durch LOX-Katalyse produzierten HPOD.

Durch GC-MS Analyse wurden anschließend die Reinheiten der Verbindungen **342** und **343** ermittelt. Für die Anreicherung der Verbindungen erfolgte zunächst eine pGC mit unpolarer Trennsäule, wobei **342** und **343** zusammen in einer Fraktion isoliert wurden. Die Reinheiten der Verbindungen konnten dadurch auf 31.0 % (**342**) bzw. 42 % (**343**) erhöht werden. Zur Isolierung wurde anschließend eine pHPLC durchgeführt, wodurch die Verbindungen **342** und **343** getrennt voneinander isoliert wurden. Die Reinheiten wurden durch den zusätzlichen Isolierungsschritt nochmals gesteigert (**Tabelle 51**). Die Strukturaufklärung der Verbindungen **342** und **343** erfolgte mittels NMR-Spektroskopie.

Tabelle 51: Chromatographische und massenspektrometrische Charakterisierung der Verbindungen **342** und **343**. Eine olfaktorische Analyse hat für die Verbindungen nicht stattgefunden.

 (342)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pHPLC}
	1780	2398	4.3	65.0
	HR-GCMS			
	gefunden:	202.1724 [M-H ₂ O] ⁺		
 (343)	RI_{DB5HT}	RI_{WAX}	A[%]_{WAX}	A[%]_{WAX-nach pHPLC}
	1783	2438	5.9	76.0
	HR-GCMS			
	gefunden:	202.1717 [M-H ₂ O] ⁺		

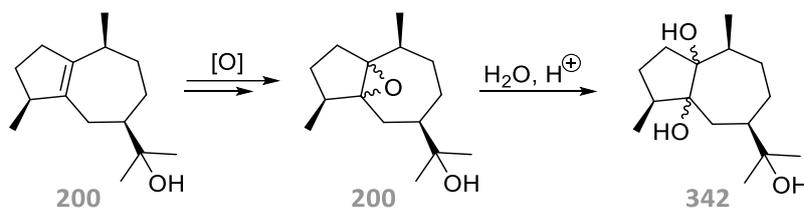
Für die Verbindung **342** wurden anhand des HSQC-Spektrum sowie dem DEPT135-Spektrum drei quartäre Kohlenstoffatome, drei CH-Gruppen, fünf Methylengruppen und vier Methylgruppen ermittelt. Da die drei quartären Kohlenstoffatome im ¹³C-NMR Spektrum charakteristische chemische Verschiebungen im Bereich von $\delta(^{13}\text{C}) = 72.1 - 72.9$ ppm aufweisen, sollten die Kohlenstoffatome jeweils eine Hydroxygruppe tragen. Dies steht zudem im Einklang mit dem Molpeak von m/z 256, sodass sich eine Summenformel von C₁₅H₂₈O₃ und ein DBÄ von zwei ergibt. Da das Molekül keine olefinischen Protonen aufweist und keine für Doppelbindungen typischen tieffeldverschobenen Kohlenstoffatome, sollte die Verbindung über zwei Ringsysteme verfügen. Anhand der übers COSY-Spektrum ermittelten Strukturfragmente und den ^{2,3}J(C,H)-Kopplungen im HMBC-Spektrum konnte die in der **Abbildung 142** ersichtliche Strukturformel bestimmt werden.

**Abbildung 142:** Strukturaufklärung der Verbindung **342**. **A:** Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (dick) und Kopplungen im HMBC Spektrum (Pfeile), **B:** Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum FPP (**12**).

Bei der Verbindung **342** handelt es sich um eine literaturbekannte Verbindung, die aus der Rinde von *Caryodaphnosis tonkinensis* isoliert wurde.^[355] Die stereogenen Zentren an den Positionen C-3, C-5 und C-10 wurden bereits von ANH aufgeklärt.^[355] Durchgeführte NOE-Experimente zur Aufklärung der Stereozentren an C-2 und C-6 lieferten zwar eindeutige Kreuzsignale, eine Interpretation schlug jedoch aufgrund widersprüchlicher Aussagen fehl.

Ein Vergleich mit dem im Fixateur Bois enthaltenen Inhaltsstoffen zeigte, dass die Verbindung **342** ein Oxidationsprodukt der Hauptkomponente Guajol (**200**) sein könnte (**Schema 45**). Aufgrund der sterischen Unzugänglichkeit könnte zunächst eine Epoxidierung der verbrückten Doppelbindung stattgefunden haben. Die Bildung der beiden möglichen stereoisomeren Epoxide (**344**) gelang TISSANDIÉ bereits durch eine chemische Epoxidierung von Guajol (**200**) mit *m*-CPBA.^[297] Ein

nucleophiler Angriff eines Wassermoleküls unter den leicht aciden Bedingungen der Cooxidation könnte zu einer Ringöffnung des Epoxids und zur Bildung von **342** beitragen.



Schema 45: Postulierter Mechanismus für die Bildung der Verbindung **342** ausgehend von dem enthaltenen Guajol (**200**).

Für die Verbindung **343** wurde mittels GC-MS Analyse ein Molpeak von m/z 238 identifiziert. Mittels HSQC und DEPT135 wurden für das Molekül drei quartäre Kohlenstoffatome, drei CH-Gruppen, fünf Methylengruppen und vier Methylgruppen ermittelt, sodass sich zusammen mit dem Molpeak von m/z 238 eine Summenformel von $C_{15}H_{26}O_2$ und ein DBÄ von drei ergeben sollte. Folglich weist das Molekül eine Hydroxygruppe und eine weitere Sauerstofffunktionalität auf. Da das Molekül ebenfalls keine olefinischen Protonen und keine für Doppelbindungen typischen tieffeldverschobenen Kohlenstoffatome enthält, sollte die Verbindung über drei Ringsysteme verfügen. Aufgrund von drei Kohlenstoffatomen mit einer charakteristischen chemischen Verschiebung im Bereich von $\delta(^{13}C) = 62.8 - 75.3$ ppm, jedoch nur zwei Sauerstoffatomen, entfällt ein DBÄ auf einen Epoxidring. Die Strukturformel konnte anschließend durch identifizierte Gerüstfragmente im COSY-Spektrum sowie $^{2,3}J(C,H)$ -Kopplungen im HMBC-Spektrum aufgeklärt werden (**Abbildung 143**).

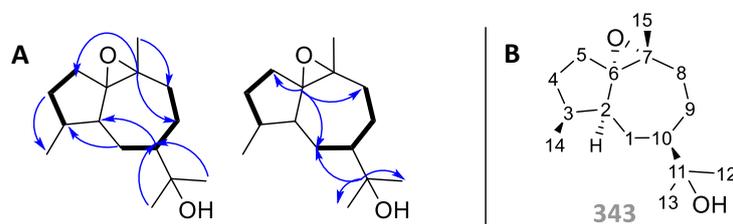
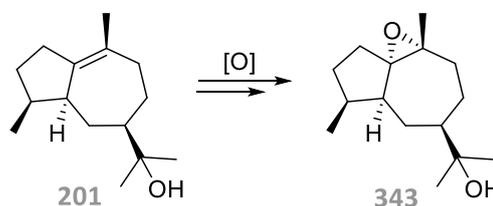


Abbildung 143: Strukturaufklärung der Verbindung **343**. A: Durch das COSY Spektrum identifizierte Gerüstbausteine (**dick**) und Kopplungen im HMBC Spektrum (**Pfeile**), B: Die Nummerierung der Strukturformel erfolgte in Analogie zum FPP (**12**).

Ein Vergleich mit der Literatur zeigte, dass auch die Verbindung **343** literaturbekannt ist und als 1,10-Epoxyguaian-11-ol bezeichnet werden kann.^[297]

Da die NMR-Daten eine Übereinstimmung mit der Literatur aufweisen, wurde auf die Aufnahme eines NOESY-Spektrums verzichtet und die relative Stereochemie übernommen.^[297] Ein Vergleich mit den Inhaltsstoffen des eingesetzten Fixateur Bois



Schema 46: Postulierte Epoxidierung von Bulnesol (**201**) zu dem Produkt 1,10-Epoxyguaian-11-ol (**343**).

zeigte, dass es sich bei 1,10-Epoxyguaian-11-ol (**343**) um das Epoxidierungsprodukt des Bulnesol (**201**) handelt (**Schema 46**). Durch die semi-präparative Cooxidation und Isolierung der Produkte **342** und **343** gelang somit die Identifizierung und Zuordnung von Oxidationsprodukten zu den Hauptkomponenten Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**).

8 Zusammenfassung und Ausblick – Thema II

Durch die Biotransformationen mit der Lipase *Candida rugosa* und der LOX-katalysierten HPOD-Bildung gelang eine erfolgreiche Oxyfunktionalisierung von Terpenen und etherischen Ölen. Dazu wurden zunächst ausgewählte Testsubstrate und etherischen Öle mittels GC-MS Analyse charakterisiert und enthaltene Komponenten identifiziert. Im Falle des Cyclademol konnte gezeigt werden, dass beide Diastereomere als Enantiomerenpaare existieren.

Für die Biotransformationen mit der Lipase *Candida rugosa* konnte ein reproduzierbarer analytischer Enzymtest entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass primäre und sekundäre Alkohole von der Lipase akzeptiert werden, wohingegen die in der Literatur beschriebene Akzeptanz gegenüber tertiären Alkoholen nicht bestätigt wurde.^[220,319] Durch eine Optimierung von Reaktionsparametern konnten die prozentualen Flächenanteile der entstehenden acetylierten Produkte gesteigert werden. Insgesamt wurde dabei eine sinkende Substratazeptanz mit steigendem Substitutionsgrad der Alkohole beobachtet. Durch die Biotransformation mit dem Acyldonor Vinylacetat gelang es, den für die Duft- und Aromaindustrie unbedeutenden Seitenstrom Cyclademol (**209**) in das sensorisch wertvolle Rosamus (**222**) zu überführen, dessen olfaktorisches Profil sich durch rosige, fruchtige und moschusartige Noten auszeichnet. Durch die Verwendung verschiedenster Acyldonatoren könnte in zukünftigen Studien die Einflussnahme auf das sensorische Profil der entstehenden Ester untersucht werden.^[321] Durch Verwendung von Ethylacetat anstelle von Vinylacetat könnte zudem ein natürlicher Prozess etabliert werden. Ein weiteres vielversprechendes Einsatzgebiet der Lipasen stellt die Biotransformation mit etherischen Ölen dar.^[292,305]

Für eine tiefergehende Analyse der Rosamusbildung wurde das Hauptdiastereomer des Cyclademol (**209**) mittels pHPLC isoliert. Dadurch wurde die Zuordnung der gebildeten Rosamusisomere zu den enthaltenen Diastereomeren des Cyclademol ermöglicht. Durch eine chirale GC vor und nach der Biotransformation zeigte sich weiterhin, dass die Lipase unter den gewählten Bedingungen über keine Stereopräferenz zu verfügen scheint. Des Weiteren wurden Studien zur absoluten Stereochemie des Cyclademol (**209**) angestrebt. Dazu wurde eine MOSHER-Ester-Analyse durchgeführt. Durch den MOSHER-Ester konnte ein Effekt der Phenylgruppe auf die Methylgruppen des Cyclademol (**209**) beobachtet werden, sodass nach Differenzbildung für das Hauptenantiomer eine (*S*)-Konfiguration und für das Nebenantiomere eine (*R*)-Konfiguration am Hydroxy-Stereozentrum bestimmt werden konnte. Aufgrund der freien Drehbarkeit des Methylcarbinolrests konnten allerdings keine aussagekräftigen Magnetisierungstransfers in den Cyclohexanring des Cyclademol (**209**) erzielt werden. Durchgeführte quantenmechanische Berechnungen zeigten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen hinsichtlich der thermodynamischen Kenngrößen, sodass zusätzliche Anhaltspunkte zur Bestimmung der absoluten Stereochemie des Cyclademol (**209**) verwehrt blieben. Als weitere Optionen zur Bestimmung der absoluten Stereochemie würden sich daher eine Derivatisierung mit anschließender Röntgenkristallstrukturanalyse oder eine CD-Spektroskopie anbieten.

Für die LOX-katalysierte Cooxidation wurde zunächst die Biotransformation der HPOD-Bildung optimiert. Dazu wurde eine zeitliche Bildungsverfolgung der LA-HPOD bei 234 nm sowie unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen vorgenommen, um die Reaktionsgeschwindigkeiten zu ermitteln. Dabei konnten zwei ausgeprägte Temperaturmaxima identifiziert werden, die in den verschiedenen Isoenzymen der LOX begründet sind. Hinsichtlich des pH-Wertes konnte ein optimaler Bereich oberhalb von pH 8.0 identifiziert werden. Die Wahl der Ionenstärke der verwendeten Puffer scheint hingegen keinen Einfluss auf die HPOD-Bildung zu nehmen. Auch eine Autoxidation der Linolsäure konnte ausgeschlossen werden.

Bei der Optimierung der Cooxidation unter Verwendung eines einstufigen und zweistufigen Prozesses zeigte sich, dass die LOX nicht direkt an der Cooxidation der Cosubstrate beteiligt ist, sondern nur an der Bildung der LA-HPOD. Durch eine chemische Oxidation mit Wasserstoffperoxid konnte nachgewiesen werden, dass ein identisches Produktspektrum erzeugt wurde, weshalb die Cooxidation auf einem freien Peroxyradikalmechanismus beruhen sollte. Im Gegensatz zur LA-HPOD-Bildung wurde zudem eine signifikante Autoxidation beobachtet. Da identische Produkte resultieren, beschleunigt die HPOD-induzierte Cooxidation den autooxidativen Prozess. Durch die Optimierung des cooxidativen Prozesses konnte der Anteil an Autoxidation gesenkt und gleichzeitig der Anteil an HPOD-induzierter Oxidation erhöht werden. Neben (+)-Valencen (**3**) wurden weitere zyklische und offenkettige Mono- und Sesquiterpene als Testsubstrate für die HPOD-induzierte Cooxidation verwendet. Hierbei zeigte sich, dass allylische Oxidationen an *endo*-zyklischen Doppelbindungen bevorzugt stattfinden. Sterisch anspruchsvolle Cosubstrate unterlagen hingegen einer Epoxidierung anstelle einer allylischen Oxidation. Im Falle von Geraniol (**141**) und (*E,E*)-Farnesol (**96**) wurde eine Oxidation der vorhandenen allylischen Hydroxygruppe beobachtet. Anhand des Cosubstrats Limonen (**192**) zeigte sich eindrucksvoll, dass die HPOD-induzierte Cooxidation nicht enantioselektiv erfolgt. Anschließend wurde das LOX-HPOD-System an zwei etherischen Ölen erprobt. Hierbei konnten eine Vielzahl von Cosubstraten detektiert werden, die durch das Testsystem akzeptiert wurden. Durch die massenspektrometrische Identifizierung der Oxidationsprodukte konnten einzelne Produkte den enthaltenen Cosubstraten zugeordnet werden und postulierte Reaktionsmechanismen zu deren Bildungen formuliert werden. Eine sensorische Betrachtung der transformierten etherische Öle offenbarte eine deutliche Einflussnahme der Cooxidation auf eben diese.

Abschließend wurde der analytische Enzymtest auf einen semi-präparativen Ansatz skaliert. Unbekannte Cooxidationsprodukte des Testsubstrats (+)-Valencen (**3**) wurden isoliert, deren Struktur durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt und postulierte Reaktionsmechanismen formuliert. Die isolierten Produkte offenbarten, dass neben dem duftstoffrelevanten Hauptprodukt (+)-Nootkaton (**194**) auch die Stereoisomere des Nootkatol (**195**, **227**) und des *cis*-Valencenepoxids (**224**, **225**) ausgebildet wurden. Für die semi-präparative Cooxidation des Guajakholzöls wurde auf die Komposition Fixateur Bois zurückgegriffen, welches die Hauptkomponenten des etherischen Öls vereint. Durch die Isolierung und Strukturaufklärung gelang die Identifikation von jeweils einem Oxidationsprodukt der Hauptkomponenten Guajol (**200**) und Bulnesol (**201**).

Das LOX-HPOD-System bietet eine schonende und natürliche Alternative zur chemischen allylischen Oxidation. Weiterhin ermöglicht das System die Bildung von oxyfunktionalisierten Terpenen für die Duft- und Aromaindustrie. Zukünftig könnten weitere etherische Öle und kommerziell verfügbare Terpene mit dem Testsystem umgesetzt werden, um die Diversität und Zugänglichkeit zu weiteren natürlichen und erneuerbaren Terpenoiden zu gewährleisten. Durch die Etablierung von Lipase- und LOX-katalysierten Enzymtests können zudem die unter dem Themenkomplex I erzeugten unnatürlichen Terpenoide eine weitere enzymbasierte Oxyfunktionalisierung erfahren, sofern die Terpenoide über Hydroxy- bzw. olefinische Funktionen verfügen. Dadurch kann die Diversität der erzeugten unnatürlichen Terpenoide durch die Anwendung der Biokatalyse weiter ausgebaut werden.

9 Allgemeiner experimenteller Teil

9.1 Allgemeine Hinweise zu Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien, deren Herkunft nicht explizit beschrieben sind, wurden von den Firmen Merck KGaA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Acros Organics, Honeywell Deutschland AG, New England Biolabs GmbH, TCI Europe, Carl Roth GmbH & Co KG, Applichem GmbH und Fluka AG erworben. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen aus Polypropylen von der Firma Sarstedt AG & Co. KG verwendet. Die Reaktionsgefäße dienten ebenfalls für die analytischen Enzymtests mit den STCn. Für die enzymatischen Umsetzungen mit der Lipase CrL und der LOX wurden GC-Gefäße aus Glas von der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet. Semi-präparative Ansätze wurden ebenfalls in Glasgeräten durchgeführt. Spritzen und Kanülen wurden von der Firma B. Braun Melsungen AG verwendet. Für die analytischen Enzymtests wurde ausschließlich deionisiertes und destilliertes Wasser verwendet. Für die Mutagenesestudien wurde dieses zusätzlich sterilisiert. Reaktionen mit luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Argon-Atmosphäre und Schlenkbedingungen durchgeführt. Die notwendigen Glasgeräte wurden zuvor im Vakuum ausgeheizt. Lösemittel wurden vor Verwendung destilliert. Benötigte wasserfreie Lösemittel wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH oder Merck KGaA bezogen oder aus dem *Solvent Purification System SPS* der Firma M. Braun Inertgas-Systeme GmbH entnommen. Salzlösungen wurden als gesättigte, wässrige Lösungen eingesetzt. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 40 - 63 μm verwendet. Die Elution erfolgte unter leichtem Überdruck mit in analytischer Reinheit bezogenen Lösemitteln oder zuvor destillierten Lösemitteln. Für DC-Kontrollen wurden Aluminiumfolien Alugram® Xtra SIL G UV₂₅₄ von Macherey-Nagel GmbH & Co KG verwendet, wobei die Sichtbarmachung von Substanzen durch UV-Licht ($\lambda_{254\text{nm}}$) oder durch Anfärbereagenzien (KMnO_4 und Anisaldehyd) erfolgte.

9.1.1 Nährmedien und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten

Für das Ansetzen von Nähragar, Kultivierungsmedien und Pufferlösungen wurde entionisiertes Wasser verwendet. Agar und Kultivierungsmedien wurden 15 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

Tabelle 52: Zusammensetzung von Kultivierungsmedien und Nähragar.

KULTIVIERUNGSMEDIEN		TRANSFORMATION IN <i>E. COLI</i>	
LB-Medium/ Agar		SOC-Medium	
Hefeextrakt	0.5 % [m/v]	Hefeextrakt	2.0 % [m/v]
Trypton/Pepton	1.0 % [m/v]	Trypton/Pepton	0.5 % [m/v]
NaCl	0.5 % [m/v]	NaCl	0.06 % [m/v]
ggf. Agar	1.5 % [m/v]	KCl	0.02 % [m/v]
2TY-Medium		<i>Autoklavieren und Zugabe von:</i>	
Hefeextrakt	1.0 % [m/v]	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mM
Trypton/Pepton	1.6 % [m/v]	Glucose	1.0 % [m/v]
NaCl	0.5 % [m/v]		

Tabelle 53: Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten.

SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE		AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	
Lämmli-Mix		50x TAE-Puffer	
TRIS-HCl (pH 6.8) ^A	150 mM	TRIS-Acetat	2.0 M
SDS	6.0 % [m/v]	EDTA	5.0 mM
Glycerin	30.0 % [v/v]	<i>pH 8.0 mit 1M NaOH</i>	
Bromphenolblau	0.02 % [m/v]	6x Ladepuffer	
Lämmli-Puffer		Bromphenolblau	15.0 % [m/v]
Lämmli-Mix	80.0 [v/v]	Xylencyanol FF	15.0 % [m/v]
DTT	100 mM	Glycerin	3.0 % [v/v]
SDS	1.0 % [m/v]	PROTEINREINIGUNG	
10x-SDS-Ladepuffer		Lysispuffer	
Glycerin	1.92 M	TRIS-HCl ^A	40 mM
TRIS-Base	0.25 M	NaCl	100 mM
SDS	1.0 % [m/v]	<i>pH 8.0 mit 1M NaOH</i>	
Färbelösung		Waschpuffer	
Isopropanol	25 % [v/v]	TRIS-HCl ^A	40 mM
Essigsäure	10 % [v/v]	NaOH	100 mM
Coomassie Brilliant Blue P250	0.1 % [m/v]	Imidazol	25 mM
Entfärbelösung		<i>pH 8.0 mit 1M NaOH</i>	
Isopropanol	25 % [v/v]	Elutionspuffer (FPLC)	
Essigsäure	10 % [v/v]	TRIS-HCl ^A	40 mM
		NaCl	100 mM
		Imidazol	500 mM
		<i>pH 8.0 mit 1M HCl</i>	
PUFFER FÜR ENZYMTTESTS			
BcBOT2/ PenA		PenA	
HEPES	50 mM	TRIS-HCl ^A	50 mM
DTT	5 mM	DTT	5 mM
<i>pH 7.5/ 7.0 mit 1M NaOH</i>		<i>pH 8.4 mit 1M NaOH</i>	

^A Vor der pH-Einstellung erfolgte eine Temperierung der Lösungen auf Arbeitstemperatur.

9.2 Analysemethoden

9.2.1 NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Messungen erfolgten mittels den in **Tabelle 54** aufgelisteten NMR-Geräten und angegebenen Frequenzen. ^{13}C -NMR-Experimente wurden als ^1H -Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektren gemessen.

Tabelle 54: Verwendete NMR-Spektrometer für die Strukturaufklärung der Verbindungen.

NMR-Spektrometer	Frequenz ^1H	Frequenz ^{13}C
BRUKER Avance-400	400 MHz	100 MHz
BRUKER Ascend-400	400 MHz	100 MHz
BRUKER DRX-500	500 MHz	125 MHz
BRUKER Ascend-600	600 MHz	151 MHz
BRUKER Avance-III-600	600 MHz	151 MHz

Die NMR-spektroskopischen Experimente erfolgten bei Raumtemperatur in Chloroform- d , Benzol- d_6 sowie DMSO- d_6 .⁵⁹ Im Falle einer Tieftemperaturmessung⁶⁰ wurde Toluol- d_8 als Lösemittel verwendet. Die chemische Verschiebung δ ist in *part per million* (ppm) angegeben und wurde anhand des Lösemittelsignals kalibriert, wobei für ^1H -NMR-spektroskopischen Experimente das durch den Restprotonengehalt erzeugte Signal genutzt wurde (**Tabelle 55**). Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Tabelle 55: Signale in den ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren der verwendeten Lösemittel zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung.^[356]

Lösemittel	^1H -NMR	^{13}C -NMR
Chloroform- d	7.26 ppm	77.2 ppm
Benzol- d_6	7.16 ppm	128.1 ppm
DMSO- d_6	2.50 ppm	39.5 ppm
Toluol- d_8	2.08 ppm	20.4 ppm
	6.97 ppm	125.1 ppm
	7.01 ppm	128.0 ppm
	7.09 ppm	128.9 ppm
		137.5 ppm

⁵⁹ Das verwendete Lösemittel ist bei den NMR-Daten der aufgeklärten Verbindungen angegeben.

⁶⁰ Bei einer durchgeführten Tieftemperaturmessung ist die Temperatur bei den betreffenden Verbindungen angegeben. Ist keine Temperatur hinterlegt, so erfolgte die Messung bei Raumtemperatur.

Multiplizitäten im ^1H -NMR Spektrum wurden wie in **Tabelle 56** ersichtlich abgekürzt. Bei Vorliegen von breiten Signalen wurde diese zusätzlich mit *br* (breit) gekennzeichnet. Die Anzahl der unter einem Signal befindlichen Protonen wurde per Integration bestimmt. Neben den ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden für die Strukturaufklärung neben dem eindimensionalen DEPT135 auch zweidimensionale (H,H)- und (C,H)-Korrelations-experimente durchgeführt, zu denen das COSY, HSQC und HMBC zählen. Zur Ermittlung der relativen Stereochemie wurden neben dem 2D-NOESY Spektrum auch 1D-Kern-OVERHAUSER-Effekte (NOE) bestimmt.

Tabelle 56: Abkürzungen für die Multiplizitäten der ^1H -NMR Signale.

Multiplizität	Abkürzung
Singulett	s
Dublett	d
Triplet	t
Quartett	q
Quintett	p
Multipllett	m

9.2.2 GC-MS und HR-GCMS

Zur Identifizierung von Biotransformationsprodukten und semi-synthetischen Produkten wurde eine GC-MS durchgeführt. Als stationäre Phase wurden polare und unpolare Trennsäulen verwendet. Für die Messungen wurden die Proben in *n*-Hexan oder MtBE gelöst und die Lösung entweder *splitless* oder mit *split* injiziert. Das maximale Injektionsvolumen belief sich auf 1.0 μL . Für die Rechromatographie isolierter Verbindungen wurden die Verbindungen im deuterierten Lösemittel gelöst. Zur Bestimmung der hochaufgelösten Masse wurde ein HR-GCMS ermittelt. Die Injektion erfolgte mittels Autosampler.

Tabelle 57: Geräte-Parameter der GC-MS sowie der HR-GCMS.

	GC-MS_1	GC-MS_2
Hersteller	HEWLETT PACKARD	AGILENT
Gerät	GC: 6890 Series MSD: HP 5973	GC: 7890B MSD: 5977B
Säule	Optima 5 30 m x 0.18 mm i.d. x 0.18 μm	Optima 5HT 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm
Temperaturprogramm	50°C (iso 1min) – 20°C/min – 300°C (iso 6 min)	50°C (iso 1 min) – 20°C/min – 300°C (iso 6.5 min)
Gesamtlaufzeit	20 min	20 min
Trägergas	Helium Flussrate: 15 mL/min	Helium Flussrate: 15 mL/min
Injektor	KAS 4 60°C – 12°C/s – 300 °C	KAS 4 60°C – 12°C/s – 300°C
Split	splitless, split	splitless, split
Injektionsvolumen	1.0 μL	1.0 μL
Ionenquelle	EI, 70 eV	EI, 70 eV
Detektor	FID, MS	FID, MS
Massenspektrometer	Quadrupol (40-500 amu)	Quadrupol (30-650 amu)

Allgemeiner experimenteller Teil

	GC-MS_3	GC-MS_4
Hersteller	AGILENT	AGILENT
Gerät	GC:7890B MSD: 5975C	GC:7890B MSD: 5975C
Säule	Zebtron ZB-FFAP 60 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm	Zebtron ZB-WAX 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm
Temperaturprogramm	50°C – 8°C/min – 230°C (iso 22.5 min)	50°C – 8°C/min – 250°C (iso 10 min)
Gesamtlaufzeit	45 min	35 min
Trägergas	Helium Flussrate: 11.4 mL/min	Helium Flussrate: 11.4 mL/min
Injektor	KAS 4 50°C – 12°C/s – 260°C	KAS 4 50°C – 12°C/s – 250°C
Split	splitless, split	splitless, split
Injektionsvolumen	1 µL	1 µL
Ionenquelle	EI, 70 eV	EI, 70 eV
Detektor	MS, ODP3	MS, ODP3
Massenspektrometer	Quadrupol (35-350 amu)	Quadrupol (33-350 amu)

	GC-MS_5	HR-GCMS
Hersteller	AGILENT	WATERS, AGILENT
Gerät	GC:7890B MSD: 5975C	GC: 6890n (AGILENT) MSD: GCT Premier (WATERS)
Säule	Zebtron ZB-1 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm	Optima 5HT 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm
Temperaturprogramm	50°C (iso 1min) – 8°C/min – 260°C (iso 13.75 min)	50°C (iso 1 min) – 20°C/min – 300°C (iso 6.5 min)
Gesamtlaufzeit	40 min	20 min
Trägergas	Helium Flussrate: 17.7 mL/min	Helium Flussrate: 15 mL/min
Injektor	KAS 4 50°C – 12°C/s – 260 °C	Heißaufgabe 300°C
Split	splitless, split	split 1:40
Injektionsvolumen	1.0 µL	1.0 µL
Ionenquelle	EI, 70 eV	EI, 70 eV
Detektor	MS, ODP3	FID, MS
Massenspektrometer	Quadrupol (35-320 amu)	Quadrupol (20-800 amu)

9.2.3 GC-IR

Für die Messung ausgewählter IR-Spektren wurde eine gekoppelte GC-IR verwendet.

Tabelle 58: Geräte-Parameter der GC-IR zur Aufnahme von IR-Spektren.

GC-IR	
Hersteller	THERMO FISHER
Gerät	NICOLET 6700
Säule	Zebtron ZB-1 60 m x 0.53 mm i.d. x 0.25 µm
Temperaturprogramm	60°C – 4°C/min – 250°C
Trägergas	Helium Flussrate: 10.0 mL/min
IR-Einheit	FT-IR

9.2.4 GC-Olfaktometrie (GC-O)

Die GC-Olfaktometrie-Messungen wurden mit den Geräten GC-MS_3-5 durchgeführt. Dazu wurde die injizierte Probelösung nach chromatographischer Trennung aufgeteilt, sodass neben der Detektion mittels MS eine Überführung der aufgetrennten Probe durch eine Transferlinie (1m x 150 µm, 250°C) zum *Olfactory Detection Port* (ODP3, Gerstel GmbH & Co. KG) erfolgte.

9.2.5 Chirale GC

Zur Überprüfung, es sich bei den gebildeten Biotransformationsprodukten um Enantiomere handelt, wurden chromatographische Untersuchungen mit chiralen Trennsäulen durchgeführt.

Tabelle 59: Geräte-Parameter der verwendeten Chromatographen mit chiraler Trennsäule.

	GC_1	GC_2
Hersteller	AGILENT	AGILENT
Gerät	HP 6890 Series	HP 6890 Series
Säule	I) Hydrodex- β -6-TBDM 25 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m II) Hydrodex- β -PM 50 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m III) Lipodex-G 25 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m	I) heptakis(6- <i>O</i> -TBDMS-2,3-di- <i>O</i> -methyl)- β -CD 25 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m II) Hydrodex- β -6-TBDM 25 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m
Temperaturprogramm	70°C – 2°C/min – 190°C (iso 30 min)	40°C (iso 1 min) – 2°C/min – 180°C (iso 6.5 min)
Gesamtlaufzeit	90 min	90 min
Trägergas	Helium	Helium
Injektor	Heißaufgabe 300°C	Heißaufgabe 300°C
Probenaufgabe	manuell	Autosampler
Split	split 1:10	split 1:5
Injektionsvolumen	1.0 μ L	1.0 μ L
Detektor	FID	FID

9.2.6 MPLC

Zur Fraktionierung der etherischen Öle nach Polarität wurde eine MPLC durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels GC analysiert und entsprechend vereinigt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum (250 mbar, 40°C) bzw. unter N₂-Strom entfernt.

Tabelle 60: Geräte-Parameter der MPLC zur Trennung der etherischen Öle nach Polarität.

MPLC	
Hersteller	BÜCHI
Gerät	Sepacore BÜCHI
Kontrolleinheit	Control Unit C-620
Fraktionssammler	Fraction Collector C-660
Säule	120 g Sepacore Flsh-Cartridge Phase: Normalphase (Silica HP) Partikelgröße: 15-40 µm Maximaldruck: 16 bar maximale Beladung: 10 %
Lösemittel	<i>n</i> -Hexan, MtBE Gradientenelution
Fluss	80 mL/min
Detektor	BÜCHI UV-Photometer C-6640 DEDEX 80 – Sedere LT-ELSD

9.2.7 GC-FID

Zur Kontrolle der mittels MPLC erzeugten Fraktionen wurde eine Flash-Chromatographie sowie für ausgewählte Proben eine GC mit Doppelsäule durchgeführt, um die Chromatogramme der einzelnen Fraktionen mit dem Ausgang zu vergleichen.

Tabelle 61: Geräte-Parameter für die verwendeten GC-Systeme.

	Flash-GC	Doppelsäulen-GC
Hersteller	AGILENT	AGILENT
Gerät	HP 7890A GC-System	HP 7890A GC-System
Säule	Agilent DB-1 20 m x 0.18 mm i.d. x 0.18 µm	I) Agilent DB-1 20 m x 0.18 mm i.d. x 0.18 µm II) Agilent DB-WAX 20 m x 0.18 mm i.d. x 0.18 µm
Temperaturprogramm	60°C – 45°C/min – 300°C (iso 4.5 min)	60°C – 9°C/min – 240°C (iso 25 min)
Gesamtlaufzeit	10 min	45 min
Trägergas	Wasserstoff Flussrate: 1.3 mL/min	Wasserstoff Flussrate: ramped flow (1.3 mL/min – 3.0 mL/min)
Injektor	KAS 4 60°C – 12°C/s – 300°C	KAS 3 80°C – 12°C/s – 250°C
Probenaufgabe	Autosampler	Autosampler
Injektionsvolumen	1.0 µL	1.0 µL
Split	split 1:200	1:70
Detektor	FID	FID

9.2.8 Präparative GC (pGC)

Für die Isolierung der biotransformierten Produkte wurde eine pGC durchgeführt. Dazu wurden eine Probenkonzentration im Bereich von 75 mg/mL – 200 mg/mL angesetzt und für jede Isolierung separat ein Temperaturprogramm entwickelt.

Tabelle 62: Geräte-Parameter der pGC für die Isolierung der biotransformierten Proben aus dem Rohprodukt.

	pGC_1	pGC_2
Hersteller	AGILENT	AGILENT
Gerät	HP 6890 Series	7890A bzw. 7890B GC System
Fraktionssammler	Gerstel PFC	Gerstel PFC
Säule	Zebron ZB-1 30 m x 0.53 mm i.d. x 3.0 µm	Zebron ZB-WAX 30 m x 0.53 mm i.d. x 3.0 µm
Trägergas	Wasserstoff Flussrate: 5 mL/min	Wasserstoff 5 mL/min
Split	Splitless	Splitless
Injektionsvolumen	1.0 µL	1.0 µL
Injektor	Heißaufgabe	Heißaufgabe
Detektor	FID	FID

9.2.9 Präparative HPLC (pHPLC)

Zur Isolierung von temperaturempfindlichen Verbindungen wurde eine pHPLC durchgeführt. Der Elutionsgradient wurde für jede Isolierung separat entwickelt. Die Probenkonzentration wurde in einem Bereich von 75 mg/mL bis 150 mg/mL angesetzt, abhängig von der Schwierigkeit der Trennung und weiteren enthaltenen Verbindungen.

Tabelle 63: Geräte-Parameter der pHPLC zur Isolierung von thermolabilen Verbindungen.

pHPLC	
Hersteller	AGILENT
Gerät	AGILENT 1100
Fraktionssammler	FOXY R1
Säule	Phenomenex Luna Silica Abmessungen: 25 cm x 10 mm Partikelgröße: 5 µm
Lösemittel	<i>n</i> -Hexan, MtBE Gradientenelution Flussrate: 3 mL/min
Injektionsvolumen	50 µL
Detektor	HP UV-Vis-DAD (210 nm)

9.2.10 LC-QToF

Zum Nachweis der gebildeten Hydroperoxide wurde eine LC-MS durchgeführt. Dazu wurden die Proben in MeOH oder Acetonitril gelöst und mittels Autosampler analysiert.

Tabelle 64: Geräte-Parameter der LC mit Quadrupol-Time of Flight Detektoreinheit.

LC-QToF	
Hersteller	WATERS, MICROMASS
Gerät	LC: Acquity UPLC System (WATERS) MS: Q-ToF (MICROMASS)
Säule	WATERS Acquity UPLC BEH C18 Abmessungen: 5 cm x 2.1 mm Partikelgröße: 1.7 µm
Lösemittel	A: Wasser (+ 0.1 % Ameisensäure) B: MeCN oder MeOH Gradientenelution
Injektionsvolumen	5 µL
Detektor	Q-ToF

9.2.11 Geräte, Datenbanken und Software

Tabelle 65: Weitere verwendete Geräte für die molekular- und mikrobiologischen Arbeiten.

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Pipetten	Pipetman P2, P10, P100, P200, P1000	Abimed GmbH/ Gilson
Inkubatoren	Schüttelinkubator Innova 44	New Brunswick Scientific Co.
	Schüttelinkubator Excella E24	New Brunswick Scientific Co.
	Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG
	Heratherm Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugen	Vakuumbzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf AG
	Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf AG
	Tischzentrifuge MiniStar Silverline	VWR International
	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific
Elektrophorese	PerfectBlue Gel System Midi S	Peqlab Biotechnologie GmbH
	Consort Electrophoresis Power Supply E835	Sigma Aldrich Co.
	Consort Electrophoresis Power Supply E833	Sigma Aldrich Co.
	Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad Laboratories
	Gelkammersystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories
	Gelkammersystem ComPhor Mini	Biozym Scientific GmbH
FPLC	ÄKTA pure 25 mit 50 mL Probenschleife, HisTrap FF-Säule und Fraktionssammler F9-R bzw. F9-C	GE Healthcare AB
Photometer	SPECTRAmax Plus ³⁸⁴	Molecular Devices
	Multiskan™ GO Microplate	Thermo Scientific
	DS-11+ Spectrophotometer	DeNovix
	FoodALYT Photometer	Omnilab GmbH & Co. KG
weitere Geräte	pH-Meter pHenomenal 1000L	VWR International
	Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries
	Tischschüttler	Infors AG
	Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories
	Sonoplus HD3100 mit KE76/KE72 Sonotrode	Bandelin electronic GmbH

Die nachfolgenden Datenbanken und Software wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tabelle 66: Verwendete Datenbanken und Software.

Datenbanken	
National Center for Biotechnology Information (NCBI), U. S. National Library of Medicine	
Protein Data Bank (PDB), Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)	
Terpen-Datenbank, Symrise AG	
Software	Verwendungszweck
ChemBioDraw Ultra, Version 19.1.0.8 , CambridgeSoft Corporation/PerkinElmer	Zeichnen von chemischen Strukturen und Plasmiden
I) Topspin, Version 3.2 pl 5, Bruker BioSpin GmbH	Auswertung von NMR-Spektren
II) MestReNova, Version 6.0.2-5475, Mestrelab Research S.L	
MSD ChemStation, Version F.01.03.2357, Agilent Technologies	GCMS Steuerung und Auswertung
Unicorn, Version 6.3, GE Healthcare AB	FPLC Steuerung und Auswertung
PyMOL, Version 1.3, DeLano Scientific, LLC., Schrödinger	Darstellung von Proteinstrukturen
Serial Cloner, Version 2.6.1, Franck Perez, Serial Basic	Virtuelle Klonierungen
I) Lalign, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics	Sequenzalignment
II) Megablast, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), NCBI, U. S. National Library of Medicine	
Compute pI/Mw Tool, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics	Molmassenbestimmung Protein
ProtParam tool, ExPaSy, Swiss Institute of Bioinformatics	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten
Phyre2 (Protein Homology/ analogy Recognition Engine V 2.0)	Proteinmodellierung
QuickChange® Primer Design, Agilent Technologies	Primerdesign
ImageLab, Bio-Rad Laboratories	Geldokumentation
Schrödinger Suite Maestro (Version 2019-2)	Kraftfeldberechnungen
Schrödinger Maestro 9.8 (Version 2014-2)	

10 Experimenteller Teil – Thema I

10.1 Proteinbiochemische Methoden

10.1.1 Heterologe Expression

Für die heterologe Expression wurde zunächst eine Vorkultur, bestehend aus LB-Medium und Kanamycin (50 µg/mL) angesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL einer Kryokultur oder die Zugabe einer Kolonie der transformierten *E.coli* BL21 (DE3)-PenA/BcBOT2-pET28a(+) Stämme. Die Vorkultur wurde anschließend bei 37 °C und 180 U · min⁻¹ über 4 - 5 h inkubiert. Für die folgende Hauptkultur wurden 50 mL eines T2Y-Mediums vorgelegt und mit Kanamycin (50 µg/mL) und 1 mL der Vorkultur versetzt. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ vom 0.3 - 0.8 bei 37°C und 180 U · min⁻¹ inkubiert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte photometrisch mit dem T2Y Medium als Blindwert. Durch Zugabe von 0.5 mM IPTG wurde die Expression der STC-Gene induziert. Die Kulturen wurden anschließend bei 16°C und 180 U · min⁻¹ für 22 - 24 h inkubiert. Nach Beendigung der Expression erfolgt eine Zentrifugation bei 5000 g für 10 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20°C gelagert. Für Kryokulturen zur Stammhaltung von *E. coli* wurden die Vorkulturen mit 30 % [v/v] Glycerin versetzt und diese bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der heterologen Expression wurde jeweils 1 mL der Kultur vor der IPTG Zugabe als Negativkontrolle und nach der Kultivierung abgenommen, zentrifugiert und das Pellet für die Analyse verwendet. Zur Überprüfung der Löslichkeit erfolgten weitere Probennahmen des Zelllysats (50 µL) und des Rückstandes.

10.1.2 Diskontinuierliche denaturierende SDS-Page

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der Proteine ausschließlich anhand der Größe. Dazu werden die Proben vor Beginn der SDS-Page durch Hitzeeinwirkung denaturiert, wobei durch das DTT die Disulfidbrücken gespalten werden und das Protein seine Tertiärstruktur verliert. Durch den Zusatz von SDS wird das Protein gleichmäßig ummantelt, sodass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und alle Proteine eine negative Ladung aufweisen. Gleichzeitig verhindert das SDS eine Aggregation der Proteine. Folglich ist bei der denaturierenden SDS-Page eine Korrelation zwischen Proteingröße und der Laufstrecke der Banden gegeben. Zur Ermittlung der Größe wird ein Längenstandard verwendet. Im Falle der diskontinuierlichen SDS-Page wird vor dem eigentlichen Trenngel ein Sammelgel geschaltet, indem eine Konzentrierung und Vortrennung der Proteine erfolgt, woraus schärfere Banden und eine verkürzte Trennstrecke resultieren.^[114]

Tabelle 67: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele. Die Ansatzberechnung ermöglicht das Gießen von zwei Gelen. APS und TEMED wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugesetzt, um die Polymerisierung zu initiieren. Es wurde zunächst das Trenngel vorgelegt und dieses anschließend mit dem Sammelgel überschichtet.

	15%iges Trenngel (10 mL)	5%iges Sammelgel (5 mL)
30% Acryl-Bisacryl-Mix	5 mL	0.83 mL
1.5 M Tris-Base	2.5 mL (pH 8.8)	0.63 mL (pH 6.8)
SDS	0.1 %	0.05 %
APS	0.1 %	0.05 %
TEMED	4 µL	5 µL

Die SDS-Page Proben wurden zunächst mit jeweils 100 µL Lämmli-Puffer versetzt und 12 min bei 95°C erhitzt. Für die Trennung wurden anschließend das 15 %ige Trenn- und 5 %ige Sammelgel gegossen (**Tabelle 67**). In Letzteres wurde möglichst blasenfrei ein Kamm eingeführt, der zur Ausbildung der Probestaschen diente. Die fertigen Gele wurden anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Für die Trennung wurden die Gele in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer bis zum Eichstrich befüllt. Die Probenkammern wurden anschließend mit 15 µL Probe befüllt und eine weitere Kammer mit 5 µL Längenstandard. Als Größenstandard diente der *Color Prestrained Protein Standard* der Firma New England Biolabs, Inc.. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst für 20 min bei 100 V zur Konzentrierung der Proben in dem Sammelgel. Anschließend erfolgte die Trennung bei 150 V. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald der Lauffrontmarker (Bromphenolblau) das Ende des Gels erreichte. Nach Beendigung wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue eingefärbt und anschließend mit der Entfärbelösung behandelt.

10.1.3 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das erhaltene Pellet aus der heterologen Expression in Lysepuffer (2 mL/ 100 mg Pellet) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Als Sonotroden wurden die Sonden MS72 und KE76 verwendet. Als Amplitude wurde eine Intensität von 40 – 45 % gewählt. Der Aufschluss erfolgte über einen Zeitraum von 10 – 15 min unter Eiskühlung wobei alternierend jeweils 30 sek pausiert wurde. Die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 g und 4°C. Das Zelllysate wurde für die Proteinreinigung verwendet.

10.1.4 Proteinreinigung durch Metallchelatchromatographie

Für die Reinigung kleiner Proteinkonzentrationen (< 15 mg · mL⁻¹) erfolgte die Durchführung mit einer manuellen Säule. Dazu wurden als stationäre Phase wurden 3 mL Protino® Ni-NTA-Agarose in Ethanol von Macherey-Nagel & Co KG verwendet. Die gepackte Säule wurde zunächst mit drei Säulenvolumina (CV) dest. Wasser gewaschen und anschließend mit 5 CV Lysepuffer konditioniert. Das Zelllysate wurde zweimal über die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Das an die Säule gebundene Protein wurde anschließend durch einen diskontinuierlichen Imidazol-Gradienten eluiert. Dazu wurde die Säule zunächst zweimal mit 5 mL eines 25 mM Imidazol-Puffer gewaschen.

Im weiteren Verlauf folgte ein weiterer Waschschrift (5 mL) mit 50 mM Imidazol erfolgte. Die Elution der Proteine erfolgte mit 100 mM, 250 mM und 500 mM Imidazol, wobei jeweils 6 mL verwendet wurden. Von allen Fraktionen wurde der Durchfluss aufgefangen und jeweils 50 µL für eine SDS-Page verwendet. Abschließend wurde die Säule mit 1 M Imidazol-Puffer gespült, um noch gebundenes Protein vollständig zu entfernen. Für die Lagerung der Säule wurde diese zunächst mit 3 CV dest. Wasser gespült und danach in 30 %iger Ethanollösung bei 4°C aufbewahrt.

Als Schnelltest zur qualitativen Überprüfung der Proteinkonzentration wurden 5 µL der gesammelten Fraktionen mit 145 µL einer 1x-Roti-Nanoquat Lösung versetzt und die Konzentration anhand der resultierenden Blaufärbung optisch abgeschätzt.

Die FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) wurde für die Reinigung von mehr als 15 mg/mL Protein angewendet. Als Säule diente eine HisTrap FF-Säule (GE Healthcare AB, 5 mL CV). Die Probenschleife fasst ein Gesamtvolumen von 50 mL. Alle verwendeten Elutions- und Waschpuffer wurden vor der Verwendung durch Ultraschall entgast und mittels 0.45 µm Filter filtriert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in einem 25 mM Imidazol Wasch- und Lysepuffer, um die Bindung unspezifischer Proteine auf der Säule zu minimieren. Nach der Zentrifugation wurde das Lysat zusätzlich über einen 0.45 µm Celluloseacetat-Spritzenfilter filtriert.

Analog der manuellen Vorgehensweise, wurde das System zunächst mit dest. Wasser gespült und anschließend mit einem 25 mM Waschpuffer konditioniert. Nach manueller Aufgabe des Lysats auf die Probenschleife erfolgten die nachfolgende Probenauftragung sowie die Wasch- und Elutionsschritte vollautomatisch. Der Waschvorgang wurde dabei solange durchgeführt, bis die detektierbare Absorption einen Wert < 80 mAU angenommen hat. Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen Gradienten der bis auf eine Maximalkonzentration von 500 mM Imidazol gesteigert wurde (**Tabelle 68**). Mittels Fraktionssammler wurden während des Elutionsprozesses Fraktionen mit einem Volumen vom 1 mL gesammelt. Die Detektion des eluierten Proteins erfolgte spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und analog zur manuellen Proteinreinigung konzentriert, in den für den Enzymtest notwendigen Puffer überführt und die Konzentration ermittelt.

Tabelle 68: Verlauf der kontinuierlichen Imidazolgradienten, welcher sich aus dem Wasch- und Elutionspuffer zusammensetzt. Die graphische Darstellung veranschaulicht den Verlauf der prozentualen Beimischung des Elutionspuffers in Abhängigkeit von dem CV. Ein Säulenvolumen (1 CV) entspricht hierbei einem Volumen von 5 mL. Ablauf: A) Konditionierung B) Probenauftragung C) Waschprozess D) Elution mit kontinuierlicher Imidazolsteigerung bis zu 500 mM E) Waschprozess F) 20%ige Ethanolspülung.

	CV	WP [%]	EP [%]	Fluss [mL/min]	Graphische Darstellung
A	4	100	0	2	
B	$\leq 10^1$	100	0	1	
C	$\leq 10^2$	100	0	2	
D	5	0	100	2	
	1	0	100		
	0.2	100	0		
E	3	100	0	2	
F	3	100 ³	0	2	

¹ Leerung der Probenschleife mit einem Maximalvolumen von 50 mL (10 CV)

² Waschvorgang bis zu einer UV-Absorption < 80 mAU oder mit maximal 10 CV

³ Spülen mit 20%igem Ethanol zur Lagerung der Säule

10.1.5 Konzentrierung und Umpufferung

Zur Konzentrierung der Proteinlösung wurde diese mittels eines Amicon Ultra-15 Zentrifugalfilters von Merck Millipore KGaA mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDA bei 4000 g und 4°C zentrifugiert und auf ein Gesamtvolumen von 0.5 – 1.0 mL eingengt. Das durch die semipermeable Membran gedrungene Filtrat wurde verworfen.

Die Überführung des Proteins in den für den Enzymtest notwendigen Puffer erfolgte auf einer PD-10 Entsalzungssäule mit einem Sephadex G-25 Medium als stationäre Phase (GE Healthcare AB). Dazu wurde die Säule zunächst mit 3 CV dest. Wasser gewaschen und anschließend mit dem gewünschten Enzympuffer konditioniert. Die konzentrierte Proteinprobe wurde auf die Säule aufgetragen und mit 6 mL Enzympuffer eluiert, wobei Fraktionen mit einem Volumen von 1 mL aufgefangen wurden. Zur Regeneration wurde die Säule mit 3 CV dest. Wasser gewaschen und in 20 %iger Ethanollösung bei Raumtemperatur gelagert.

10.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die UV-VIS-Spektroskopie in einer Dreifachbestimmung. Vorteil dieser Methode ist eine geringe Probenmenge eine einfache und schnelle Handhabung sowie eine geringe Störanfälligkeit. Mittels Nanodrop wurde die Konzentration der Proteine basierend auf dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt. Das Probevolumen belief sich auf 1 µL. Der jeweilige Extinktionskoeffizient der Proteine wurde über das ExPASy *ProtParam Tool* ermittelt (**Tabelle 69**).^[116] Hierbei sei anzumerken, dass für die Konzentrationsbestimmung die Extinktionskoeffizienten ohne Disulfidbrücken verwendet wurden.

Tabelle 69: Extinktionskoeffizienten ϵ für BcBOT2 und PenA bei $\lambda = 280$ nm. Die Ermittlung der Extinktionskoeffizienten erfolgte über das ExPASy ProtParam Tool. Disulfidbrücken wurden bei der Ermittlung des Extinktionskoeffizienten nicht miteinbezogen.^[116]

Protein	ϵ ($\lambda_{\text{Abs}} = 280$ nm)
BcBOT2	14.62 (E1%)
PenA	14.08 (E1%)

10.2 Mikrobiologische Methoden

10.2.1 *E. coli* Stämme

Für die durchgeführten Transformationen wurde *Escherichia coli* TOP10 und für die heterologe Expression *Escherichia coli* BL21 (DE3) genutzt (**Tabelle 70**).

Tabelle 70: verwendete *Escherichia coli* Stämme für die Transformationen.

Organismus	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> TOP10 (Invitrogen AG/ Thermo Fisher Scientific, Inc.)	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) (Novagen/ Merck KGaA)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsd S _B (r _B - m _B -) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind 1 sam7 nin5])

10.2.2 Transformation in *E. coli* TOP10 und *E. coli* BL21 (DE3)

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen von *E. coli* TOP10 oder *E. coli* BL21 (DE3) langsam auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μ L PCR-Ansatz oder 100 ng Plasmid-DNA und nach Homogenisierung eine Inkubation von 15 min auf Eis. Nach Ablauf der Inkubationsdauer erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sek und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Es folgte eine Zugabe von 300 μ L eines auf 37°C vorgewärmten SOC Mediums, ehe die Lösung für 30 min bei 37°C und 200 U \cdot min⁻¹ inkubiert wurde. Anschließend wurden mindestens 120 μ L des Transformationsansatzes auf LB Agar gleichmäßig ausgestrichen, die Platten verschossen und bei 37°C im Inkubator über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Agarplatten auf Wachstum überprüft und Platten mit Kolonien in den Kühlschrank zur Zwischenlagerung überführt. Die Kolonien wurden anschließend für Übernachtskulturen verwendet.

10.3 Molekularbiologische Methoden

10.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann ein DNA-Abschnitt mit Hilfe einer DNA-Polymerase *in vitro* stark vervielfältigt werden. Das allgemeine Prinzip der PCR kann dabei in drei Schritte unterteilt werden: Der Denaturierung, bei der die doppelsträngige Ausgangs-DNA bei 95°C getrennt wird, der Anlagerung, bei dem sich die zugesetzten Primer an die komplementären Sequenzen der Ausgangs-DNA anlagern und die Elongation, bei der die DNA-Polymerase sich an das 3'-OH-Ende der Primer anlagert und die Ausgangs-DNA komplementär durch vorhandene dNTP's aufbaut. Letztere findet oftmals bei 72 - 75°C statt.^[114] Die Primer dienen somit als Startpunkt für die DNA-Synthese und stellen der DNA-Polymerase das notwendige 3'-OH-Ende zur Verfügung. Es finden meist 20 - 40 Zyklen aus Denaturierung – Anlagerung –Elongation zur Amplifikation der Ausgangs-DNA statt.^[114]

Gradienten-PCR

Zur Erzeugung der punktmultierten BcBOT2-Mutanten wurde eine Dpnl-Mutagenese durchgeführt, bei der die Mutationsstelle durch die Verwendung von komplementären Primern in das Plasmid eingeführt wurde. Die Primer wurden dabei so konstruiert, dass sich die Mutationsstelle mittig im Primer befand. Da die Primer zueinander komplementär sind, ist die Ausbildung von Primer-Dimeren deutlich erhöht, weshalb eine Gradienten-PCR angewendet wurde. Dazu wurden jeweils acht identische PCR Ansätze hergestellt und diese während der Anlagerung abweichenden Temperaturen zwischen 60°C und 71°C unterworfen. Als Ausgangs-DNA diente das von Oberhauser ligierte BcBOT2-pET28a(+)-Konstrukt. Als DNA-Polymerase wurde die gentechnisch optimierte chimäre PhusionTM-Polymerase gewählt, die neben einer hohen Synthesegeschwindigkeit und Genauigkeit auch über eine 3'→5'Exonukleaseaktivität verfügt, wodurch sie zu den *High-Fidelity*-Polymerasen zählt. Zudem führt sie im Gegensatz zur Taq-Polymerase kein *A-Tailing* durch.^[114]

Die Bestandteile der PCR-Ansätze sind in der nachfolgenden **Tabelle 71** angegeben. Die Komponenten wurden als Mastermix 1 und Mastermix 2 angesetzt, wobei Letzterer die Primer und die DNA-Polymerase enthielt. Zusätzlich erfolgte für jede Mutante die Amplifikation einer Wasserkontrolle (Wasser statt Ausgangs-DNA), um falschpositive Ergebnisse auszuschließen. Die Sequenzen der verwendeten punktmultierten Primer können der **Tabelle 74** in Kapitel 10.3.7 entnommen werden.

Tabelle 71: Bestandteile einer PCR-Probe. Die Proben wurden anhand von Mastermischen (A, B) angesetzt, wodurch größere Pipettierolumina und identische PCR Ansätze für die Gradienten-PCR erreicht wurden. Bei der Konzentration handelt es sich um die Ausgangskonzentration der eingesetzten Komponenten. Die in der Tabelle angegebene Zusammensetzung wurde für die Generierung der Mutanten R373H, R373G, F138V, F138Y und Y211F verwendet.

Komponenten	Konzentration	PCR Probe [μL]
5x HF-Puffer	-	4.0 ^A
dNTPs [mM]	10.0	0.4 ^A
Ausgangs-DNA [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$]	5.4	0.15 ^A
Vorwärts-Primer [μM]	10.0	1.0 ^B
Rückwärts-Primer [μM]	10.0	1.0 ^B
Phusion TM	-	0.2 ^B
DMSO	-	0.5 ^A
Wasser	-	12.7 ^{A,B}
Gesamtvolumen [μL]	-	20.0

^A Mastermix 1; ^B Mastermix 2

In Falle der Mutanten W118Q, T242S, T242N und T282S wurde nach Optimierung des PCR-Ansatzes eine erfolgreiche Amplifikation durch eine Steigerung des DMSO-Anteils auf 3 % sowie durch eine Erhöhung des MgCl_2 -Anteils um 0.5 mM erreicht. Bei der Mutante Y211S konnte eine Amplifikation durch eine Steigerung des MgCl_2 -Anteils um 0.5 mM erzielt werden.

In der nachfolgenden **Tabelle 72** ist das Temperaturprogramm für die Gradienten-PCR zusammengefasst. Dieses wurde für die Erstellung aller zehn Mutanten in gleicherweise angewendet.

Tabelle 72: Temperaturprogramm der PCR sowie Übersicht des verwendeten Gradienten.

	Schritt	Temperatur	Dauer	
	I	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
# 15	→ II	Denaturierung	98°C	10 s
	III	Anlagerung	Gradient	15 s
	IV	Elongation	72°C	30 min
	V	finale Elongation	72°C	10 min

71.0°C
70.2°C
68.8°C
66.7°C
64.2°C
62.2°C
60.8°C
60.0°C

10.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation und zur Separation der Plasmid-DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit einem 0.8 %igen Agarosegel, welchem 10 µL Rotisafe® zugesetzt wurde, in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* von Thermo Fisher Scientific, Inc. verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 5 µL PCR-Ansatz mit 1 µL 6x Ladepuffer vermischt und 5 µL der Mischung in eine Geltasche pipettiert. Nach Auftragung von Proben und Größenstandard erfolgte die Gelelektrophorese bei 100 V über 30 min. Die Bildgebung erfolgte durch Anregung des zugesetzten und in die DNA eingelagerten Fluoreszenz-Farbstoffs mit UV-Licht.

10.3.3 DpnI-Verdau

Erfolgreich amplifizierte PCR-Ansätze wurden vor der Transformation in *E. coli* TOP10 zunächst mit dem Typ II Restriktionsenzym *DpnI* behandelt, um eine Transformation des ebenfalls im PCR Ansatz enthaltenen Ausgangsplasmids zu verhindern. Im Gegensatz zu den neu amplifizierten mutierten Plasmiden, weist die Ausgangs-DNA Methylierungen auf, die von *E. coli* eingeführt wurden. Das Restriktionsenzym erkennt die mit Methylgruppen markierte DNA und schneidet diese an der methylierten G^{m6}ATC Sequenz, während die durch PCR amplifizierten Plasmide erhalten bleiben. Auf den Zusatz weiterer Reagenzien konnte verzichtet werden, da das Restriktionsenzym durch die im PCR-Puffer enthaltenen Mg-Ionen aktiviert wurde.^[114] Für den Verdau wurde den PCR-Ansätzen 0.5 µL *DpnI* zugesetzt und diese für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µL des verdauten PCR-Ansatzes für die Transformation in *E. coli* TOP10 verwendet (s. Kap. 10.2.2).

10.3.4 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierungen wurden die in der nachfolgenden **Tabelle 73** aufgelisteten Lösungen verwendet. Je nach benötigter Menge an isolierter Plasmid-DNA wurde zwischen einer Mini- oder Midipräparation unterschieden.

Tabelle 73: Verwendete Lösungen 1 - 3 für die Plasmidisolierung.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
50 mM Glucose	200 mM NaOH	3M KCH ₃ COO
25 mM Tris-Base	1% [w/v] SDS	
10 mM EDTA		
pH 8.0	-	pH 5.5

Minipräparation

Vor Beginn der Plasmidisolierung wurde eine Übernachtskultur mit Kolonien der Transformation in *E. coli* TOP10 durchgeführt. Dazu wurden 3 mL LB Medium vorgelegt, die $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin zur Selektion enthielt, ehe eine Kolonie hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde über Nacht bei 37°C und $180 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ inkubiert. Anschließend wurden 2 mL der Übernachtskultur bei $11000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ über 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden $200 \mu\text{L}$ der Lösung 1 hinzugegeben, $5 \mu\text{L}$ RNase ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, gekocht) hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Im Anschluss wurden $200 \mu\text{L}$ der Lösung 2 hinzugefügt, die Mischung invertiert und 2 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Mischung mit $200 \mu\text{L}$ der Lösung 3 versetzt, erneut invertiert und anschließend 0.2 mL einer Mischung aus Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1, Carl Roth GmbH & Co. KG) addiert. Nach vorsichtiger Durchmischung erfolgte eine Phasentrennung mittels Zentrifugation bei $13000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und 4°C über eine Dauer von 10 min. Die obere Phase wurde in $350 \mu\text{L}$ Isopropanol gegeben, die Probe erneut invertiert und die Plasmid-DNA über 30 min bei 4°C und $13000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ gefällt. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit $100 \mu\text{L}$ eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und das Pellet bei 30°C für 45 min unter vermindertem Druck getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in $20 \mu\text{L}$ H_2O gelöst und bei -20°C gelagert.

Midipräparation

Für die Produktion der Plasmid-DNA BcBOT2-pET28a(+) wurde eine Übernachtskultur im 50 mL Maßstab angesetzt und mit $100 \mu\text{L}$ der Kryokultur *E. coli* TOP10 BcBOT2-pET28a(+) von OBERHAUSER inokuliert.^[112] Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und $180 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden Kryokulturen ($V = 1 \text{ mL}$) zur Stammhaltung von *E. coli* angefertigt. Die restliche Übernachtskultur wurde bei 5000 g über 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 3.0 mL der Lösung 1 zugegeben, das Pellet resuspendiert, mit $5 \mu\text{L}$ RNase ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, gekocht) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 6.0 mL der Lösung 2 addiert, die Mischung vorsichtig homogenisiert und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 4.5 mL der Lösung 3 hinzugefügt, erneut invertiert und mit 2.0 mL einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1, Carl Roth GmbH & Co. KG) versetzt. Nach Invertierung der Mischung erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation bei 10000 g und 4°C über eine Dauer von 10 min. Die wässrige Phase wurde in 10.5 mL Isopropanol überführt, die Lösung invertiert und die DNA über 30 min bei 10000 g und 4°C gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1.0 mL 70 %igen Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert (2 min, 10000 g , 4°C) und das Pellet für 3.5 h bei 40°C getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 1.0 mL H_2O gelöst und nach Bestimmung der Konzentration bei -20°C gelagert.

10.3.5 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dazu wurde $1 \mu\text{L}$ der Probe aufgetragen und die Konzentration mittels LAMBERT-BEER'schen Gesetz bestimmt. Als Blindwert diente Wasser.

10.3.6 DNA-Sequenzierung

Für die Verifizierung der mutierten BcBOT2-pET28a(+)-Plasmide erfolgte eine externe Sequenzierung durch Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg). Das Ansetzen der Proben erfolgte entsprechend dem Mix2Seq Kit OVERNIGHT (Eurofins Genomics). Die verwendeten Sequenzierungsprimer können der **Tabelle 75** im Kapitel 10.3.7 entnommen werden. Die Auswertung erfolgte durch einen Sequenzvergleich mit dem Wildtyp sowie den Sequenzierungschromatogrammen.

10.3.7 Primersequenzen

In der nachfolgenden **Tabelle 74** sind die komplementären Primer für die ortsspezifische Mutagenese aufgelistet. Die Primersequenzen wurden mit dem Programm QuickChange® Primer Design von Agilent generiert.

Tabelle 74: Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die ortsspezifische Mutagenese mittels PCR unter Nutzung komplementärer Primer. In blau sind die Nukleotide hervorgehoben, durch die die Mutationsstelle in die Plasmid-DNA eingeführt wurde.

	Vorwärtsprimer (5'→3')	Rückwärtsprimer(5'→3')
R373H	CCGACCCAGATAGTGGCCGGTCTGAAAA	TTTTCAGACCCGGCCA ^A CTATCTGGGTCCGG
R373G	CGGACCCAGATAGCCGCCGGTCTGAAAAAC	GTTTTCAGACCCGGCGGCTATCTGGGTCCG
F138V	AAACTGGTCATCGAACAGCACCACCCAGTGGTTCCAATC	GATTGGAACCACTGGGTG ^G TGCTGTTTCGATGACCAGTTT
F138Y	CAAACGGTCATCGAACAGATACACCCAGTGGTTCCAATC	GATTGGAACCACTGGGTG ^A TCTGTTTCGATGACCAGTTTG
Y211S	TAACAGCTGATCGAAGGAGCGCTTGTGCTGGTC	GACCAGCACAAGCGCTCCTTCGATCAGCTGTTA
Y211F	TAACAGCTGATCGAAGAAGCGCTTGTGCTGGTC	GACCAGCACAAGCGCTCCTTCGATCAGCTGTTA
T242S	CACACCAATGGAACCGCGGCGCAGGTC	GACCTGCGCCGCGGTTCCATTGGTGTG
T242N	GGATACACCAATGTTACCGCGGCGCAGG	CCTGCGCCGCGGTAACATTGGTGTGTATCC
T282S	TCGTTACCAGGGACACCAGATCGGCG	CGCCGATCTGGTGTCCCTGGTGAACGA
W118Q	GTGCATCCGGTGCCTGCATACTGGCCAGAAAGCA	TGCTTTCTGGCCAGTATGCAAGGCACCGGATGCAC

Für die Sequenzierung der mutierten Plasmid-DNA wurden die nachfolgenden Primer verwendet. Da die üblich verwendeten T7- und RP-Primer oftmals keine vollständige Sequenzierung der Enzym-DNA ermöglichten, wurden weitere Primer generiert, die mittig in der DNA-Sequenz des Proteins BcBOT2 komplementäre Bindungsstellen aufweisen (**Tabelle 75**).

Tabelle 75: Primersequenzen für die Sequenzierung.

Primer	Sequenz
T7 minus-Primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
RP-Primer	5' CTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
#5248^A	5' AGCGAAAAGCCGAATACCC 3'
#5608^A	5' GTGAAGCAGACCATTGCC 3'
#5864^A	5' TGTATCCTGCCATCAGCC 3'

^A Bindungsposition der Primer an das BcBOT2-pET28a(+)-Konstrukt.

10.4 Methodenvalidierung

10.4.1 Bestimmung des linearen dynamischen Bereichs

Die Bestimmung des linearen dynamischen Bereichs der verwendeten GC-MS erfolgte anhand des Sesquiterpenoids β -Caryophyllen. Dazu wurden zunächst zwei Stammlösungen mit 1398 ppm und 306 ppm angesetzt, aus denen anschließend eine Kalibrierreihe (**Tabelle 76**) erstellt wurde. Die Kalibrierreihe wurde dabei über den kompletten Bereich der Säulenkapazität ausgedehnt. Die Standards wurden in *n*-Hexan angesetzt. Die Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung, wobei die Peakfläche ins Verhältnis zur Standardkonzentration gesetzt wurde. Als Injektionsvolumen wurde 1 μ L splitless gewählt. Zur Identifizierung von möglichen Ausreißern wurden die erhaltenen Daten einem F-Test ($P = 95\%$, $f_1 = 9$, $f_2 = 10$) unterworfen.

Tabelle 76: Kalibrierstandards zur Überprüfung des linearen dynamischen Bereichs.

Standard	ppm	Standard	ppm
1	2.1	7	43.7
2	4.3	8	54.6
3	9.3	9	64.7
4	19.6	10	67.4
5	25.8	11	74.1
6	33.3		

10.4.2 Standardaddition zur Ermittlung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde als Testsubstanz β -Caryophyllen ausgewählt. Auf Grundlage des linearen Ansprechverhaltens der Analysenmethode wurde eine Standardaddition durchgeführt. Hierbei wird die Analytprobe (β -Caryophyllen, 22.1 ppm) mit bekannten Konzentrationen des Analyten (STD 1 - 4) aufgestockt (**Tabelle 77**), wodurch anhand der steigenden Peakfläche Rückschlüsse auf die ursprünglich in der Probe vorhandene Analytmenge gezogen werden können. Anders als bei der herkömmlichen Standardaddition ist die Analytmenge der eingesetzten Probe bekannt. Durch einen Vergleich der tatsächlich eingesetzten und der über Standardaddition ermittelten Analytmenge kann daher die Wiederfindungsrate ermittelt werden. Die Standardaddition wurde in einer Doppelbestimmung mit vier Standards durchgeführt.

Tabelle 77: β -Caryophyllen-Konzentration der Analytprobe (Analyt) sowie der vier aufgestockten Analytstandards (STD 1-4)

	β -Caryophyllen [ppm]
Analyt	22.1 ppm
STD 1	Analyt + 9.2 ppm
STD 2	Analyt + 17.8 ppm
STD 3	Analyt + 29.7 ppm
STD 4	Analyt + 37.1 ppm

10.5 Analytische Enzymtests

Die analytischen *in vitro* Enzymtests zur Aktivitätsbestimmung der STC BcBOT2 und PenA erfolgten in einem 500 μ L Maßstab in einer Dreifachbestimmung. Dazu wurde zunächst der Puffer mit definiertem pH-Wert vorgelegt und anschließend das Enzym und das Substrat zugesetzt. Die Biotransformation wurde durch die Zugabe des Cofaktors und homogenisieren der Reaktionslösung gestartet. Die Reaktionslösungen wurden anschließend bei festgelegter Temperatur über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung durch Zugabe von 100 μ L

n-Hexan und Extraktion für 30 sek. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei $6000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C und 30 sek beschleunigt. Die organische Phase wurde abgenommen, mit einer bekannten Menge des internen Standards (β -Caryophyllen, α -Humulen oder *E,E*-Farnesol) versetzt und mittels GC-MS analysiert. Neben der Dreifachbestimmung wurden für die Aktivitätsbestimmungen zwei Negativkontrollen angesetzt, die entweder ohne Enzym bzw. ohne Substrat inkubiert wurden. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Reaktionsparameter sowie eingesetzten Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor für die Biotransformationen von BcBOT2 und PenA mit dem natürlichen Substrat FPP sowie den unnatürlichen Substraten tabellarisch aufgelistet.

10.5.1 Analytische in-vitro Enzymtests von BcBOT2 und PenA mit FPP (12)

In der nachfolgenden **Tabelle 78** sind die Reaktionsparameter und Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor für die Biotransformationen von BcBOT2 und PenA mit FPP angegeben. Die Assays wurden wie in Kapitel 10.5 beschrieben inkubiert und aufgearbeitet. Als Homogenisationspuffer wurde für BcBOT2 ein 50 mM HEPES Puffer verwendet, während bei PenA ein 50 mM Tris-HCl Puffer genutzt wurde. Beiden Puffern wurde 5 mM DTT zugesetzt, um ein zelltypisches und reduzierendes Millieu zu generieren.^[114] Für die pH-Werteinstellung des Tris-HCl Puffers wurde dieser auf die Inkubationstemperatur des Enzymtests temperiert, da der pH-Wert des Puffers temperaturabhängig ist. Für die Aufarbeitung wurden den Enzymtests und Negativkontrollen 100 μL *n*-Hexan zugesetzt, die Ansätze für 30 Sekunden extrahiert und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und für semi-quantitative Bestimmungen mit internen Standard (ISD) versetzt. Als ISD wurde für beide Enzyme β -Caryophyllen (20 ppm) ausgewählt.

Tabelle 78: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor MgCl_2 für analytische in vitro Enzymtests zur Aktivitätsbestimmung (siehe 3.3). Negativkontrollen wurden ohne Enzym bzw. Substrat umgesetzt.

	t	T	pH	ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl2}
BcBOT2	30 min	37°C	7.5	0 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$	150 μM	0.03 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5 mM
PenA	30 min	37 °C	8.2	0 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$	150 μM	0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5 mM

	PPase	Prot K	Tween®20
BcBOT2	_*	_*	_*
PenA	_*	_*	_*

* Keine Zugabe von PPase, Prot K und Tween®20 im analytischen Maßstab

10.5.2 Analytische in vitro Enzymtests von BcBOT2 und PenA mit unnatürlichen Substraten

Die analytischen *in vitro* Enzymtests für die Umsetzung der STCs mit den unnatürlichen Substraten wurden analog zu der Vorgehensweise mit dem natürlichen Substrat FPP durchgeführt. Als Homogenisationspuffer wurde für BcBOT2 ein 50 mM HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 7.5 verwendet, dem 5 mM DTT zugesetzt wurden. Für die Biotransformation von PenA wurde ein 50 mM HEPES Puffer mit einem pH von 7.0 ausgewählt, der ebenfalls 5 mM DTT enthielt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Enzymtests mit *n*-Hexan extrahiert. Für die semi-

quantitativen Bestimmung wurde ein exaktes Volumen an organischer Phase mit bekannter Menge an ISD versetzt. Die semi-quantitativen Analysen erfolgten in einer Dreifachbestimmung, während die Substratazeptanz unter Zuhilfenahme von Negativkontrollen in einer Doppelbestimmung durchgeführt wurde. In der nachfolgenden **Tabelle 79** sind die Reaktionsparameter sowie die Konzentrationen an unnatürlichem Substrat, Enzym und Cofaktor zusammengefasst.

Tabelle 79: Reaktionsparameter und eingesetzte Konzentrationen für die Biotransformation der STCs BcBOT2 und PenA mit den unnatürlichen Substraten **78** und **109 – 111**.

BcBOT2	t	T	pH	↻	C_{Substrat}	C_{Enzym}	C_{MgCl₂}
78	20 min	37 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
109	20 min	30 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
110	20 min	37 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
111	20 min	30 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	t	T	pH	↻	C_{Substrat}	C_{Enzym}	C_{MgCl₂}
78	20 min	30 °C	7.0	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	10 mM

10.5.3 Optimierungen von BcBOT2 und PenA im analytischen Maßstab und FPP als Substrat

Für die durchgeführten Optimierungen wurden Biotransformationen von BcBOT2 und PenA mit dem natürlichen Substrat FPP durchgeführt. Die Enzymtests wurden analog zu der unter 10.5 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Auf Negativkontrollen wurde verzichtet. Stattdessen wurden für einige Optimierungen Kontrollmessungen durchgeführt, die ohne ein zugesetztes Reagenz umgesetzt wurden. Als ISD wurde erneut β -Caryophyllen zugesetzt. Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung.

Optimierung des Reaktionssystems

Für die Optimierung des Reaktionssystems wurde zunächst ein Einphasensystem (EPS) mit einem Zweiphasensystem (ZPS) verglichen. Dazu wurden Enzymtests wie unter 10.5 beschrieben angesetzt und eine Hälfte vor Inkubationsbeginn mit 100 µL *n*-Hexan überschichtet. Als Puffer wurden ein 50 mM HEPES Puffer (BcBOT2) und ein 50 mM Tris-HCl Puffer (PenA) verwendet, die 5 mM DTT enthielten. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Tris-HCl Puffers wurde der pH-Wert bei der Inkubationstemperatur des Enzymtests eingestellt. Während der Aufarbeitung wurde dem Zweiphasensystem nicht nochmals *n*-Hexan zugesetzt, sondern das System direkt extrahiert. Die Inkubationsbedingungen sind in der nachfolgenden **Tabelle 80** zusammengefasst:

Tabelle 80: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor für die Umsetzung als Ein- und Zweiphasensystem. Bei Letzteren wurden die Enzymtests vor Beginn der Inkubation mit 100 μL *n*-Hexan überschichtet und anschließend analog zu dem Einphasensystem inkubiert, aufgearbeitet und analysiert.

	t	T	pH	ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	15 min	25 °C	7.8	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM

Um den Einfluss von Schütteln auf das Zweiphasensystem zu überprüfen, wurden Enzymtests mit BcBOT2 und FPP wie zuvor beschrieben angesetzt, mit 100 μL *n*-Hexan überschichtet und unter verschiedenen Schüttelfrequenzen inkubiert. Die Frequenzen sowie die Reaktionsparameter und Konzentrationen sind in der **Tabelle 81** hinterlegt:

Tabelle 81: Schüttelfrequenzen und Reaktionsbedingungen für ein Zweiphasensystem. Die Biotransformationen erfolgten ausschließlich mit BcBOT2.

	t	T	pH	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
ω	0 U·min ⁻¹ (Kontrolle) – 50 U·min ⁻¹ – 150 U·min ⁻¹ – 300 U·min ⁻¹ – 650 U·min ⁻¹					

Schüttler, Thermomixer

Zudem wurde der Einfluss von Schütteln für die Biotransformationen der STCs BcBOT2 und PenA für das Einphasensystem überprüft. Dazu erfolgte ein Ansetzen der Enzymtests analog zur allgemeinen Vorgehensweise (siehe 10.5). In der **Tabelle 82** sind die Reaktionsparameter und Konzentrationen der Biotransformationen aufgeführt.

Tabelle 82: Reaktionsparameter und Konzentrationen der durchgeführten Enzymtests für die Bestimmungen des Einflusses von Schütteln auf ein Einphasensystem.

	t	T	pH	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	15 min	25 °C	7.8	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
ω	0 U·min ⁻¹ (Kontrolle) – 300 U·min ⁻¹ – 400 U·min ⁻¹ / 450 U·min ⁻¹ – 600 U·min ⁻¹ – 750 U·min ⁻¹					

BcBOT2, PenA

Optimierung der Aufarbeitung

Für die Optimierung der Aufarbeitung wurde die Extraktion der Enzymtests überprüft. Dazu wurden analytische Enzymtests von BcBOT2 mit FPP durchgeführt und das Extraktionsverhalten des entstehenden PSP bei Nutzung unterschiedlicher Extraktionszeiten und Volumina untersucht. Zudem erfolgte auf Basis des NERNST'schen Verteilungssatzes eine zweimalige Extraktion mit jeweils 100 μL *n*-Hexan (**Tabelle 83**). Als Lösemittel wurde *n*-Hexan ausgewählt, da es über eine geringere Flüchtigkeit als *n*-Pentan verfügt und zudem als Lösemittel für eine gaschromatographische Analyse genutzt werden kann.

Tabelle 83: Optimierung des Extraktionsvorganges anhand der Biotransformation von BcBOT2 mit FPP. Neben unterschiedlichen Extraktionszeiten und Volumina an n-Hexan, wurde eine zweimalige Extraktion mit jeweils 100 μL n-Hexan durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung. Den Assays wurde nach Ablauf der Inkubationsdauer die entsprechenden Volumina an n-Hexan zugesetzt, ehe die Extraktion für eine festgelegte Zeitdauer erfolgte.

	t	T	pH	ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
t_{Extraktion}	30 s und 60 s						
V_{n-Hexan}	100 μL und 200 μL						

Denaturierungstest

Für die Denaturierungstests wurden analytische *in vitro* Enzymtests durchgeführt, denen vor Inkubationsbeginn entweder ein organisches Lösemittel, ein Reagenz oder ein Komplexbildner zugesetzt wurde. Dazu wurde ein 50 mM HEPES Puffer (BcBOT2 und PenA) vorgelegt und das Enzym sowie der Cofaktor zur Aktivierung hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der Denaturierungsreagenzien bzw. des Komplexbildners EDTA und die Homogenisierung der Enzymtests über 30 sek. Erst danach erfolgte die Zugabe des Substrates FPP und der Reaktionsbeginn der Biotransformationen. Zudem wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der keine Zugabe von Denaturierungsreagenzien oder Komplexbildner erfolgte. Das Gesamtvolumen aller Enzymtests belief sich auf 500 μL . Für die Aufarbeitung wurden Enzymtests, ohne organisches Lösemittel als zugesetztes Reagenz, mit 100 μL n-Hexan überschichtet und alle Ansätze für 30 sek extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 6000 U·min⁻¹, 4°C und für 30 sek. Hierbei konnte keine vollständige Phasentrennung für die Enzymtests mit dem Komplexbildner EDTA erzielt werden. Als interner Standard wurde β -Caryophyllen zugesetzt. Um eine Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten und um Ausreißer zu identifizieren, wurde jedes Denaturierungsreagenz in Dreifachbestimmung durchgeführt. In der nachfolgenden **Tabelle 84** sind die Reaktionsparameter und Konzentrationen der Reaktionspartner zusammengefasst. Zudem sind die verwendeten Denaturierungsreagenzien und Komplexbildner hinterlegt. Der Komplexbildner EDTA wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten zugesetzt, da die konditionelle Stabilitätskonstante mit steigendem pH-Wert zunimmt.^[133]

Tabelle 84: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Substrat FPP, Enzym und Cofaktor MgCl₂ für die durchgeführten Denaturierungstests. Von den eingesetzten Denaturierungsreagenzien wurden zunächst Stammlösungen (C_{Stamm}) angesetzt aus denen definierte Volumina (V_{Enzymtest}) zugesetzt wurden, um die gewünschten Konzentrationen im *in vitro* Enzymtest (C_{Enzymtest}) zu erhalten.

	t	T	pH	̈	C_{FPP}	C_{Enzym}	C_{MgCl2}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	30 min	20 °C	7.5	600 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM

	C_{Stamm}	C_{Enzymtest}	V_{Enzymtest}
n-Hexan	-	-	100 μL
n-Pentan	-	-	100 μL
Citronensäure	1 M	100 mM	50 μL
Harnstoff	1 M	100 mM	50 μL
EDTA pH 8.0	100 mM	20 mM	100 μL
EDTA pH 10.0	100 mM	20 mM	100 μL

Optimierung der Reaktionsparameter sowie Konzentrationen an Substrat, Enzym und Cofaktor

Für die Optimierungen der Reaktionsparameter Temperatur, pH-Wert und Reaktionszeit sowie den Konzentrationen an Substrat FPP (**12**), Enzym und Cofaktor MgCl₂ wurden Enzymtests analog der unter 10.5 beschriebenen Vorgehensweise angesetzt und inkubiert. Als Puffer dienten ein 50 mM Puffer (BcBOT2/ PenA) und ein Tris-HCl Puffer (PenA, pH > 8.0) Hierbei wurde der jeweils zu optimierende Parameter variiert, während die restlichen Variablen konstant gehalten wurden. Alle Bestimmungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung. Zur Aufarbeitung wurden den Enzymtests 100 μL *n*-Hexan zugesetzt und die Ansätze 30 Sekunden extrahiert ehe die Phasentrennung durch Zentrifugation erzielt wurde. Definierte Volumina der organischen Phase wurden abgenommen und mit dem ISD β-Caryophyllen für eine semi-quantitative Bestimmung versetzt. Die Auswertung erfolgte durch eine GC-MS Analyse und Vergleich der Peakflächen von Produkt und ISD. In der nachfolgenden **Tabelle 85** sind die zu optimierenden Parameter sowie die jeweils gewählten Optimierungsbereiche aufgeführt. Zudem ist in der **Tabelle 86** eine Übersicht der während der Optimierung gewählten weiteren konstanten Reaktionsparameter und Konzentrationen ersichtlich.

Experimenteller Teil – Thema I

Tabelle 85: Optimierte Parameter, sowie deren Optimierungsbereich und die festgelegten Prüfwerte. Reaktionszeit: t [min], Temperatur: T [°C], pH-Wert: pH, Konzentrationen an Substrat (c_{FPP}), Enzym (c_{Enzym}) und Cofaktor (c_{MgCl_2}). Im Falle der pH-Wert Optimierung sind die für jeden pH-Wert genutzten Puffersysteme hinterlegt.

Parameter	Optimierungsbereich	festgelegte Prüfwerte	
t [min]	2.5 min – 60 min	2.5 – 5 – 7.5 – 10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 40 – 50 – 60 min	
T [°C]	4 °C – 40 °C	4 – 10 – 15/ 16 – 20 – 24/ 25 – 30 – 35/ 36 – 40 °C	
pH	pH 3 – pH 11 ^A	pH 3- 5	0.1 M Citronensäure/ 0.2 M Na ₂ HPO ₄
		pH 6	50 mM MES ^B
		pH 7- 8	50 mM HEPES ^B
		pH 9	50 mM Tris-HCl
		pH 10- 11	50 mM CAPS ^B
c(FPP) [μM]	5 μM – 150 μM	5 μM/ 15 μM	$c_{Stamm} = 1 \text{ mM FPP}^C$
		20 μM/ 35 μM/ 75 μM	$c_{Stamm} = 20 \text{ mM FPP}^C$
		150 μM	$c_{Stamm} = 50 \text{ mM FPP}^C$
c(Enzym) [g·L⁻¹]	0.005 – 0.06 g·L ⁻¹	0.005 – 0.01 – 0.02 – 0.04 – 0.06 g·L ⁻¹	
c(MgCl₂) [mM]	0.5 – 20 mM	0.5 – 1 – 2.5 – 5 – 10 – 20 mM	

Spezifische Messungen, die jeweils für eine der beiden STC durchgeführt worden sind: BcBOT2, PenA

^A Abweichungen bei der pH-Einstellung von ± 0.2 pH-Einheiten. Der pH-Wert des Tris-HCl Puffers wurde bei der Inkubationstemperatur der Enzymtests eingestellt. Die pH-Werteinstellung erfolgte mit 1M NaOH bzw. 1M HCl.

^B GOOD-Puffersysteme

^C Stammlösungen an FPP für die Erstellung der Verdünnungsreihe.

Tabelle 86: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Reaktanden die für die einzelnen Optimierungsschritte verwendet wurden. Der jeweils zu optimierende Parameter ist grau (Spalte) eingefärbt und wurde hinsichtlich der in der Tabelle 85 festgelegten Prüfwerte untersucht.

BcBOT2	t	T	pH	ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
t		24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
T	15 min		7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
pH	15 min	24 °C		0 U·min ⁻¹	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
C_{FPP}	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹		0.005- 0.06 g·L ⁻¹	5 mM
C_{Enzym}	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	5- 150 μM		5 mM
C_{MgCl₂}	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	
PenA	t	T	pH	ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
t		37 °C	8.2	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
T	30 min		7.0	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
pH	30 min	20 °C		600 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
C_{FPP}	30 min	20 °C	7.0	600 U·min ⁻¹		0.01- 0.06 g·L ⁻¹	5 mM
C_{Enzym}	30 min	20 °C	7.0	600 U·min ⁻¹	15- 150 μM		5 mM
C_{MgCl₂}	30 min	20 °C	7.0	600 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	

Biotransformationen zum Einfluss der Alterung des FPP (12)

Zur Überprüfung der Substratstabilität wurden Biotransformationen mit neuem und altem Substrat durchgeführt. Das Ansetzen und die Aufarbeitung der Enzymtests erfolgten analog zu den vorhergehenden Biotransformationen (**Tabelle 87**). Für die semi-quantitative Bestimmung erfolgte erneut der Zusatz von β -Caryophyllen als ISD. Ferner wurde erneut eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 87: Reaktionsparameter und Konzentration an Substrat, Enzym und Cofaktor für die Biotransformation der STCs BcBOT2 und PenA mit unterschiedlich lange gelagertem FPP.

	t	T	pH	$\bar{\omega}$	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μ M	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	15 min	20 °C	7.5	600 U·min ⁻¹	150 μ M	0.01 g·L ⁻¹	5 mM

10.5.4 Weiterführende Optimierungen für semi-präparative Ansätze

Für die semi-präparativen Ansätze wurden weitere Optimierungen durch analytische in vitro Enzymtests durchgeführt, bei denen der Einfluss des Detergenz Tween®20, einer PPase und der Prot K überprüft wurde. Weiterhin erfolgte eine Überprüfung des Einflusses von Schütteln sowie eine Stabilitätsüberprüfung für die STC PenA, da diese in der Literatur bei unterschiedlichen pH-Werten umgesetzt worden ist.^[73–75]

Für die Einflussnahme der Prot K wurden zunächst Enzymtests wie unter 10.5 beschrieben durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden anschließend unterschiedliche Enzymaktivitäten an Prot K (1.5 U und 3.0 U) sowie CaCl₂ zur Vermeidung einer Autolyse zugesetzt und eine erneute Inkubation für 15 bzw. 20 min bei der optimalen Temperatur der STCs bzw. bei 37°C durchgeführt (**Tabelle 88**). Bei Letzterer weist die Prot K ihr Aktivitätsmaximum auf. Erst im Anschluss erfolgte die Aufarbeitung und Überführung der Produkte in die organische Phase sowie die Zugabe des ISD. Als Kontrollmessung wurden Enzymtests ohne den Zusatz an Prot K ebenfalls über die erweiterte Inkubationsdauer und bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Tabelle 88: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Reaktanden für A) die Biotransformation der STCs mit FPP und B) der sich anschließenden Inkubation mit Prot K und CaCl₂.

A.	t	T	pH	$\bar{\omega}$	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl₂}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μ M	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	30 min	20 °C	7.0	600 U·min ⁻¹	150 μ M	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
B. Prot K	t	T	pH	$\bar{\omega}$	C _{CaCl₂}		
BcBOT2	15 min	24°C/ 37°C	7.5	0 U·min ⁻¹	2.5 mM		
PenA	20 min	20°C/ 37°C	7.0	600 U·min ⁻¹	2.5 mM		

Anhand der STC PenA wurde weiterhin der Einfluss einer PPase und von Tween®20 zur Verbesserung der Löslichkeit des eingesetzten Substrates indirekt über die Ausbeute an Pentalenen überprüft (**Tabelle 89**). Dazu wurden den Enzymtests unterschiedliche Enzymaktivitäten an PPase bzw. Volumenanteile an Tween®20 zugesetzt, ehe die Biotransformation durch Zugabe von FPP gestartet wurde. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte analog zu der allgemeinen Vorgehensweise. Ein Enzymtest ohne Detergenz Tween® bzw. PPase diente als Kontrollmessung. Als Puffer wurde ein temperaturunabhängiger 50 mM HEPES mit 5 mM DTT verwendet. Die Biotransformationen erfolgten in einer Dreifachbestimmung.

Tabelle 89: Parameter für die Biotransformation von PenA mit FPP sowie zugesetzte prozentuale Volumenanteile [%] und Enzymaktivitäten [U] an Tween®20 und PPase.

	t	T	pH	Ω	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl2}
PenA	30 min	20 °C	7.0	600 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
PPase	0.2 U, 0.4 U						
Tween®20	0.05 % [v/v], 0.1 % [v/v], 0.2 % [v/v]						

Da die semi-präparativen Ansätze im Schüttler durchgeführt wurden, wurde die optimale Schüttelfrequenz im analytischen Maßstab ermittelt. Dazu wurden in einer Dreifachbestimmung Enzymtests mit unterschiedlichen Schüttelfrequenzen inkubiert (**Tabelle 90**) und anschließend wie beschrieben aufgearbeitet. Die Produktausbeute wurde mittels GC-MS unter Zusatz von ISD bestimmt. Ein Enzymtest ohne Schütteln diente als Kontrollmessung.

Tabelle 90: Parameter und Konzentrationen an Reaktanden für die Biotransformationen von BcBOT2 und PenA zur Ermittlung des Einflusses von Schütteln im Schüttler.

	t	T	pH	C _{FPP}	C _{Enzym}	C _{MgCl2}
BcBOT2	15 min	24 °C	7.5	150 μM	0.02 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	15 min	25 °C	7.8	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
Ω [U·min⁻¹]	50 U·min ⁻¹ – 100/ 150 U·min ⁻¹ – 200/ 250 U·min ⁻¹ – 300 U·min ⁻¹ – 400 U·min ⁻¹					

BcBOT2, PenA

Die Überprüfung der Enzymstabilität von PenA wurde im Hinblick auf pH-Sensitivität und Lagerungsstabilität bei 20°C überprüft. Dazu wurden pH-Werte von pH 7.0, pH 7.5 und pH 8.4 ausgewählt und als Puffersysteme 50 mM HEPES und Tris-HCl verwendet. Für die Lagerungsstabilität wurden Enzymtests ohne Substrat wie unter 10.5 beschrieben angesetzt und diese zunächst über einen definierten Zeitraum (t₂) bei 20°C gelagert. Anschließend wurde die Biotransformation durch Zugabe von FPP initiiert und für 15 min (t₁) inkubiert (**Tabelle 91**). Die Aufarbeitung erfolgte durch einfache Extraktion mit 100 μL *n*-Hexan. Die Enzymtests wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Enzymstabilität anhand der Ausbeute an Pentalenen durch eine semi-quantitative Bestimmung mittels ISD beurteilt.

Tabelle 91: Reaktionsparameter für die Umsetzungen von Biotransformationen der STC PenA mit FPP bei Verwendung verschiedenster pH-Werte und Lagerungsdauern (t_2).

	t_1	T	$\bar{\omega}$	C_{FPP}	C_{Enzym}	C_{MgCl_2}
PenA	15 min	20 °C	0 U·min ⁻¹	150 µM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
pH	pH 7.0	50 mM HEPES ^A , 50 mM Tris-HCl ^{A,B}				
	pH 7.5	50 mM HEPES ^A				
	pH 8.4	50 mM Tris-HCl ^{A,B}				
t_2 [min]	0 min – 15 min – 30 min – 45 min – 60 min – 90 min – 120 min					

^A Die Puffer wurden mit 5 mM DTT versetzt. ^B pH-Werteinstellung bei 20 °C.

10.6 Semi-präparative Biotransformationen mit FPP

Diskontinuierliche Substratzugabe

Für die Biotransformation von BcBOT2 mit FPP (**12**) wurde eine diskontinuierliche Substratzugabe durchgeführt (**Tabelle 92**). Der semi-präparative Ansatz erfolgte in einem Einphasensystem. Dazu wurde zunächst der Puffer, welchem DTT zugesetzt wurde, vorgelegt und Tween®20 sowie PPase hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Enzyms und des Cofaktors. Der Ansatz wurde temperiert und die Biotransformation durch Zugabe von einem Aliquot FPP gestartet. Im Abstand von 15 min wurden weitere Aliquote an FPP zugesetzt. Nach vollständiger Zugabe des Substrates wurde der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert, ehe Prot K und CaCl₂ zum Abbau der STC zugesetzt wurden und der Ansatz erneut inkubiert wurde. Nach Abschluss der Inkubationsdauer wurde der semi-präparative Ansatz mit *n*-Pentan überschichtet, extrahiert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde weitere dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom entfernt.

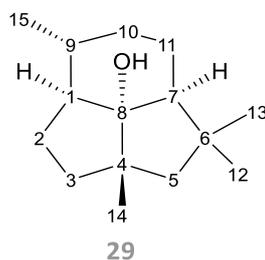
Kontinuierliche Substratzugabe

Für die Biotransformation von PenA mit dem natürlichen Substrat FPP wurde eine kontinuierliche Substratzugabe über eine Spritzenpumpe durchgeführt (**Tabelle 92**). Dazu wurde entsprechend der diskontinuierlichen Zugabe zunächst der Puffer vorgelegt und mit Tween®20 sowie PPase versetzt. Anschließend wurde das Enzym und der Cofaktor hinzugefügt und die Reaktionslösung auf Inkubationstemperatur temperiert. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Biotransformation durch Zugabe eines FPP-Aliquots gestartet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min, wurde die Spritzenpumpe gestartet und das Substrat kontinuierlich (µM/h) dem Ansatz zugefügt. Nach zwei Stunden wurde erneut Protein zugegeben, um eine konstante Enzymaktivität zu gewährleisten. Nach vollständiger Zugabe des Substrates wurde der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert, ehe Prot K und CaCl₂ zugesetzt wurden, um die STC abzubauen. Nach Beendigung des Enzymabbaus wurde der Ansatz mit *n*-Pentan überschichtet und über Nacht extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase weitere dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel zunächst am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend im Stickstoffstrom vollständig entfernt.

Tabelle 92: Ansatzgrößen, Reaktionsbedingungen und zugesetzte Reaktanden für die semi-präparativen Umsetzungen des natürlichen Substrats FPP (12). Weiterhin sind Informationen zur Extraktion sowie zur Ausbeute der Rohprodukte angegeben.

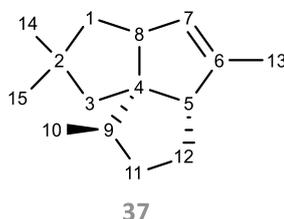
	BcBOT2	PenA
Ansatzgröße		
Inkubationssystem	Einphasensystem	Einphasensystem
Substrat	FPP (12)	FPP (12)
c(Substrat) [mM]	1.5	1.5
Puffer	50 mM HEPES (5 mM DTT)	50 mM Tris-HCl (5 mM DTT)
Gesamtvolumen [mL]	50	48
Startbedingungen		
c(Substrat) [μM]	200	350
c(Enzym) [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	0.5	0.1
c(MgCl_2) [mM]	10	10
Tween[®]20 [% (v/v)]	0.02	0.02
PPase [U]	1	1
Reaktionsbedingungen		
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	24	20
pH	7.5	8.4
τ [$\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$]	100	200
Inkubationsdauer und Substratzugabe		
Art der Zugabe	diskontinuierlich	kontinuierlich
c(Substrat) [μM] - Aliquot	200	-
c(Substrat) [$\mu\text{M}/\text{h}$]	800	700
Inkubationsdauer [h]	3.75	5
Enzymabbau		
Proteinase K [U]	70	75
c(CaCl_2) [mM]	5	5
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	37	20
Inkubationsdauer [h]	0.5	1.0
Extraktion		
Lösemittel	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan
τ [$\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$]	750	160
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	RT	16
Extraktionsdauer [h]	0.5 h	18 h
Ausbeute		
in [mg]	7.7	13.1
in [μM]	34.6	64.3
in [%]	46	89

Die Biotransformation von BcBOT2 mit FPP lieferte das natürliche Produkt Presilphiperfolan-8 β -ol (**29**) in 46 % Ausbeute als gelbliches Öl.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 2.30 (dtd, $J = 13.6, 8.9, 0.8$ Hz, 1H, H-2b), 2.14 (dd, $J = 11.4, 0.7$ Hz, 1H, H-5b), 2.07 (td, $J = 10.2, 1.1$ Hz, 1H, H-3b), 1.79 (dddd, $J = 13.6, 8.9, 7.8, 4.0$ Hz, 1H, H-H-2a), 1.50 (dd, $J = 6.2, 3.1$ Hz, 1H, H-10b), 1.49 – 1.46 (m, 1H, H-11b), 1.37 (s, 3H, H-12), 1.31 (dd, $J = 12.6, 4.9$ Hz, 1H, H-7), 1.30 – 1.27 (m, 1H, H-11a), 1.27 – 1.22 (m, 1H, H-9), 1.19 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-H-5a), 1.17 (s, 3H, H-H-13), 1.18 – 1.14 (m, 1H, H-3a), 1.11 (t, $J = 1.1$ Hz, 3H, H-14), 1.02 – 0.97 (m, 1H, H-1), 0.88 – 0.85 (m, 1H, H-10a), 0.84 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-15); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 96.3 (C-8), 56.5 (C-4), 52.4 (C-7), 50.3 (C-1), 49.5 (C-5), 48.1 (C-6), 37.5 (C-9), 36.50 (C-12), 34.6 (C-10), 34.1 (C-3), 33.3 (C-2), 28.1 (C-14), 28.0 (C-13), 27.2 (C-11), 21.8 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 222.3720 $[\text{M}]^+$, 204.1878 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$; gefunden: 204.1879 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Die Biotransformation von PenA mit FPP lieferte das natürliche Produkt Pentalenen (**37**) in 89 % Ausbeute als hellgelbes Öl.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.24 – 5.18 (m, 1H, H-7), 2.73 – 2.66 (m, 1H, H-8), 2.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 1.87 – 1.79 (m, 1H, H-9), 1.80 – 1.75 (m, 1H, H-12b), 1.76 (dd, $J = 12.9, 0.9$ Hz, 1H, H-3b), 1.68 (ddd, $J = 11.1, 5.7, 0.9$ Hz, 1H, H-11b), 1.65 (ddd, $J = 5.8, 3.4, 1.1$ Hz, 1H, H-1b), 1.61 – 1.58 (m, 3H, H-13), 1.38 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-3a), 1.37 – 1.32 (m, 1H, H-12a), 1.32 – 1.26 (m, 1H, H-11a), 1.29 (dd, $J = 12.5, 5.0$ Hz, 1H, H-1a), 1.07 (s, 3H, H-15), 1.02 (s, 3H, H-14), 0.91 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-10); **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 140.7 (C-6), 130.1 (C-7), 65.1 (C-4), 62.4 (C-5), 59.9 (C-8), 49.3 (C-3), 47.1 (C-1), 45.0 (C-9), 40.7 (C-2), 33.8 (C-11), 30.2 (C-14), 29.3 (C-15), 28.0 (C-12), 17.2 (C-10), 15.6 (C-13); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 $[\text{M}]^+$, gefunden: 204.1881 $[\text{M}]^+$.

10.7 Semi-präparative Biotransformationen mit unnatürlichen Substraten

10.7.1 Vorarbeiten

Substratzugabe und Aufarbeitung

Die Überprüfung der Substratzugabe und der Aufarbeitung erfolgten im semi-präparativen Maßstab anhand der Biotransformation von BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **78 (Tabelle 93)**. Dazu wurde der Ansatz 1 entsprechend der Vorschrift zur diskontinuierlichen Substratzugabe angesetzt, während die Ansätze 2 und 3 analog zur Vorschrift für die kontinuierliche Substratzugabe durchgeführt wurden. Der Beginn der kontinuierlichen und auch diskontinuierlichen Zugabe wurde nach einer Inkubationsdauer von 30 min gestartet. Die Ansatzgrößen und Zugaben an Substrat, Enzym und Cofaktor sowie weiteren Reagenzien können der **Tabelle 93** entnommen werden. Im Fall des Ansatzes 3 wurde anstelle von *n*-Pentan als Extraktionsmittel das Adsorberharz Amberlite®XAD-4 eingesetzt. Das verwendete Adsorberharz ist ein poröses Copolymer bestehend aus quervernetztem Styren-Divinylbenzen (Amberlite®XAD-4, Dow Chemicals, Midland, USA) mit einer Korngröße von 250 – 850 µm und einer Porengröße von 100 Å.^[155] Der Adsorber wurde vor Verwendung konditioniert, indem das Copolymer mit dem Elutionsmittel und anschließend mit dest. Wasser gewaschen wurde. Nach Beendigung der Biotransformation wurde der konditionierte Adsorber zugegeben und die Suspension über Nacht bei 16°C gerührt (160 U·min⁻¹). Für die Aufarbeitung (Ansatz 3) wurde das Adsorberharz über einen porösen Membranfilter filtriert. Die Desorption erfolgte in 100 mL *n*-Pentan bei 20°C und 120 U·min⁻¹ über 2 h. Das Adsorberharz wurde erneut abgetrennt und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer und im Stickstoffstrom entfernt. Für die Extraktion mit *n*-Pentan (Ansatz 1 und 2) wurde die Biotransformationslösung mit 50 mL *n*-Pentan überschichtet und über Nacht bei 16 °C und 16 U·min⁻¹ extrahiert. Anschließend erfolgte eine Phasentrennung und die wässrige Phase wurde weitere dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel ebenfalls am Rotationsverdampfer und im Stickstoffstrom entfernt⁶¹. Zur Überprüfung einer vollständigen Extraktion bzw. Adsorption wurde die wässrige Phase nach Beendigung der Aufarbeitung nochmals mit *n*-Pentan extrahiert und eine GC-MS Analyse zur Bestimmung der Rückstände durchgeführt.

⁶¹ Zunächst wurden etwa 90 % des Lösemittels schonend am Rotationsverdampfer (40 °C, 800 mbar) entfernt. Die restlichen 10 % wurden im Stickstoffstrom entfernt, um eine Coevaporation der Terpenoide zu vermeiden.

Tabelle 93: Ansatzgrößen, Reaktionsbedingungen und zugesetzte Reaktanden für die semi-präparativen Umsetzungen von BcBOT2 mit dem Derivat **78** zur Überprüfung von Substratzugabe und Aufarbeitung in einem Einphasensystem. Weiterhin sind Informationen zur Extraktion sowie zur Ausbeute der Rohprodukte angegeben. **Ansatz 1:** diskontinuierliche Substratzugabe und Extraktion mit *n*-Pentan als Aufarbeitung, **Ansatz 2:** kontinuierliche Substratzugabe und Extraktion mit *n*-Pentan, **Ansatz 3:** kontinuierliche Substratzugabe und Aufarbeitung durch Adsorption der entstandenen Terpenoide an das Adsorberharz Amberlite®XAD-4.

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Ansatzgröße			
c(78) [mM]	1.5	1.5	1.5
Puffer	50 mM HEPES	50 mM HEPES	50 mM HEPES
Gesamtvolumen [mL]	44.5	44.5	44.5
Startbedingungen			
c(Substrat) [μM]	200	200	200
c(Enzym) [g·L ⁻¹]	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A
c(MgCl ₂) [mM]	25	25	25
Tween®20 [% (v/v)]	0.02	0.02	0.02
PPase [U]	1	1	1
Reaktionsbedingungen			
Temperatur [°C]	28 °C	28 °C	28 °C
pH	7.5	7.5	7.5
∅ [U·min ⁻¹]	180	180	180
Inkubationsdauer und Substratzugabe			
Art der Zugabe	diskontinuierlich	kontinuierlich	kontinuierlich
c(Substrat) [μM] Aliquot	200	-	-
c(Substrat) [μM/h]	400	400	400
Inkubationsdauer [h]	5.0	5.0	5.0
Enzymabbau			
Proteinase K [U]	75	75	75
c(CaCl ₂) [mM]	5	5	5
Temperatur [°C]	28	28	28
Inkubationsdauer [h]	1.0	1.0	1.0
Aufarbeitung			
Art der Aufarbeitung	Extraktion	Extraktion	Adsorption
Lösemittel/ Adsorber	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan	Amberlite®XAD-4 (3.0 g)
∅ [U·min ⁻¹]	160	160	160
Temperatur [°C]	16	16	16
Extraktionsdauer [h]	18 h	18 h	18 h
Ausbeute			
in [mg]	4.6	4.5	2.3
in [μM]	20.8	20.6	10.6
in [%]	31.2	30.9	15.9

^A Das Enzym BcBOT2 wurde nach 2 h und 4 h erneut zugesetzt (jeweils 0.1 g·L⁻¹), um einem Aktivitätsverlust vorzubeugen.

Stabilitätstest von BcBOT2 mit 78

Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurde das Enzym BcBOT2 bei 24°C, 28°C, 32°C und 37°C über einen festgelegten Zeitraum (t_2) gelagert. Für den Stabilitätstest wurden analytische Enzymtests wie unter Kap. 10.5 beschrieben angesetzt, allerdings mit dem Unterschied, dass das Substrat **78** erst nach einer definierten Lagerungsdauer (t_2) zugesetzt wurde. Erst mit Zugabe des Substrates wurde die Biotransformation gestartet. Die Inkubationsdauer (t_1) sowie weitere Parameter und Konzentrationen der analytischen Enzymtests können der nachfolgenden **Tabelle 94** entnommen werden. Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben. Die Enzymstabilität wurde indirekt über die semi-quantitativ ermittelte Ausbeute des Hauptproduktes **112** beurteilt.

Tabelle 94: Reaktionsparameter für die Umsetzung der Biotransformation der STC BcBOT2 mit **78** bei Verwendung verschiedenster Temperaturen und Lagerungsdauern (t_2) zur Bestimmung der Enzymstabilität. Als Puffer wurde ein 50 mM HEPES Puffer verwendet, der 5 mM DTT enthält.

	t_1	pH	\bar{v}	$C_{\text{Substrat 78}}$	C_{Enzym}	C_{MgCl_2}
BcBOT2	15 min	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
T	24 °C – 28 °C – 32 °C – 37 °C					
t_2 [min]	0 min – 15 min – 30 min – 60 min – 90 min – 120 min – 180 min					

Temperaturoptimierung

Die Temperaturoptimierung für die unnatürlichen Substrate **78** und **109 – 111** mit den STCs BcBOT2 und PenA erfolgte durch analytische *in vitro* Enzymtests im 500 μL Maßstab. Die Optimierung wurde in einem Temperaturbereich von 4 – 40°C in einer Dreifachbestimmung unter Zusatz eines internen Standards durchgeführt. In der **Tabelle 95** sind die gewählten Prüfwerte sowie die Zusammensetzung der analytischen *in vitro* Enzymtests zusammengefasst. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend den vorherigen Umsetzungen durch Extraktion mit 100 μL *n*-Hexan.

Tabelle 95: Zu überprüfender Parameter Temperatur mit den festgelegten Prüfwerten. Der Prüfwert 37 °C wurde gewählt, da es sich um die physiologische Temperatur handelt. Weiterhin sind die Inkubationsbedingungen und Konzentrationen für die analytischen Enzymtests angegeben. Für die Umsetzungen wurden ein 50 mM HEPES Puffer mit 5 mM DTT verwendet.

Parameter	Optimierungsbereich		festgelegte Prüfwerte			
Temperatur	4 °C – 40 °C		4 ^A - 10 – 15 – 20 – 25 – 30 – 37 – 40 °C			
BcBOT2	t	pH	\bar{v}	$C_{\text{Substrat 78}}$	C_{Enzym}	C_{MgCl_2}
78, 109 - 111	20 min	7.5	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	5 mM
PenA	t	pH	\bar{v}	$C_{\text{Substrat 78}}$	C_{Enzym}	C_{MgCl_2}
78	20 min	7.0	0 U·min ⁻¹	150 μM	0.01 g·L ⁻¹	10 mM

^A Für die Temperaturoptimierung von BcBOT2 mit **78** wurde zusätzlich der Prüfwert 4 °C ausgewählt.

10.7.2 Semi-präparative Biotransformationen der unnatürlichen Substrate 78 und 109 – 111 mit den STCs BcBOT2 und PenA

Für die Biotransformationen mit den unnatürlichen Substraten **78** sowie **109-111** wurden in einem Fed-Batch Prozess mit einer kontinuierlichen Substratzugabe über eine Spritzenpumpe durchgeführt (**Tabelle 96**). Dazu wurde zunächst ein 50 mM HEPES Puffer (BcBOT2) bzw. ein 50 mM Tris-HCl Puffer (PenA) vorgelegt und dieser mit Tween®20 sowie PPase versetzt. Aufgrund der Temperatursensibilität des Tris-HCl Puffers erfolgte die pH-Wert Einstellung bei der Inkubationstemperatur des Ansatzes. Anschließend wurde das Enzym und der Cofaktor in Form von MgCl₂ zugesetzt und die Reaktionslösung auf Inkubationstemperatur temperiert. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Biotransformation durch Zugabe von 250 µM bzw. 350 µM unnatürlichen Substrat gestartet. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bzw. 45 min, wurde die Spritzenpumpe gestartet und das Substrat kontinuierlich (µM/h) dem Ansatz zugefügt. Nach zwei Stunden sowie nach Beendigung der Substratzuführung wurde erneut Protein zugegeben, um eine konstante Enzymaktivität zu gewährleisten. Nach vollständiger Zugabe des Substrates wurde der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert, ehe Prot K und CaCl₂ zugesetzt wurden, um die STC abzubauen. Nach Beendigung des Enzymabbaus wurde der Ansatz mit *n*-Pentan überschichtet und über Nacht extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase weitere dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel zunächst am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend im Stickstoffstrom vollständig entfernt, bis eine Massekonstanz des Rückstands erreicht wurde.

Tabelle 96: Ansatzgrößen, Reaktionsbedingungen und zugesetzte Reaktanden für die semi-präparativen Umsetzungen von BcBOT2 und PenA mit den unnatürlichen Substraten **78** sowie **109-111**. Weiterhin sind Informationen zur Extraktion sowie zur Ausbeute der Rohprodukte angegeben.

Ansatzgröße	78 _{BcBOT2}	109 _{BcBOT2}	110 _{BcBOT2}	111 _{BcBOT2}	78 _{PenA}
c(Substrat) [mM]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Puffer	50 mM ^A	50 mM ^A	50 mM ^A	50 mM ^A	50 mM ^A
Gesamtvolumen [mL]	267 ^B	46	277 ^B	178 ^B	178 ^B
Startbedingungen					
c(Substrat) [μM]	200	200	200	200	350
c(Enzym) [g·L⁻¹]	0.1 ^C	0.1 ^C	0.1 ^C	0.1 ^C	0.1 ^C
c(MgCl₂) [mM]	25	25	25	25	25
Tween®20 [% (v/v)]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
PPase [U]	1	1	1	1	1
Reaktionsbedingungen					
Temperatur [°C]	28	30	25	28	30
pH	7.5	7.5	7.5	7.5	8.4
∅ [U·min⁻¹]	180	180	180	180	200
Inkubationsdauer und Substratzugabe					
Art der Zugabe	kont. ^D	kont. ^D	kont. ^D	kont. ^D	kont. ^D
c(Substrat) [μM/h]	400	400	400	400	250
Inkubationsdauer [h]	4.5	4.5	4.5	5.75	6.35
Enzymabbau					
Proteinase K [U]	75	75	75	75	75
c(CaCl₂) [mM]	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Temperatur [°C]	28	30	25	25	20
Inkubationsdauer [h]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Aufarbeitung (Extraktion)					
Lösemittel	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan
∅ [U·min⁻¹]	130	180	110	180	180
Temperatur [°C]	6	16	10	16	15
Extraktionsdauer [h]	18 h	18 h	18 h	18 h	18 h
Ausbeute					
in [mg]	35.12	1.82	27.6	17.2	13.5
in [μM]	159.4	8.9	135.3	84.4	61.1
in [%]	39.8	12.9	32.6	30.6	22.9

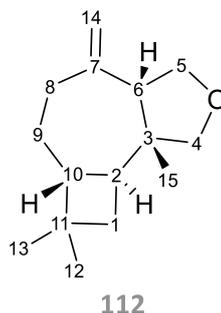
^A Biotransformation mit der STC BcBOT2: 50 mM HEPES Puffer mit 5 mM DTT, Biotransformation mit der STC PenA: 50 mM Tris-HCl Puffer mit 5 mM DTT.

^B Es wurden jeweils vier (**111**_{BcBOT2}) bzw. sechs (**78**_{BcBOT2/PenA}, **110**_{BcBOT2}) parallele Ansätze mit einem Volumen von jeweils 44.5 bzw. 46.1 mL angesetzt.

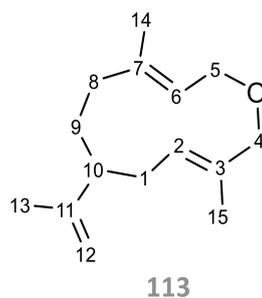
^C Die Enzyme BcBOT2 und PenA wurden nach 2 h und 4 h erneut zugesetzt (jeweils 0.1 g·L⁻¹), um einem Aktivitätsverlust vorzubeugen.

^D kont.: kontinuierliche Substratzugabe

Die Biotransformation von BcBOT2 mit dem Derivat **78** lieferte die unnatürlichen Produkte **112** und **113** in 39.8 % Ausbeute als gelbliche Flüssigkeit.

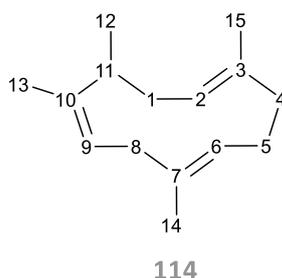


¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 0.91 (s, 3H, H-13), 0.95 (s, 3H, H-12), 0.96 (s, 3H, H-15), 1.18 (tdd, $J = 12.2, 10.9, 5.2$ Hz, 1H, H-9a), 1.30 (ddd, $J = 10.5, 8.3, 0.8$ Hz, 1H, H-1a), 1.40 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-1b), 1.42 (dq, $J = 12.2, 4.7$ Hz, 1H, H-9b), 1.63 (ddd, $J = 12.2, 10.4, 4.8$ Hz, 1H, H-10), 1.62 (td, $J = 12.6, 12.1, 4.7$ Hz, 1H, H-8a), 2.00 (td, $J = 10.4, 8.3$ Hz, 1H, H-2), 2.16 (ddd, $J = 6.6, 5.1, 1.1$ Hz, 1H, H-6), 2.30 (dtd, $J = 12.6, 5.2, 4.5, 0.8$ Hz, 1H, H-8b), 3.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4a), 3.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4b), 3.96 (dd, $J = 9.1, 5.2$ Hz, 1H, H-5a), 3.98 (dd, $J = 9.1, 6.8$ Hz, 1H, H-5b), 4.85 (dt, $J = 1.6, 0.8$ Hz, 1H, H-14a), 4.92 (p, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-14b); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm] 149.9 (C-7), 111.9 (C-14), 79.4 (C-4), 72.5 (C-5), 58.4 (C-6), 46.2 (H-10), 45.6 (C-3), 40.6 (C-2), 37.3 (C-8), 34.8 (C-1), 34.1 (C-11), 30.3 (C-13), 29.4 (C-9), 22.7 (C-12), 22.2 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1822 [M]⁺.



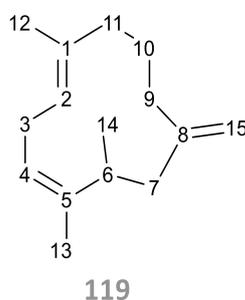
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 5.41 – 5.36 (m, 1H, H-2), 5.28 (ddt, $J = 8.8, 6.1, 1.5$ Hz, 1H, H-6), 4.69 (dt, $J = 2.3, 0.7$ Hz, 1H, H-12b), 4.60 (dd, $J = 2.1, 1.4$ Hz, 1H, H-12a), 4.25 – 4.13 (m, 2H, H-5), 4.04 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, H-4b), 3.86 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-4a), 2.15 – 2.08 (m, 1H, H-8b), 2.07 – 2.01 (m, 1H, H-10), 1.89 (dt, $J = 4.0, 2.1$ Hz, 2H, H-1), 1.76 – 1.71 (m, 1H, H-8a), 1.73 (dd, $J = 1.5, 0.8$ Hz, 3H, H-13), 1.71 – 1.67 (m, 3H, H-14), 1.68 (t, $J = 1.1$ Hz, 3H, H-15), 1.67 – 1.62 (m, 1H, H-9b), 1.40 (dddd, $J = 14.4, 12.3, 3.4, 1.9$ Hz, 1H, H-9a); **¹³C NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 152.0 (C-11), 137.6 (C-7), 135.7 (C-3), 126.8 (C-2), 124.9 (C-6), 107.9 (C-12), 80.0 (C-4), 69.4 (C-5), 48.8 (C-10), 34.0 (C-8), 33.6 (C-1), 33.0 (C-9), 19.8 (C-13), 17.9 (C-14), 14.7 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1824 [M]⁺.

Die Biotransformation der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **109** lieferte das Produkt **114** in 12.9 % Ausbeute als hellgelbes Öl.

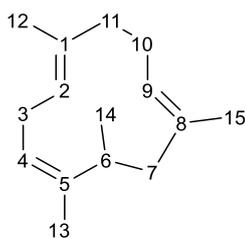


$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.47 (td, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H, H-9), 4.97 (dd, $J = 11.1, 5.5$ Hz, 1H, H-2), 4.97 – 4.92 (m, 1H, H-6), 2.63 (dd, $J = 16.0, 7.9$ Hz, 1H, H-8b), 2.50 (dd, $J = 16.0, 7.9$ Hz, 1H, H-8a), 2.46 – 2.38 (m, 1H, H-11), 2.14 (ddd, $J = 10.2, 9.6, 5.5$ Hz, 1H, H-1b), 2.14 – 2.09 (m, 1H, H-5b), 2.09 (dd, $J = 10.4, 7.1$ Hz, 1H, H-4b), 2.03 (dt, $J = 14.0, 7.1$ Hz, 1H, H-5a), 2.01 (dt, $J = 10.4, 7.1$ Hz, 1H, H-4a), 1.90 (dd, $J = 10.2, 5.5$ Hz, 1H, H-1a), 1.63 (t, $J = 1.0$ Hz, 3H, H-13), 1.51 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, H-14), 1.41 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H, H-15), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-12); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 141.5 (C-10), 134.4 (C-7), 133.5 (C-3), 126.7 (C-2), 126.0 (C-6), 123.3 (C-9), 39.4 (C-4), 36.2 (C-8), 36.2 (C-11), 33.0 (C-1), 24.1 (C-5), 20.0 (C-12), 17.5 (C-13), 17.0 (C-14), 14.7 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 [M] $^+$, gefunden: 204.1877 [M] $^+$.

Die Biotransformation von BcBOT2 mit dem unnatürlichen Derivat **110** lieferte die Produkte **119** und **120** in 32.6 % Ausbeute als hellgelbes Öl.

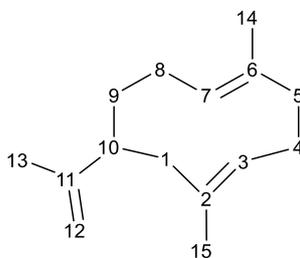


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.40 (ddq, $J = 8.7, 8.7, 4.2, 1.5$ Hz, 1H, H-4), 5.33 (dh, $J = 9.3, 4.4, 1.3, 0.7$ Hz, 1H, H-2), 4.76 (q, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-15a), 4.76 – 4.74 (m, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-15b), 2.84 (pd, $J = 7.8, 7.0, 5.2$ Hz, 1H, H-6), 2.70 (dddt, $J = 18.2, 9.3, 4.2, 2.0$ Hz, 1H, H-3b), 2.52 – 2.46 (m, 1H, H-3a), 2.17 (dd, $J = 13.1, 7.8$ Hz, 1H, H-7b), 2.09 (dt, $J = 13.1, 5.4$ Hz, 1H, H-11b), 2.03 (dtt, $J = 16.2, 5.5, 1.8$ Hz, 1H, H-9b), 1.85 (dt, $J = 13.1, 7.4$ Hz, 1H, H-11a), 1.78 (dt, $J = 16.2, 5.7$ Hz, 1H, H-9a), 1.75 (dd, $J = 13.1, 5.2$ Hz, 1H, H-7a), 1.63 – 1.57 (m, 2H, H-10), 1.60 (t, $J = 1.7$ Hz, 3H, H-13), 1.50 (t, $J = 1.3$ Hz, 3H, H-12), 0.95 (d, $J = 9.8$ Hz, 3H, H-14); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 148.4 (C-8), 141.4 (C-5), 132.6 (C-1), 127.0 (C-2), 123.4 (C-4), 109.7 (C-15), 43.1 (C-7), 38.7 (C-11), 34.1 (C-6), 32.4 (C-9), 26.3 (C-3), 23.6 (C-10), 19.7 (C-14), 17.8 (C-13), 17.1 (C-12); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 [M] $^+$, gefunden: 204.1877 [M] $^+$.

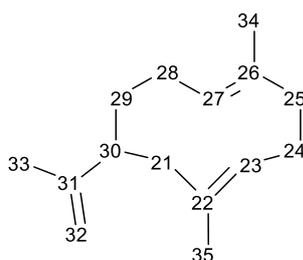

120

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.42 (ddq, $J = 8.9, 5.0, 1.5$ Hz, 1H, H-4), 5.14 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-2), 4.86 (ddp, $J = 10.5, 5.0, 1.3$ Hz, 1H, H-9), 2.61 – 2.56 (m, 2H, H-3), 2.57 – 2.53 (m, 1H, H-6), 2.17 (dtd, $J = 12.9, 10.9, 4.9$ Hz, 1H, H-10b), 2.14 (dd, $J = 12.7, 3.9$ Hz, 1H, H-7b), 2.08 (dt, $J = 4.2, 1.7$ Hz, 1H, H-11b), 1.99 (dq, $J = 12.9, 5.0, 4.2$ Hz, 1H, H-10a), 1.93 (td, $J = 11.7, 10.9, 5.0$ Hz, 1H, H-11a), 1.86 (dd, $J = 12.6, 10.8$ Hz, 1H, H-7a), 1.58 (t, $J = 1.5$ Hz, 3H, H-13), 1.47 (dd, $J = 1.5, 0.8$ Hz, 3H, H-15), 1.44 (t, $J = 1.3$ Hz, 3H, H-12), 0.96 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-14); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 140.3 (C-5), 137.1 (C-8), 131.9 (C-1), 128.0 (C-2), 126.6 (C-9), 124.8 (C-4), 44.9 (C-7), 41.1 (C-6), 39.5 (C-11), 25.8 (C-3), 25.3 (C-10), 20.7 (C-14), 18.3 (C-15), 17.8 (C-13), 16.5 (C-12); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 [M] $^+$, gefunden: 204.1879 [M] $^+$.

Das Produkt **123** wurde als hellgelbes Öl in einer Ausbeute von 30.6 % durch Biotransformation der STC BcBOT2 mit dem unnatürlichen Substrat **111** erhalten. Mittels Tieftemperatur-NMR-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass das Produkt **123** als drei Konformationsisomere **123a-123c** in Toluol- d_8 vorliegt. Eine thermische Belastung des Produktes **123** führte zum [3,3]-sigmatropen COPE-Umlagerungsprodukt **122**.

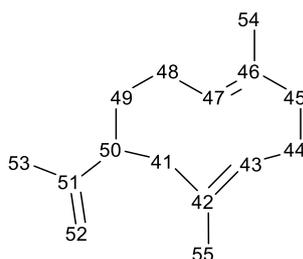

123a

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Toluol- d_8 , 255 K) δ [ppm]: 4.76 (dd, $J = 1.4, 0.7$ Hz, 1H, H-12b), 4.70 (dd, $J = 11.5, 4.3$ Hz, 1H, H-3), 4.65 (dd, $J = 2.0, 1.4$ Hz, 1H, H-12a), 4.35 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H-7), 2.26 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-1b), 2.21 (dd, $J = 11.3, 7.4$ Hz, 1H, H-8b), 2.14 – 2.08 (m, 1H, H-4b), 2.10 – 2.06 (m, 1H, H-10), 2.11 – 2.01 (m, 1H, H-5b), 2.04 – 2.00 (m, 1H, H-1a), 1.98 – 1.94 (m, 1H, H-4a), 1.86 (t, $J = 16.3$ Hz, 1H, H-5a), 1.86 (ddd, $J = 11.3, 10.9, 2.3$ Hz, 1H, H-8a), 1.79 (ddd, $J = 14.2, 7.3, 0.9$ Hz, 1H, H-9b), 1.63 (dd, $J = 1.3, 0.7$ Hz, 3H, H-13), 1.41 (t, $J = 1.6$ Hz, 3H, H-14), 1.29 (s, 3H, H-15), 1.25 – 1.18 (m, 1H, 9a); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, Toluol- d_8) δ [ppm]: 154.1 (C-11), 137.2 (C-2), 133.6 (C-7), 128.7 (C-6), 127.7 (C-3), 108.1 (C-12), 48.6 (C-1), 47.5 (C-10), 40.4 (C-5), 37.9 (C-9), 29.2 (C-8), 27.2 (C-4), 20.2 (C-13), 17.1 (C-14), 17.0 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 [M] $^+$, gefunden: 204.1876 [M] $^+$.



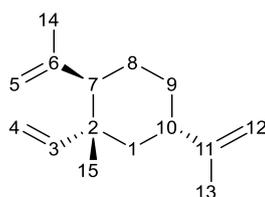
123b

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Toluol- d_8 , 255 K) δ [ppm]: 5.09 (dd, $J = 9.4, 6.6$ Hz, 1H, H-27), 4.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-23), 4.74 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-32b), 4.63 (dd, $J = 2.4, 1.4$ Hz, 1H, H-32a), 2.26 – 2.23 (m, 1H, H-28b), 2.24 – 2.19 (m, 1H, H-24a), 2.09 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-25b), 2.01 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H-25a), 1.98 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-21b), 1.96 – 1.91 (m, 1H, H-24b), 1.94 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-30), 1.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-21a), 1.71 (dtd, $J = 10.7, 6.6, 3.8$ Hz, 1H, H-28a), 1.61 (s, 3H, H-33), 1.58 – 1.53 (m, 1H, H-29b), 1.40 (s, 3H, H-35), 1.35 (s, 3H, H-34), 1.14 (tt, $J = 13.6, 3.8$ Hz, 1H, H-29a); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, Toluol- d_8) δ [ppm]: 150.9 (C-31), 137.3 (C-22), 135.1 (C-26), 127.2 (C-27), 123.0 (C-23), 108.2 (C-32), 47.8 (C-21), 45.3 (C-30), 38.0 (C-25), 35.5 (C-29), 28.0 (C-28), 25.0/24.9 (C-24), 20.1 (C-33), 17.4 (C-35), 15.8 (C-34).



123c

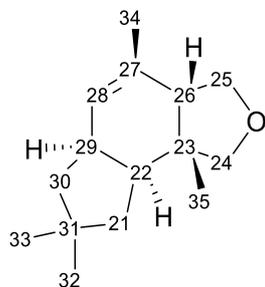
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Toluol- d_8 , 255 K) δ [ppm]: 5.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-47), 4.84 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-52b), 4.79 – 4.75 (m, 1H, H-43), 4.74 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-52a), 2.36 – 2.31 (m, 1H, H-50), 2.34 – 2.29 (m, 1H, H-41b), 2.24 – 2.20 (m, 1H, H-44b), 2.16 (td, $J = 4.4, 2.2$ Hz, 1H, H-48b), 2.02 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-45b), 1.99 – 1.95 (m, 1H, H-45a), 1.96 – 1.91 (m, 1H, H-44a), 1.82 – 1.80 (m, 1H, H-48a), 1.67 – 1.66 (m, 3H, H-53), 1.58 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-41a), 1.53 (s, 3H, H-55), 1.39 – 1.35 (m, 1H, H-49b), 1.35 (s, 3H, H-54), 1.21 – 1.14 (m, 1H, H-49a); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Toluol- d_8) δ [ppm]: 151.1 (C-51), 136.3 (C-46), 133.7 (C-42), 129.7 (C-43), 128.3 (C-47), 109.3 (C-52), 47.5 (C-50), 40.6 (C-41), 39.2 (C-45), 32.8 (C-49), 25.9 (C-48), 25.0/24.9 (C-44), 22.3 (C-55), 20.8 (C-53), 15.76 (C-54).



122

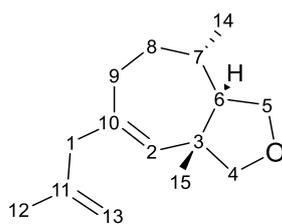
¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ[ppm]: 5.78 (dd, $J = 17.5, 10.8$ Hz, 1H, H-3), 4.94 (dd, $J = 17.5, 1.3$ Hz, 1H, H-4b), 4.93 (dd, $J = 2.5, 0.9$ Hz, 1H, H-5b), 4.91 (dd, $J = 10.8, 1.3$ Hz, 1H, H-4a), 4.83 – 4.79 (m, 2H, H-12), 4.69 – 4.67 (m, 1H, H-5a), 2.05 (tt, $J = 12.7, 3.3$ Hz, 1H, H-10), 1.80 (dd, $J = 12.2, 4.2$ Hz, 1H, H-7), 1.74 – 1.69 (m, 1H, H-9ax), 1.71 (dd, $J = 1.4, 0.8$ Hz, 3H, H-14), 1.65 (t, $J = 0.9$ Hz, 3H, H-13), 1.59 – 1.46 (m, 2H, H-8), 1.49 (dd, $J = 13.1, 3.1$ Hz, 1H, H-1eq), 1.31 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-1ax), 1.10 (dq, $J = 12.5, 4.4, 4.4$ Hz, 1H, H-9eq), 0.99 (s, 3H, H-15); **¹³C NMR** (126 MHz, Benzene-*d*₆) δ[ppm]: 150.6 (C-3), 150.2 (C-11), 147.7 (C-6), 112.5 (C-5), 110.0 (C-4), 108.9 (C-12), 52.7 (C-7), 45.5 (C-1), 40.8 (C-2), 40.4 (C-10), 32.2 (C-9), 28.1 (C-8), 25.2 (C-14), 21.1 (C-13), 17.2 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 [M]⁺, gefunden: 204.1878 [M]⁺.

Die Produkt **124a-127** wurden durch Biotransformation der STC PenA mit dem heteroatommodifizierten Substrat **78** als hellgelbes Öl in 22.9 % Ausbeute erhalten. Eine nach der Isolierung der Hauptprodukte **124-127** durchgeführte Rechromatographie auf einer polaren Säule zeigte, dass in zwei der Fraktionen jeweils zwei Produkte (**112/124a** sowie **126 a/b**) zusammen isoliert wurden, die auf der unpolaren Säule coeluieren.



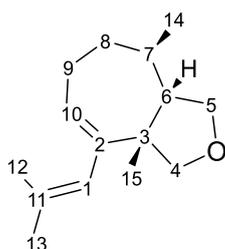
124a

¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 5.10 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, H-28), 4.05 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 1H, H-25b), 3.74 (dd, $J = 8.5, 3.1$ Hz, 1H, H-25a), 3.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-24b), 3.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-24a), 2.41 (dddt, $J = 9.1, 7.1, 4.5, 2.2$ Hz, 1H, H-29), 1.93 – 1.86 (m, 1H, H-26), 1.85 – 1.77 (m, 1H, H-22), 1.63 – 1.59 (m, 1H, H-30b), 1.49 – 1.46 (m, 3H, H-34), 1.37 (dd, $J = 12.4, 7.1$ Hz, 1H, H-21b), 1.35 (dd, $J = 13.1, 2.3$ Hz, 1H, H-30a), 1.25 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-21a), 1.04 (s, 3H, H-33), 0.99 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, H-35), 0.97 (s, 3H, H-32); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 132.1 (C-27), 127.1 (C-28), 77.7 (C-24), 71.2 (C-25), 48.3 (C-30), 47.2 (C-26), 43.9 (C-23), 43.4 (C-21), 42.8 (C-22), 38.2 (C-29), 37.0 (C-31), 32.1 (C-33), 32.1 (C-32), 26.1 (C-35), 21.9 (C-34); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1826 [M]⁺.



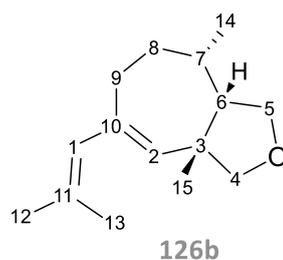
125

¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 5.04 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-2), 4.86 (dd, $J = 2.1, 1.1$ Hz, 1H, H-13b), 4.82 (dd, $J = 2.1, 1.0$ Hz, 1H, H-13a), 4.10 (dd, $J = 8.8, 7.2$ Hz, 1H, H-5b), 3.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4b), 3.49 (dd, $J = 8.9, 6.8$ Hz, 1H, H-5a), 3.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4a), 2.61 (s, 2H, H-1), 2.22 (dddd, $J = 15.7, 9.6, 6.4, 1.7$ Hz, 1H, H-9b), 1.83 (dt, $J = 15.4, 5.7$ Hz, 1H, H-9a), 1.65 (t, $J = 1.1$ Hz, 3H, H-12), 1.50 – 1.47 (m, 1H, H-8b), 1.47 – 1.43 (m, 1H, H-6), 1.44 – 1.40 (m, 1H, H-7), 1.19 (s, 3H, H-15), 1.21 – 1.14 (m, 1H, H-8a), 0.68 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H-14); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 144.1 (C-11), 135.6 (C-10), 130.0 (C-2), 112.3 (C-13), 81.1 (C-4), 74.5 (C-5), 53.8 (C-6), 49.0 (C-1), 46.1 (C-3), 33.3 (C-8), 33.3 (C-7), 28.6 (C-9), 27.8 (C-15), 21.8 (C-12), 20.8 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1828 [M]⁺.

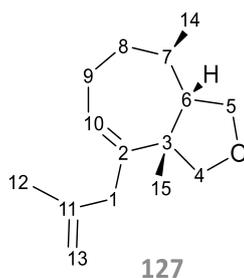


126a

¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 5.56 (dt, $J = 3.0, 1.4$ Hz, 1H, H-1), 5.38 (ddd, $J = 8.1, 6.4, 3.0$ Hz, 1H, H-1), 4.08 – 4.04 (m, 1H, H-5b), 3.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-4b), 3.57 (dd, $J = 8.5, 0.7$ Hz, 1H, H-4a), 3.54 (dd, $J = 9.2, 6.6$ Hz, 1H, H-5a), 2.29 – 2.20 (m, 1H, H-9b), 1.84 – 1.78 (m, 1H, H-10), 1.69 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, H-12), 1.63 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, H-13), 1.67 – 1.60 (m, 1H, H-7), 1.59 – 1.55 (m, 1H, H-8b), 1.52 – 1.47 (m, 1H, H-6), 1.27 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, H-15), 1.07 – 1.01 (m, 1H, H-8a), 0.68 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-14); **¹³C NMR** (126 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 142.8 (C-2), 133.5 (C-11), 126.0 (C-1), 125.2 (C-10), 77.8 (C-4), 72.9 (C-5), 52.2 (C-6), 50.4 (C-3), 34.5 (C-8), 31.9 (C-7), 26.3 (C-15), 25.8 (C-13), 24.2 (C-9), 19.9 (C-14), 19.4 (C-12); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1828 [M]⁺.



$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.67 (dd, $J = 2.8, 1.4$ Hz, 1H, H-1), 5.17 (s, 1H, H-2), 4.10 (dd, $J = 8.7, 7.6$ Hz, 1H, H-5b), 3.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4b), 3.49 (dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H, H-5a), 3.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4a), 2.38 (dddd, $J = 15.3, 10.7, 6.6, 1.9$ Hz, 1H, H-9b), 1.88 (ddd, $J = 15.0, 5.9, 4.6$ Hz, 1H, H-9a), 1.71 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, H-12), 1.70 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, H-13), 1.57 – 1.53 (m, 1H, H-8b), 1.53 – 1.42 (m, 1H, H-7), 1.47 – 1.41 (m, 1H, H-6), 1.24 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, H-15), 1.16 – 1.11 (m, 1H, H-8a), 0.67 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-14); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 135.8 (C-10), 132.3 (C-11), 131.5 (C-2), 129.1 (C-1), 81.0 (C-4), 74.3 (C-5), 53.3 (C-6), 46.5 (C-3), 33.3 (C-8), 33.1 (C-7), 29.9 (C-9), 27.5 (C-15), 26.6 (C-12), 20.6 (C-14), 19.4 (C-13); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1828 [M]⁺.



$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.35 (ddt, $J = 7.6, 6.2, 1.3$ Hz, 1H, H-10), 4.90 – 4.84 (m, 1H, H-13b), 4.80 (dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz, 1H, H-13a), 4.03 (ddd, $J = 9.1, 7.5, 0.6$ Hz, 1H, H-5b), 3.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-4b), 3.60 (dd, $J = 8.3, 0.6$ Hz, 1H, H-4a), 3.52 (dd, $J = 9.1, 6.3$ Hz, 1H, H-5a), 2.56 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H, H-1b), 2.49 (dd, $J = 15.2, 1.3$ Hz, 1H, H-1a), 2.22 – 2.13 (m, 1H, H-9b), 1.74 (dddd, $J = 14.4, 8.4, 6.2, 2.5$ Hz, 1H, H-9a), 1.63 (t, $J = 1.0$ Hz, 3H, H-12), 1.58 – 1.49 (m, 1H, H-7), 1.56 – 1.47 (m, 1H, H-8b), 1.54 – 1.45 (m, 1H, H-6), 1.21 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H, H-15), 1.04 – 0.95 (m, 1H, H-8a), 0.66 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H-14); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 144.6 (C-11), 141.3 (C-2), 124.0 (C-10), 113.2 (C-13), 76.5 (C-4), 72.7 (C-5), 52.2 (C-6), 51.0 (C-3), 43.6 (C-1), 34.3 (C-8), 31.7 (C-7), 26.3 (C-15), 23.9 (C-9), 22.0 (C-12), 19.8 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺, gefunden: 220.1827 [M]⁺.

10.7.3 Quantenmechanische Berechnungen

Biotransformiertes Produkt 123

Quantenmechanische Berechnungen erfolgten mit dem Programm SCHRÖDINGER bei 300 K und 255 K mit einem MM3-Kraftfeld und unter Zuhilfenahme des MacroModels OPLS_2005. Zur Vergleichbarkeit der experimentellen und theoretischen Daten wurde für die Kraftfeldberechnungen dementsprechend eine Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 2.4 \text{ C}\cdot\text{Vm}^{-1}$ gewählt, die mit der des eingesetzten Lösemittel Toluol übereinstimmt. Die Berechnung der Besetzungsanteile erfolgte anhand der Formel zur Berechnung der freien Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_r G^\circ$) und Umstellung auf die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K (Gleichung 3).

$$\Delta_r G^\circ = -RT \cdot \ln K \quad K = e^{-\frac{\Delta_r G^\circ}{RT}}$$

$\Delta_r G^\circ$: freie Standardreaktionsenthalpie

T: Temperatur (K)

R: universelle Gaskonstante

K: thermodynamische Gleichgewichtskonstante

Gleichung 3: Berechnung der Gleichgewichtskonstante aus der freien Standardreaktionsenthalpie.

In der nachfolgenden **Tabelle 97** sind die prozentualen Besetzungsanteile der 15 wahrscheinlichsten Konformationen für 255 K und 300 K aufgelistet.

Tabelle 97: Über quantenmechanische Berechnungen ermittelte Gibbs-Energie (G°) für die 15 wahrscheinlichsten Konformationen bei 255 K und 300 K. Ausgehend von der Gibbs-Energie wurde die freie Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_r G^\circ$) und Gleichgewichtskonstante (K) für jedes Konformer berechnet. Zur besseren Übersicht wurden die Konformationen DD, UD, DD und DU in unterschiedlichen Grautönen hinterlegt.

225 K	G° [kJ·mol ⁻¹]	$\Delta_r G^\circ$ [J·mol ⁻¹]	K	Anteil [%]	Konformation
1	132,8262	0	1	89,0067	DD
2	139,4593	6633,1	0,04377	3,8962	UD
3	140,2399	7413,7	0,03029	2,6961	DD
4	140,8690	8042,8	0,02251	2,0038	DD
5	143,0796	10253,4	0,00794	0,7064	DD
6	143,3139	10487,7	0,00711	0,6325	UU
7	144,2323	11406,1	0,00461	0,4101	UD
8	144,8281	12001,9	0,00348	0,3096	UU
9	146,6261	13799,9	0,00149	0,1326	DU
10	147,4755	14649,3	0,00100	0,0888	UD
11	147,6505	14824,3	0,00092	0,0818	UD
12	152,0508	19224,6	0,00012	0,0103	DU
13	152,0982	19272	0,00011	0,0100	UU
14	152,1869	19360,7	0,00011	0,0096	UU
15	153,3757	20549,5	0,00006	0,0055	DD

300 K	G° [kJ·mol ⁻¹]	Δ _r G° [J·mol ⁻¹]	K	Anteil [%]	Konformation
1	132,8262	0	1	81,8539	DD
2	139,4593	6633,1	0,06999	5,7289	UD
3	140,2399	7413,7	0,05118	4,1894	DD
4	140,8690	8042,8	0,03977	3,2555	DD
5	143,0796	10253,4	0,01639	1,3418	DD
6	143,3139	10487,7	0,01492	1,2215	UU
7	144,2323	11406,1	0,01033	0,8453	UD
8	144,8281	12001,9	0,00813	0,6657	UU
9	146,6261	13799,9	0,00395	0,3237	DU
10	147,4755	14649,3	0,00281	0,2303	UD
11	147,6505	14824,3	0,00262	0,2147	UD
12	152,0508	19224,6	0,00045	0,0368	DU
13	152,0982	19272	0,00044	0,0361	UU
14	152,1869	19360,7	0,00043	0,0348	UU
15	153,3757	20549,5	0,00026	0,0216	DD

10.8 Semi-synthetische Arbeiten

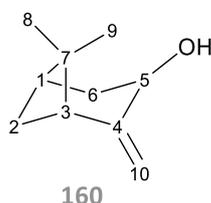
10.8.1 Säulenchromatographie

Zum Erhalt der notwendigen Menge an Produkt **112**, wurde das unnatürliche Substrat mit der STC BcBOT2 umgesetzt (s. Kap. 10.7.2). Hierbei konnten insgesamt 93.1 mg hellgelbes Rohprodukt erhalten werden. Dieses wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt, wobei ein Lösemittelgradient bestehend aus *n*-Pentan und Diethylether (20:1 bis 12:1) angewendet wurde. Fraktionen mit Produkt (Nachweis über DC-Kontrolle) wurde anschließend vereinigt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer und im Stickstoffstrom entfernt. Hierbei konnte eine ausgeprägte Flüchtigkeit des Produkts beobachtet werden. Das Produkt wurde als farbloses Öl (45.6 mg) erhalten. Eine GC/MS Analyse offenbarte, dass das Nebenprodukt **113** (14.1 %) nicht abgetrennt werden konnte, sondern mit dem Hauptprodukt **112** (85.9 %) eluierte. Auf eine erneute chromatographische Reinigung wurde aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Verbindung **112** verzichtet.

R_f (**112**, **113**) = 0.34 (*n*-Pentan/Diethylether 12:1)

10.8.2 RILEY Oxidation**(-)- β -Pinen**

Selendioxid (9.4 mg, 85.5 μmol , 0.45 Äq.) wurde bei 0°C in 1 mL trockenem CH_2Cl_2 vorgelegt und *t*BuOOH (6 M in Decan, 30.8 mg, 342.1 μmol , 1.8 Äq.) zugetropft. Nach 15 min erfolgte eine tropfenweise Zugabe von (-)- β -Pinen (25.8 mg, 189.1 μmol , 1.0 Äq.) in 0.8 mL trockenem CH_2Cl_2 bei 0°C. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 15 min bei 0°C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte die vollständige Umsetzung an. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinten organischen Phasen einmal mit NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wurde unter Vakuum konzentriert und Pinocarveol (**160**) (18.2 mg, 131.8 μmol , 63 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Pentan/Diethylether 5:1) erhalten.^[179,180,190]

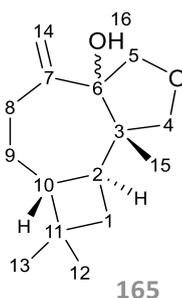


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.00 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-10b), 4.82 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-10a), 4.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-5), 2.52 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-2b), 2.39 (dtd, $J = 9.9, 5.9, 2.0$ Hz, 1H, H-3), 2.24 (ddt, $J = 14.6, 7.6, 2.0$ Hz, 1H, H-6b), 2.00 (qd, $J = 6.0, 5.1, 1.9$ Hz, 1H, H-1), 1.85 (ddd, $J = 14.6, 4.2, 1.1$ Hz, 1H, H-6a), 1.71 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-2a), 1.28 (s, 3H, H-8/9), 0.64 (s, 3H, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 156.3 (C-4), 111.6 (C-10), 67.2 (C-5), 50.7 (C-3), 40.6 (C-6), 40.0 (C-1), 34.6 (C-1), 28.1 (C-2), 26.1 (C-8), 22.1 (C-9); **HR-GCMS**: berechnet: 152.1201 [M]⁺, gefunden: 152.1200 [M]⁺.

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[181]

Biotransformiertes Produkt 112

Selendioxid (1.9 mg, 17.0 μmol , 0.5 Äq.) wurde bei 0°C in 1 mL trockenem CH_2Cl_2 vorgelegt und *t*BuOOH (6M in Decan, 6.1 mg, 68.1 μmol , 1.9 Äq.) zugetropft. Nach 15 min erfolgte eine tropfenweise Zugabe von **112** (7.8 mg, 35.3 μmol , 1.0 Äq.) in 1.0 mL trockenem CH_2Cl_2 bei 0°C. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 15 min bei 0°C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung verfärbte sich dabei leicht gelblich. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wurde unter Vakuum konzentriert und das Produkt (**165**) (5.8 mg, 24.4 μmol , 69 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Pentan_{dest.}/Diethylether 3:1) erhalten.

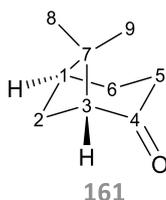


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.10 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-14b), 4.88 (dt, $J = 1.5, 0.8$ Hz, 1H, H-14a), 4.16 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-5b), 3.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4b), 3.58 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-5a), 3.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4a), 2.20 (ddd, $J = 13.7, 8.3, 5.7$ Hz, 1H, H-8b), 2.03 – 2.00 (m, 1H, H-8a), 2.00 – 1.96 (m, 1H, H-2), 1.78 (td, $J = 11.0, 6.1$ Hz, 1H, H-10), 1.41 (dq, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-9b), 1.34 – 1.30 (m, 2H, H-1), 1.19 (dddd, $J = 12.4, 11.1, 8.3, 5.9$ Hz, 1H, H-9a), 1.06 (s_{br} , 1H, H-16), 0.96 (s, 3H, H-15), 0.93 (s, 3H, H-12), 0.88 (s, 3H, H-13); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 151.1 (C-7), 113.8 (C-14), 86.1 (C-6), 79.5 (C-4), 78.9 (C-5), 48.3 (C-3), 44.4 (C-10), 40.2 (C-2), 34.5 (C-1), 33.6 (C-11), 31.5 (C-8), 30.3 (C-12), 28.5 (C-9), 22.6 (C-13), 14.2 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 236.1776 $[\text{M}]^+$; 218.1670 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, gefunden: 218.1602 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

10.8.3 Ozonolyse

(-)- β -Pinen

Ozon wurde durch eine Lösung von (-)- β -Pinen (**158**) (11.2 mg, 82.4 μmol , 1.0 Äq.) in 25 mL MeOH bei -78°C geleitet. Nachdem die Lösung eine blaue Färbung annahm, wurde noch eine Minute länger Ozon eingeleitet. Anschließend wurde Sauerstoff solange durch die Lösung geleitet, bis diese wieder farblos war. Im Anschluss wurde Dimethylsulfid (10.4 μL , 142.0 μmol , 1.7 Äq.) zugegeben und die Lösung unter Rühren auf RT aufgewärmt und weitere 5 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 (25 mL) und H_2O (25 mL) verdünnt und extrahiert. Die organische Phase wurde aufgefangen und die wässrige Phase noch weitere zweimal mit CH_2Cl_2 (25 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt mit NaCl-Lösung gewaschen und mittels Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Die Säulenchromatographie mit *n*-Pentan/Diethylether (10:1) lieferte ein farbloses Öl (**161**) (8.6 mg, 61.9 μmol , 75 %).^[182]

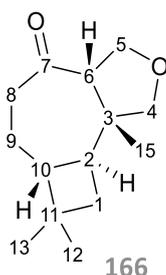


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 2.66 – 2.46 (m, 3H, H-5b, H-6b, H-3), 2.34 (ddd, $J = 19.1, 10.1, 2.1$ Hz, 1H, H-2b), 2.28 – 2.18 (m, 1H, H-5a), 2.05 (ddt, $J = 13.3, 11.1, 3.7, 2.1$ Hz, 1H, H-1), 1.94 (dddd, $J = 15.4, 8.4, 3.7, 1.9$ Hz, 1H, H-6a), 1.58 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2a), 1.33 (s, 3H, H-8), 0.85 (s, 3H, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 215.2 (C-4), 58.1 (C-3), 41.4 (C-7), 40.5 (C-6), 33.0 (C-5), 26.1 (C-1), 25.4 (C-2), 22.3 (C-8), 21.6 (C-9); **HR-GCMS**: berechnet: 138.1045 $[\text{M}]^+$, gefunden: 138.1047 $[\text{M}]^+$.

Die NMR-Daten stimmen mit denen in der Literatur angegebenen überein.^[182]

Biotransformiertes Produkt 112

Ozon wurde durch eine Lösung von **112** (6.0 mg, 27.0 μmol , 1.0 Äq.) in 25 mL MeOH bei -78°C geleitet. Nachdem die Lösung eine dauerhafte blaue Färbung annahm, wurde noch eine weitere Minute Ozon eingeleitet. Anschließend wurde die Lösung solange mit Sauerstoff gespült, bis diese wieder farblos war. Im Anschluss wurde Dimethylsulfid (3.4 μL , 46.6 μmol , 1.7 Äq.) zugegeben und die Lösung unter Rühren auf RT aufgewärmt und weitere 10 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 (25 mL) und H_2O (25 mL) verdünnt und extrahiert. Die organische Phase wurde aufgefangen und die wässrige Phase noch weitere dreimal mit CH_2Cl_2 (25 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt mit NaCl-Lösung gewaschen (3 x 25 mL) und mittels Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Eine Säulenchromatographie mit Kieselgel und *n*-Pentan/Diethylether (5:1) lieferte ein farbloses Öl (**166**) (5.0 mg, 22.5 μmol , 83 %).

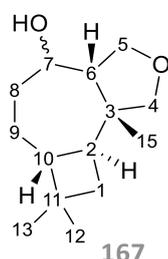


$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 4.54 (dd, $J = 9.2, 5.7$ Hz, 1H, H-5b), 3.74 (dd, $J = 9.2, 7.6$ Hz, 1H, H-5a), 3.32 – 3.25 (m, 2H, H-4), 2.30 (dd, $J = 7.6, 5.7$ Hz, 1H, H-6), 2.23 (dt, $J = 10.4, 4.0$ Hz, 1H, H-8b), 1.81 (ddd, $J = 13.0, 10.5, 4.0$ Hz, 1H, H-8a), 1.69 (ddd, $J = 10.8, 10.0, 8.2$ Hz, 1H, H-2), 1.63 – 1.54 (m, 1H, H-10), 1.30 – 1.23 (m, 2H, H-9), 1.23 – 1.15 (m, 2H, H-1), 0.94 (s, 3H, H-15), 0.88 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, H-12), 0.75 (s, 3H, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 209.2 (C-7), 79.3 (C-4), 68.9 (C-5), 64.5 (C-6), 46.8 (C-10), 45.1 (C-3), 43.6 (C-8), 42.3 (C-2), 34.8 (C-1), 34.4 (C-11), 30.1 (C-12), 25.8 (C-9), 22.5 (C-15), 22.1 (C-13); **HR-GCMS**: berechnet: 222.1620 $[\text{M}]^+$, gefunden: 222.1622 $[\text{M}]^+$.

10.8.4 Reduktion

Ozonolyseprodukt 166

166 (2.5 mg, 11.2 μmol , 1.0 Äq.) wurde in 1,5 mL MeOH vorgelegt und NaBH_4 (0.6 mg, 16.9 μmol , 1.5 Äq.) portionsweise bei 0°C hinzugegeben. Mittels DC wurde das Ende der Reaktion nach 45 min ermittelt und die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung beendet. Es wurde DCM hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Pentan/ Diethylether 2:1). Das Produkt **167** (2.5 mg, 11.1 μmol , 98.3 %) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.^[190,191]

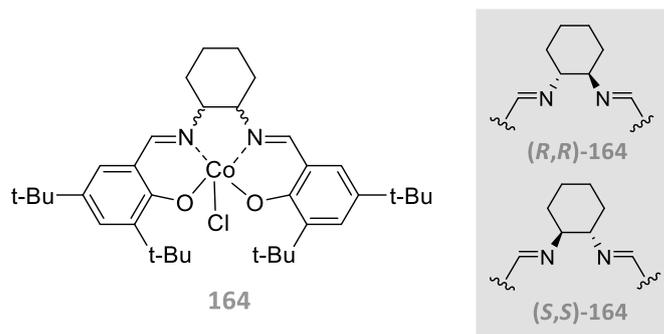


$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 3.90 (dd, $J = 8.9, 7.8$ Hz, 1H, H-5b), 3.72 (dd, $J = 8.9, 4.6$ Hz, 1H, H-5a), 3.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4b), 3.51 (dt, $J = 7.0, 1.7$ Hz, 1H, H-7), 3.38 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4a), 2.56 (td, $J = 10.5, 8.3$ Hz, 1H, H-2), 1.80 (ddt, $J = 14.1, 7.0, 4.1$ Hz, 1H, H-8b), 1.66 (qd, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 1H, H-9b), 1.51 – 1.47 (m, 1H, H-10), 1.45 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-1b), 1.43 – 1.40 (m, 1H, H-6), 1.34 (ddd, $J = 10.4, 8.3, 0.8$ Hz, 1H, H-1a), 1.26 (dq, $J = 12.5, 4.0$ Hz, 1H, H-9a), 1.03 (s, 3H, H-13), 1.00 (s, 3H, H-12), 1.04 – 0.97 (m, 1H, H-8a), 0.92 (d, $J = 0.5$ Hz, 3H, H-15); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 81.4 (C-4), 73.6 (C-7), 73.2 (C-5), 57.3 (C-6), 47.0 (C-10), 46.3 (C-3), 40.7 (C-2), 34.8 (C-1), 34.4 (C-8), 34.2 (C-11), 30.4 (C-12), 23.4 (C-9), 23.4 (C-15), 22.7 (C-13); **HR-GCMS**: berechnet: 224.1776 [M] $^+$; 206.1671 [M-H $_2\text{O}$] $^+$, gefunden: 206.1671 [M-H $_2\text{O}$] $^+$.

10.8.5 Isomerisierung nach SHENVI

Darstellung Co(salen ^tBu ^tBu)-Cl-Komplex

Das kommerziell verfügbare (*R,R*)-**163** bzw. (*S,S*)-**163** (1.00 mmol, 603.7 mg, 1 Äq.) wurde in einen Rundkolben mit CH_2Cl_2 (50 mL) gegeben, wodurch eine rote Suspension entstand. $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (190.1 mg, 1.00 mmol, 1 Äq.) wurde zugegeben und die resultierende Lösung für 1 h stark gerührt. Die dunkel grüne Lösung wurde mit NaCl -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, über Celite filtriert und anschließend im Vakuum konzentriert, wodurch ein dunkel grüner Feststoff erhalten wurde. Dieser wurde in 50 mL *n*-Pentan resuspendiert, filtriert und mit zusätzlichem Pentan gewaschen. Der Co-(salen, ^tBu , ^tBu)-Cl-Komplex **164** ((*R,R*)-**164**: 198.5 mg, 0.31 mmol, 73 %, (*S,S*)-**164**: 186.7 mg, 0.29 mmol, 69 %) wurde als dunkel grüner Feststoff erhalten.^[186]

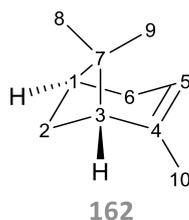


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 7.82 (s, 2H, H-Ar), 7.47 (s, 2H, H-Ar), 7.44 (s, 2H, H-allyl), 3.64 – 3.56 (m, 2H, H-aliph.), 3.11 – 3.01 (m, 2H, H-aliph.), 2.05 – 1.97 (m, 2H, H-aliph.), 1.95 – 1.86 (m, 2H, H-aliph.), 1.74 (s, 18H, H- $t\text{Bu}$), 1.62 – 1.55 (m, 2H, H-aliph.), 1.30 (s, 18H, H- $t\text{Bu}$).

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[186]

(-)- β -Pinen (exemplarisch für (S,S) -Co-(salen $t\text{Bu } t\text{Bu}$)Cl)

Zu einer Lösung aus (-)- β -Pinen (**158**) (42.0 mg, 205 μmol , 1,0 Äq.) in entgastem Benzol wurde eine Lösung des (S,S) -Cobalt-Katalysators (**164**) (6.0 mg, 10.3 μmol , 5 mol%) in entgastem Benzol und Phenylsilan (1.23 μL , 10.0 μmol , 5 mol%) gegeben. Die resultierende rote Lösung wurde unter Ar-Atmosphäre bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt durch eine Säulenchromatographie (Kieselgel, *n*-Pentan) gereinigt und das Rohprodukt bestehend aus **158** und **162** (23.0 mg, 168.9 μmol) als farbloses Öl erhalten. Durch eine gaschromatographische Analyse konnte die Ausbeute an **162** auf 56 % ermittelt werden. Die Umsetzung mit dem (R,R) -Cobalt-Katalysator erfolgte in analoger Vorgehensweise und lieferte (-)- α -Pinen (**162**) in 48 % Ausbeute.^[183]



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.19 (dq, $J = 3.0, 1.6$ Hz, 1H, H-5), 2.36 (s, 1H, H-2b), 2.19 (dq, $J = 14.7, 2.5$ Hz, 2H, H-6), 2.07 (tt, $J = 5.9, 2.6$ Hz, 1H, H-1), 1.93 (td, $J = 5.6, 1.4$ Hz, 1H, H-3), 1.66 (q, $J = 2.0$ Hz, 3H, H-10), 1.26 (s, 3H, H-8), 1.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2b), 0.83 (s, 3H, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 144.7 (C-4), 116.2, (C-5), 47.2 (C-3), 40.9 (C-1), 38.1 (C-7), 31.6 (C-2), 31.4 (C-6), 26.5 (C-10), 23.1 (C-8), 21.0 (C-9).

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[184]

10.9 Mutagenesestudien

10.9.1 Analytische Enzymtests und semi-quantitative Analyse

Analytische Enzymtests wurden in Analogie zu den bereits unter Kap. 10.5 beschriebenen Umsetzungen mit dem Wildtyp in einem 500 μL Maßstab umgesetzt. Nach Vorlegen eines 50 mM HEPES Puffers pH 7.5 wurden 5 mM MgCl_2 zugesetzt sowie 150 μM FPP (**12**). Anschließend erfolgte die Zugabe von 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ der BcBOT2-Mutanten. Nach Homogenisierung wurden die Enzymtests bei 25°C über 20 min inkubiert, ehe 100 μL *n*-Hexan zugesetzt wurden und die Proben 30 sek extrahiert wurden. Die organische Phase wurde abgenommen und im Falle einer semi-quantitativen Analyse, mit einer bekannten Menge des internen Standards (β -Caryophyllen, α -Humulen oder *E,E*-Farnesol) versetzt und mittels GC-MS analysiert (**Tabelle 98**). Neben der Dreifachbestimmung der Biotransformation wurden zwei Negativkontrollen angesetzt, die entweder ohne Enzym oder Substrat inkubiert worden sind.

Für die Überprüfung der Thermostabilität wurden die Enzymtests bei unterschiedlichen Temperaturen (20°C – 50°C) in einer Dreifachbestimmung inkubiert und die Ausbeute an Produkt (**29** bzw. **178** bei W118Q) durch Zugabe eines internen Standards bestimmt.

Experimenteller Teil – Thema I

Tabelle 98: Semi-quantitative Bestimmung in Prozent [%] der detektierten Verbindungen für den Wildtyp (WT) und die zehn Mutanten. Konnte eine Verbindung aus dem Wildtyp nicht bei den Mutanten nachgewiesen werden, so ist diese mit einem Querstrich (-) gekennzeichnet. Ausbeuten mit einer Angabe „<“ wurden nicht semi-quantitativ berechnet, sondern aus den berechneten Ausbeuten der weiteren Nebenprodukte abgeleitet. Alle Berechnungen beruhen auf einer Dreifachbestimmung der Biotransformationen.

Produkt	WT	R373G	R373H	F138V	F138Y	Y211S	Y211F	T242N	T242S	W118Q	T282S
170	0.4 ± 0.1	< 0.1	< 0.1	3.2 ± 0.2	< 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	-	0.5 ± 0.1
98	0.9 ± 0.1	-	-	0.2 ± 0.1	-	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	-	0.7 ± 0.2
171	< 0.1	-	-	< 0.1	-	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.1	-	< 0.2
172	< 0.2	-	-	-	-	0.2 ± 0.1	< 0.2	< 0.1	< 0.2	-	< 0.2
149	0.5 ± 0.1	-	-	0.3 ± 0.1	-	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	-	0.6 ± 0.1
173	< 0.2	-	-	0.4 ± 0.1	-	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.2	-	< 0.2
174	< 0.1	-	-	-	-	1.3 ± 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.2	-	< 0.2
24	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	< 0.1	6.8 ± 0.4	0.2 ± 0.1	< 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	< 0.2	< 0.2
99	0.3 ± 0.1	-	-	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	< 0.1	< 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	-	< 0.2
175	< 0.2	-	-	-	-	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.2	-	< 0.2
62	< 0.2	-	-	-	-	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.2	< 0.1	< 0.2
176	0.5 ± 0.1	-	-	4.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	< 0.2	-	0.6 ± 0.1
97	< 0.1	-	-	-	-	< 0.1	< 0.1	< 0.2	0.5 ± 0.1	-	< 0.2
100	< 0.1	-	-	-	-	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.2	-	< 0.2
177	0.8 ± 0.1	< 0.1	< 0.1	3.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1
29	52.6 ± 4.2	-	-	4.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1	50.1 ± 3.3	49.4 ± 7.1	49.2 ± 1.3	50.6 ± 5.3	0.7 ± 0.1	43.9 ± 0.5
178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.7 ± 0.8	-

10.9.2 Semi-präparative Biotransformationen von FPP mit punktmutierter STC BcBOT2

Die semi-präparativen Biotransformationen mit den BcBOT2-Mutanten W118Q und F138V wurden in einem *Fed-Batch* Prozess mit einer kontinuierlichen Substratzugabe durchgeführt (**Tabelle 99**). Dazu wurde zunächst ein 50 mM HEPES Puffer pH 7.5 vorgelegt und dieser mit Tween[®]20 sowie PPase versetzt. Anschließend wurde das Enzym und der Cofaktor in Form von MgCl₂ zugesetzt und die Reaktionslösung auf Inkubationstemperatur temperiert. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Biotransformation durch Zugabe von 200 µM FPP (**12**) gestartet. Anschließend wurde das Substrat kontinuierlich (µM/h) dem Ansatz zugefügt. Nach vollständiger Zugabe des Substrates wurde der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert, ehe Prot K und CaCl₂ zugesetzt wurden. Nach Beendigung des Enzymabbaus wurde der Ansatz über Nacht extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase weitere dreimal mit *n*-Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel vollständig entfernt.

Tabelle 99: Ansatzgrößen, Reaktionsbedingungen und zugesetzte Reaktanden für die semi-präparativen Umsetzungen von der BcBOT2-Mutanten W118Q und F138V mit dem natürlichen Substrat FPP. Weiterhin sind Informationen zur Extraktion sowie zur Ausbeute der Rohprodukte angegeben.

Ansatzgröße	BcBOT2-F138V	BcBOT2-W118Q
c(Substrat) [mM]	1.5	1.5
Puffer	50 mM ^A	50 mM ^A
Gesamtvolumen [mL]	254 ^B	46
Startbedingungen		
c(Substrat) [μM]	200	200
c(Enzym) [g·L⁻¹]	0.1 ^C	0.1 ^C
c(MgCl₂) [mM]	25	25
Tween®20 [% (v/v)]	0.02	0.02
PPase [U]	1	1
Reaktionsbedingungen		
Temperatur [°C]	25	30
pH	7.5	7.5
Ω [U·min⁻¹]	180	180
Inkubationsdauer und Substratzugabe		
Art der Zugabe	kont. ^D	kont. ^D
c(Substrat) [μM/h]	400	400
Inkubationsdauer [h]	4.5	4.5
Enzymabbau		
Proteinase K [U]	75	75
c(CaCl₂) [mM]	5.0	5.0
Temperatur [°C]	28	28
Inkubationsdauer [h]	1.0	1.0
Aufarbeitung (Extraktion)		
Lösemittel	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan
Ω [U·min⁻¹]	180	100
Temperatur [°C]	16	16
Extraktionsdauer [h]	18 h	18 h
Ausbeute		
in [mg]	45.6	22.5
in [μM]	207.0	101.1
in [%]	54.4	73.0

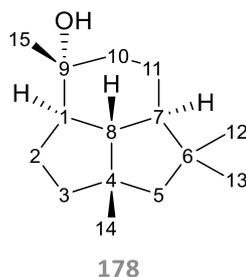
^A 50 mM HEPES Puffer mit 5 mM DTT

^B Es wurden jeweils fünf Ansätze mit einem Volumen von 46.1 mL und eine weitere Umsetzung mit einem Volumen von 23.1 mL durchgeführt.

^C Das Enzym wurde nach 2 h und 4 h erneut zugesetzt (jeweils 0.1 g·L⁻¹), um einem Aktivitätsverlust vorzubeugen.

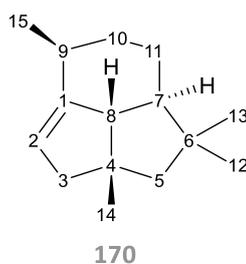
^D kont.: kontinuierliche Substratzugabe

Die Biotransformation von BcBOT2-W118Q lieferte in 73% Ausbeute ein hellgelbes, öliges Rohprodukt, welches das Produkt **178** mit einem Anteil von 75 % enthielt.

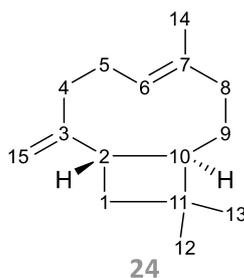


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 1.79 (ddd, $J = 12.6, 4.5, 1.9$ Hz, 1H, H-10b), 1.78 – 1.74 (m, 1H, H-2b), 1.60 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-5b), 1.62 – 1.58 (m, 2H, H-3b), 1.58 – 1.53 (m, 1H, H-1), 1.54 – 1.50 (m, 1H, H-11b), 1.50 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-5a), 1.47 (dd, $J = 9.5, 2.9$ Hz, 1H, H-2a), 1.46 – 1.42 (m, 1H, H-3a), 1.39 (dd, $J = 12.6, 5.3$ Hz, 1H, H-10a), 1.28 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-8), 1.21 – 1.15 (m, 1H, H-7), 1.14 (s, 3H, H-15), 1.09 (qd, $J = 11.9, 4.5$ Hz, 1H, H-11a), 1.04 (s, 2H, H-14), 0.97 (s, 3H, H-12), 0.88 (s, 3H, H-13); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 75.3 (C-9), 64.1 (C-8), 62.5 (C-1), 61.1 (C-7), 59.0 (C-5), 46.7 (C-6), 46.1 (C-10), 45.6 (C-3), 42.4 (C-4), 31.1 (C-14), 30.1 (C-2), 29.0 (C-12), 27.3 (C-4), 22.3 (C-13), 21.9 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 222.1984 $[\text{M}]^+$; 204.1878 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, gefunden: 204.1879 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Die Biotransformation von BcBOT2-F138V lieferte ein hellgelbes öliges Rohprodukt in 54 % Ausbeute. Die Reinheiten der Verbindungen **24**, **29**, **170**, **176** und **177** wurden anhand der prozentualen Flächenprozent im Chromatogramm bestimmt. Die NMR-Daten für PSP (**29**) sind unter 10.6 hinterlegt.

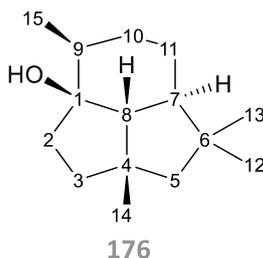


$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 4.95 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-2), 2.77 – 2.70 (m, 1H, H-9), 2.43 (dd, $J = 16.5, 1.8$ Hz, 1H, H-3b), 2.35 (dt, $J = 16.5, 2.5$ Hz, 1H, H-3a), 2.26 (dd, $J = 11.9, 2.6$ Hz, 1H, H-8), 1.65 – 1.59 (m, 1H, H-10b), 1.62 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-5b), 1.55 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-5a), 1.57 – 1.48 (m, 1H, H-10a), 1.45 (ddt, $J = 12.3, 4.7, 2.5$ Hz, 1H, H-11b), 1.31 (qd, $J = 12.3, 4.3$ Hz, 1H, H-11a), 1.17 (s, 3H, H-14), 1.10 (dd, $J = 7.1, 0.3$ Hz, 3H, H-15), 0.97 (td, $J = 12.0, 2.5$ Hz, 1H, H-7), 0.96 (s, 3H, H-12), 0.89 (s, 3H, H-13); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 151.6 (C-1), 113.8 (C-2), 63.5 (C-7), 63.4 (C-8), 59.8 (C-5), 52.0 (C-3), 43.5 (C-4), 42.6 (C-6), 36.9 (C-10), 33.0 (C-9), 30.4 (C-14), 28.1 (C-12), 22.4 (C-11), 21.6 (C-13), 19.0 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 $[\text{M}]^+$, gefunden: 204.1876 $[\text{M}]^+$.



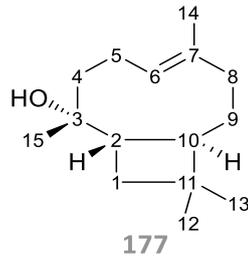
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.37 (dd, $J = 9.5, 5.8$ Hz, 1H, H-6), 5.04 – 5.03 (m, 1H, H-15b), 4.87 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H, H-15a), 2.47 – 2.38 (m, 1H, H-1b), 2.36 – 2.31 (m, 1H, H-5b), 2.29 (q, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-2), 2.18 – 2.13 (m, 1H, H-4b), 2.06 – 2.02 (m, 1H, H-8b), 2.02 – 1.96 (m, 1H, H-5a), 1.98 – 1.93 (m, 1H, H-4a), 1.94 – 1.88 (m, 1H, H-8a), 1.73 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-1a), 1.71 – 1.67 (m, 1H, H-10), 1.57 (s, 3H, H-14), 1.43 – 1.37 (m, 1H, H-9b), 1.36 – 1.30 (m, 1H, H-9a), 1.01 (s, 3H, H-12), 0.95 (s, 3H, H-13); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 154.6 (C-3), 135.3 (C-7), 124.9 (C-6), 112.2 (C-15), 53.8 (C-10), 48.9 (C-2), 40.7 (C-8), 40.3 (C-1), 35.1 (C-4), 33.1 (C-11), 30.2 (C-12), 29.7 (C-9), 28.8 (C-5), 22.7 (C-13), 16.4 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 204.1878 $[\text{M}]^+$, gefunden: 204.1878 $[\text{M}]^+$.

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[206]



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 1.88 – 1.81 (m, 1H, H-3b), 1.86 – 1.80 (m, 1H, H-2b), 1.72 – 1.65 (m, 1H, H-2a), 1.62 – 1.58 (m, 1H, H-3a), 1.62 – 1.56 (m, 1H, H-9), 1.56 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H, H-8), 1.51 (s, 1H, H-5), 1.47 – 1.40 (m, 1H, H-10b), 1.33 (s, 3H, H-14), 1.36 – 1.27 (m, 1H, H-10a), 1.34 – 1.27 (m, 1H, H-11b), 1.18 – 1.09 (m, 1H, H-11a), 1.15 – 1.07 (m, 1H, H-7), 0.95 (s, 3H, H-12), 0.90 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-15), 0.81 (s, 3H, H-13); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 84.5 (C-1), 63.9 (C-8), 59.4 (C-5), 51.7 (C-7), 46.2 (C-4), 42.7 (C-3), 40.5 (C-6), 39.7 (C-2), 36.9 (C-9), 31.4 (C-14), 29.9 (C-10), 28.8 (C-12), 22.3 (C-13), 20.3 (C-11), 15.7 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 222.3720 $[\text{M}]^+$; 204.1878 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, gefunden: 204.1875 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[209,210]



¹H NMR (600 MHz, C₆D₆, 253.3 K) δ [ppm]: 5.37 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 2.14 – 2.07 (m, 1H, H-5b), 2.02 – 1.97 (m, 1H, H-5a), 1.89 (dt, $J = 7.3, 3.6$ Hz, 1H, H-8b), 1.84 (qd, $J = 12.3, 3.9$ Hz, 1H, H-8a), 1.64 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-1b), 1.61 – 1.56 (m, 1H, H-10), 1.49 – 1.46 (m, 1H, H-1a), 1.47 – 1.46 (m, 3H, H-14), 1.45 – 1.43 (m, 1H, H-2), 1.43 – 1.41 (m, 1H, H-4b), 1.41 – 1.38 (m, 1H, H-4a), 1.34 – 1.30 (m, 1H, H-9b), 1.18 (dddd, $J = 14.5, 12.8, 10.7, 4.0$ Hz, 1H, H-9a), 0.96 (s, 3H, H-12), 0.87 (s, 3H, H-13), 0.82 (s, 3H, H-15); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 135.8 (C-7), 123.5 (C-6), 73.2 (C-3), 52.6 (C-2), 46.8 (C-10), 41.7 (C-4), 40.7 (C-8), 37.5 (C-1), 31.8 (C-11), 31.1 (C-15), 30.6 (C-9), 30.2 (C-12), 23.8 (C-13), 23.4 (C-5), 16.4 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 222.3720 [M]⁺; 204.1878 [M-H₂O]⁺, gefunden: 204.1879 [M-H₂O]⁺.

11 Experimenteller Teil – Thema II

11.1 Lipase *Candida rugosa* Typ VII

Für die analytischen Enzymtests mit der Lipase *Candida rugosa* Typ VII von Sigma Aldrich ($880 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) wurde zunächst mittels Feinwaage eine exakte Enzymmenge abgewogen und das Gesamtvolumen der Biotransformation auf die Einwaage an Enzym berechnet, sodass Enzymkonzentrationen von $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ für primäre Alkohole und $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ für sekundäre und tertiäre Alkohole erhalten wurden. Die Zugabe des Acyldonors sowie der Alkoholsubstrate erfolgte ausgehend von Stammlösungen. Als geeignetes Lösemittel konnte *n*-Hexan ermittelt werden. Das zugesetzte Verhältnis von Substrat zu Acyldonor betrug für primäre Alkohole 1:3, während für sekundäre und tertiäre Alkohole ein Verhältnis von 1:6 gewählt wurde. Die zugesetzte Konzentration als Substrat belief sich je Enzymtests auf 12.8 mM. Die Konzentration an Vinylacetat als Acyldonor betrug bei primären Alkoholen 38.4 mM und bei höher substituierten Substraten 76.8 mM. Das Gesamtvolumen der Enzymtests belief sich in etwa auf 1.0 mL, wobei sich das exakte Volumen aus der Masse der eingesetzten Lipase CrL ergab. Negativkontrollen wurden ohne die Zugabe der Lipase CrL angesetzt, um die Möglichkeit einer autokatalytischen Umsetzung auszuschließen. Die Enzymtests wurden in verschließbaren Glasgefäßen durchgeführt und je nach Substitutionsgrad des Substrates länger als 24 h (primäre Alkohole) oder als 180 h (sekundäre, tertiäre Alkohole) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und $180 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ in *n*-Hexan inkubiert. Nach Beendigung der Biotransformation wurde die organische Phase abdekantiert und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, um mögliche Lipaserückstände zu entfernen. Anschließend wurde die so erhaltene organische Phase direkt für eine GC-MS Analytik verwendet. Zur Bestimmung der Umsatzrate wurden die integrierten Peakflächen des Produkts zu der des eingesetzten Substrats ins Verhältnis gesetzt. Die Biotransformationen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einer Dreifachbestimmung.

11.1.1 Optimierungen

Im Rahmen der Optimierungen wurde neben der Enzymmenge und dem Verhältnis von Substrat zu Acyldonor auch die Parameter Temperatur und Lösemittel untersucht. Im Falle der Temperaturoptimierung wurde dabei eine zeitabhängige Optimierung durchgeführt, sodass gleichzeitig Aussagen zur Dauer der Inkubation für primäre und sekundäre Alkohole getroffen werden konnten. Die Enzymtests wurden in Analogie zu den in Kap. 11.1 beschriebenen Vorgehensweise angesetzt und aufgearbeitet. Lediglich der zu optimierende Parameter wurde entsprechend der nachfolgenden **Tabelle 100** variiert. Die Konzentration an eingesetztem Substrat belief sich jeweils auf 12.8 mM, während mit Ausnahme der Optimierung des Substrat-Acyldonor Verhältnisses die Konzentrationen an Vinylacetat auf 38.4 mM (Verhältnis 1:3) bzw. 76.8 mM (Verhältnis 1:6) festgelegt wurde. Die Verhältnisse sowie die weiteren Parameter für die Enzymtests während der Optimierungen können der **Tabelle 101** entnommen werden.

Tabelle 100: Zu optimierende Parameter sowie deren Optimierungsbereich und festgelegten Prüfwerte. Enzymkonzentration: $c(\text{CrL})$ [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$], Substrat (S)-Acyldonor (AD) Verhältnis: $c(\text{S}):c(\text{AD})$, Temperatur: T [$^{\circ}\text{C}$], Inkubationszeit: t [h], Lösemittel: LM [$\log P$].

Parameter	Optimierungsbereich	festgelegte Prüfwerte
$c(\text{CrL})$ [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]	1.0 – 1.5	$1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} - 1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
$c(\text{Substrat}) : c(\text{Donor})$	1:1 – 1:6	1:1 – 1:2 – 1:3 – 1:4 – 1:6
T [$^{\circ}\text{C}$]	20 – 50	$20^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$
t [h]	24 - 188	24 h – 48 h – 72 h – 96 h – 165 h – 188 h
LM [$\log P$]	$\log P$ 0.7 – 4.0	Ethylacetat – Diethylether – Toluol – <i>n</i> -Hexan – <i>n</i> -Heptan ^A

^A Angeordnet nach aufsteigendem $\log P$ -Wert.

Tabelle 101: Reaktionsparameter und Konzentrationen bzw. Verhältnisse der Reaktanden für die einzelnen Optimierungsschritte. Der jeweils zu optimierende Parameter ist grau (Spalte) eingefärbt und wurde hinsichtlich der in **Tabelle 100** festgelegten Prüfwerte untersucht. Im oberen Tabellenabschnitt sind die Parameter für die Biotransformation mit einem primären Alkohol und im unteren Tabellenabschnitt jene für die Umsetzung mit sekundären und tertiären Alkoholen angegeben. Die Optimierung der Reaktionsparameter Temperatur [T], Zeit [t] und Lösemittel [LM] erfolgten nur mit primär und sekundäre substituierten Alkoholen.

primär	$m(\text{CrL})$	$c(\text{S}):c(\text{AD})$	T	t	LM
$m(\text{CrL})$		1:3	40°C	115 h	Toluol
$c(\text{S}):c(\text{AD})$	1.0		40°C	115 h	Toluol
T	1.0	1:3		24 h – 188 h	Toluol
t	1.0	1:3	$20^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$		Toluol
LM	1.0	1:3	40°C	24 h/ 144 h ^A	
sek./tert.	$m(\text{CrL})$	$c(\text{S}):c(\text{AD})$	T	t	LM
$m(\text{CrL})$		1:3	40°C	115 h	Toluol
$c(\text{S}):c(\text{AD})$	1.0		40°C	115 h	Toluol
T	1.5	1:6		24 h – 188 h	Toluol
t	1.5	1:6	$20^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$		Toluol
LM	1.5	1:6	40°C	144 h	

^A 24 h Inkubationsdauer für die unpolaren Lösemittel und 144 h für die polaren Lösemittel Ethylacetat und Diethylether.

11.1.2 Studien zur absoluten Stereochemie des Cyclademol

Die Isolierung des Cyclademol Hauptdiastereomer erfolgte mittels pHPLC. Dazu wurde eine polare stationäre Phase sowie ein Hexan-MtBE Gradient verwendet (s. Kap. 9.2.9). Es erfolgten insgesamt 75 Zyklen mit einer Injektionsmenge von 25 μL , wobei eine Ausgangskonzentration des Cyclademol Seitenstroms von $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ gewählt wurde. Insgesamt wurden 65 mg des gereinigten Cyclademol-Diastereomers mit einer Reinheit von 98.1 % erhalten.

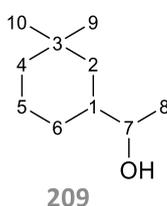
Die Enzymtests des isolierten Cyclademol-Diastereomers sowie des zur Verfügung gestellten Seitenstroms Cyclademol wurden entsprechend der **Tabelle 102** angesetzt und inkubiert. Die Durchführung der Enzymtests erfolgte in Analogie zu der unter Kap. 11.1 beschriebenen

Vorgehensweise. Als Acyldonor diente Vinylacetat. Die Enzymtests wurden in einer Doppelbestimmung sowie mit einer Negativkontrolle ohne Lipase CrL durchgeführt.

Tabelle 102: Konzentrationen an Lipase CrL, Substrat und Acyldonor in Form von Vinylacetat sowie die Angabe der Reaktionsparameter Temperatur [T], Inkubationsdauer [t] und das verwendete organische Lösemittel [LM]. Die Biotransformationen des isolierten Diastereomers sowie des Seitenstroms Cyclademol erfolgten in analoger Weise um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

	c(CrL)	c(Substrat)	c(Donor)	T	t	LM
Cyclademol	1.5 mg · mL ⁻¹	12.8 mM	76.8 mM	40°C	144 h	<i>n</i> -Hexan

Zur Bestimmung der absoluten Stereochemie des Cyclademol wurde eine MOSHER-Ester Analyse durchgeführt. Um eine Zuordnung der Protonen zu einen Signalen im ¹H-NMR-Spektrum zu ermöglichen, wurde zunächst Strukturaufklärung und Bestimmung der relativen Stereochemie des Cyclademol (**209**) durchgeführt.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 3.50 (p, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-7), 1.69 – 1.62 (m, 1H, H-6b), 1.58 (dt, *J* = 13.4, 2.8 Hz, 1H, H-5b), 1.54 – 1.49 (m, 1H, H-2b), 1.49 – 1.41 (m, 1H, H-1), 1.44 (qt, *J* = 16.9, 12.9, 3.7 Hz, 1H, H-5a), 1.39 – 1.31 (m, 1H, H-4b), 1.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-8), 1.06 (td, *J* = 13.2, 4.2 Hz, 1H, H-4a), 0.92 (s, 1H, H-10), 0.89 (s, 1H, H-9), 0.85 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-2a), 0.85 (dq, *J* = 12.0, 3.1 Hz, 1H, H-6a); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 72.6 (C-7), 41.6 (C-2), 40.9 (C-1), 39.4 (C-4), 33.7 (C-10), 30.7 (C-3), 28.6 (C-6), 24.8 (C-9), 22.3 (C-5), 20.6 (C-8).

(R)-MOSHER-Ester

Cyclademol (19.9 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM unter Schutzgasatmosphäre gelöst und bei 0°C mit Triethylamin (70 µL, 0.51 mmol, 4 Äq.) und DMAP (1.5 mg, 10.0 µmol, 0.1 Äq.) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des (*S*)-MTPA-Cl (28.6 µL, 0.15 mmol, 1.2 Äq.). Die Reaktion wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt und weitere zwei Stunden bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung beendet und die Lösung mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 29:1) wurde das Produkt in quantitativer Ausbeute (47.4 mg, 0.13 mmol) erhalten.

HR-GCMS: berechnet: 395.1810 [M+Na]⁺, gefunden: 395.1816 [M+Na]⁺; **DC R_f:** 0.72 (PE/EE 4:1).

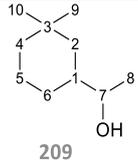
(S)-MOSHER-Ester

Cyclademol (19.9 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM unter Schutzgasatmosphäre gelöst und bei 0°C mit Triethylamin (70 µL, 0.51 mmol, 4 Äq.) und DMAP (1.5 mg, 10.0 µmol, 0.1 Äq.) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des (*R*)-MTPA-Cl (28.6 µL, 0.15 mmol, 1.2 Äq.). Die Reaktion wurde zwei Stunden bei 0°C gerührt, durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung beendet und die Lösung mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE → PE/EE 20:1) wurde das Produkt in 71% Ausbeute (33.5 mg, 90.0 µmol) erhalten.

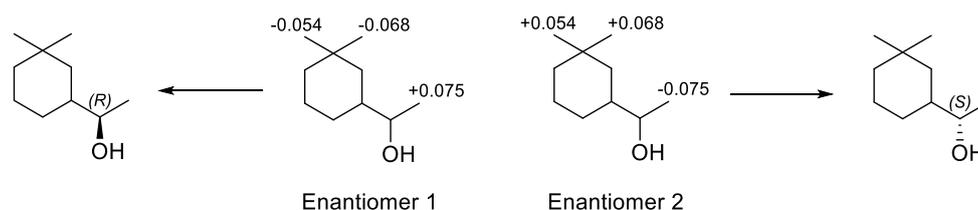
HR-GCMS: berechnet: 395.1810 [M+Na]⁺, gefunden: 395.1819 [M+Na]⁺; **DC R_f:** 0.72 (PE/EE 4:1).

In der nachfolgenden **Tabelle 103** sind die für die Bestimmung der absoluten Stereochemie am stereogenen Zentrum C-7 notwendigen chemischen Verschiebungen aufgelistet.

Tabelle 103: Für die Bestimmung der absoluten Stereochemie relevanten chemischen Verschiebungen der endständigen Methylgruppen in den (*S*)- und (*R*)-konfigurierten MOSHER-Estern sowie die durch Differenzbildung erhaltenen Werte zur Ermittlung der absoluten Konfiguration am Carbinol-Stereozentrum. Weiterhin ist der mittels chiraler GC ermittelte *ee*-Wert sowie die prozentualen Flächenanteile des isolierten Enantiomerenpaars angegeben.

 209	Enantiomer 1			Enantiomer 2		
	δ_S (Ester) [ppm]	δ_R (Ester) [ppm]	$\Delta\delta_{SR}$ [ppm]	δ_S (Ester) [ppm]	δ_R (Ester) [ppm]	$\Delta\delta_{SR}$ [ppm]
H-8	1.285	1.210	0.075	1.210	1.285	- 0.075
H-9	0.774	0.842	- 0.068	0.842	0.774	0.068
H-10	0.825	0.879	- 0.054	0.879	0.825	0.054

$$\Delta\delta^{SR} = \delta_S - \delta_R$$



	Enantiomer 1	Enantiomer 2	<i>ee</i> -Wert
Cyclademol	31.3 %	68.7 %	37.4 %

11.2 Lipoxygenase

11.2.1 Optimierung HPOD-Bildung

Photometrische Verfolgung der HPOD-Bildung

Zur Verfolgung der HPOD Bildung wurde ein analytischer Enzymtest bestehend aus 800 μM Linolsäure (LA) und 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LOX aus *Glycine max* (Carl Roth, LOX $\geq 100.000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) angesetzt. Als Puffer diente ein 0.1 M Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von pH 9.0. Dieser diente gleichzeitig auch als Blindwert. Für die Zugabe des Substrats LA und des Enzyms wurden Stammlösungen (16 mM LA und 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LOX in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0) angesetzt. Zur Überprüfung einer möglichen Autoxidation wurde zudem ein analytischer Enzymtest nur mit dem Substrat LA angesetzt und ohne LOX. Die Inkubationsdauer wurde mit der Substratzugabe gestartet. Um Messungen im linearen Bereich des Photometers zu gewährleisten wurden die Proben 1:25 mit Puffer verdünnt. Die Messungen erfolgten in einer Doppelbestimmung bei 234 nm über einen Zeitraum von 30 min, wobei zu Beginn alle 30 sek ein Messwert aufgezeichnet wurde. Nach Erreichen des Extinktionsmaximums wurden die Abstände zwischen den Messwerten erhöht. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz sowie einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 25000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^[338] Durch die Ermittlung des linearen Bereichs der Extinktionskurve konnte die Reaktionsgeschwindigkeit der HPOD-Bildung bestimmt werden.

pH- und Temperatur-Optimierung

Zur Steigerung der HPOD-Ausbeute wurden analytische Enzymtests bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen durchgeführt. Zudem erfolgten die pH-Optimierungen mit Puffern unterschiedlicher Molarität (50 mM, 0.1 M) um den Einfluss unterschiedlicher Ionenstärken auf die HPOD-Bildung zu beurteilen. Zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde der Fortschritt der Umsetzung über einen Zeitraum von 40 min (pH) bzw. 20 min (T) verfolgt, wobei alle 30 sek ein Messwert aufgezeichnet wurde. Zudem erfolgten alle Messungen in einer Dreifachbestimmung. Die Messungen erfolgten auf einer UV-transparenten 96 well Platte in einem 200 μL Maßstab mittels SPECTRAmax Plus³⁸⁴ und MultiskanTM GO Mikroplattenreader. Die Aufnahme der Messwerte erfolgte bei 234 nm – dem Absorptionsmaximum der LA-HPOD. Für die Temperaturoptimierung wurde ein Bereich von 20 - 45°C ausgewählt, während für die pH-Wert Optimierung verschiedenste Puffersysteme verwendet wurden, um einen pH-Wertbereich von pH 4.0 - 10.0 abzudecken (**Tabelle 104**). Hierbei wurden bevorzugt GOOD's Puffer verwendet, die sich durch eine enzymatische und hydrolytische Stabilität auszeichnen und nahezu temperatur- und konzentrationsbeständig sind.^[134]

Tabelle 104: Verwendete Puffer und deren pH-Werte für die Optimierung des pH-Wertes sowie die ausgewählten Temperaturen für die Temperatur-Optimierung.

Puffersysteme	pH [0.1 M Puffer]	pH [50 mM Puffer]
Citronensäure/NaH ₂ PO ₄ (1:2)	4.1	4.2
Citronensäure/NaH ₂ PO ₄ (1:2)	5.0	5.2
MES	6.1	6.0
HEPES	7.0	7.0
HEPES	8.1	8.0
Tris-HCl	9.1	9.2
CAPS	10.1	10.0
Temperatur [°C]	20 – 25 – 30 – 35 – 40 – 45	

ZU jedem analytischen Enzymtest wurden 85.5 µM LA sowie 2 µg · mL⁻¹ LOX pipettiert. Die Zugabe von Enzym und Substrat erfolgte ausgehend von angesetzten Stammlösungen (1.7 mM LA, 0.1 mg · mL⁻¹ LOX in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0). Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle nur mit dem Substrat LA durchgeführt. Für die Temperatur-Optimierung wurde als Puffer ein 0.1 M Tris-HCl Puffer mit einem pH-Wert von pH 9.1 genutzt, während die pH-Optimierung bei 22 °C durchgeführt wurde. Die Schichtdicke wurde automatisiert durch den Plattenreader bestimmt.

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit v wurde der lineare Bereich aus den Messpunkten der erzeugten Kurve ermittelt, indem das LAMBERT-BEER'sche Gesetz angewendet wurde (**Gleichung 4**).

$$v = m \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d}$$

Gleichung 4: Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit v . m : Steigung, d : Schichtdicke, ϵ : molare Extinktionskoeffizient ($\epsilon = 25000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Zur Bestimmung der maximalen Umsatzrate wurde das Maximum der Extinktion ermittelt und nach Berechnung der Konzentration diese ins Verhältnis zur eingesetzten Konzentration der LA gesetzt.

Tabelle 105: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit v und Umsatzrate für die HPOD-Bildung bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur [°C]	20	25	30	35	40	45
v [µM · min ⁻¹]	10.8 ± 1.5	7.8 ± 0.8	11.0 ± 0.6	12.7 ± 1.7	14.5 ± 0.7	10.9 ± 0.8
HPOD [%]	98.7 ± 9.1	93.0 ± 2.1	99.6 ± 0.6	96.0 ± 6.2	95.9 ± 2.9	97.1 ± 2.9

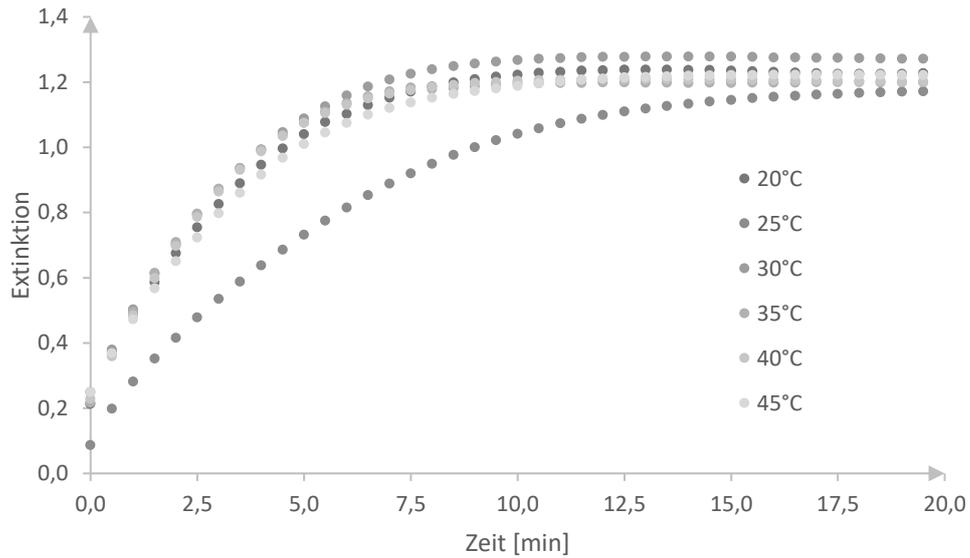


Abbildung 144: Auftragung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit. Es sind die Kurven für die Temperaturoptimierung im Bereich von 20°C – 45°C aufgetragen.

Tabelle 106: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit v und Umsatzrate für die HPOD-Bildung bei verschiedenen pH-Werten und Molaritäten der eingesetzten Puffersysteme.

pH [0.1 M]	4.1	5.0	6.1	7.0
v [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1
HPOD [%]	3.2 ± 0.8	5.7 ± 0.6	35.8 ± 1.2	86.3 ± 0.1
pH [0.1 M]	8.1	9.1	10.1	
v [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	8.1 ± 0.5	8.8 ± 0.8	8.6 ± 0.4	
HPOD [%]	95.6 ± 4.2	99.0 ± 5.1	99.1 ± 0.6	
pH [50 mM]	4.2	5.2	6.0	7.0
v [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	4.6 ± 0.2
HPOD [%]	2.3 ± 0.5	12.7 ± 1.6	34.3 ± 4.3	99.9 ± 0.3
pH [50 mM]	8.0	9.2	10.0	
v [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	7.9 ± 0.7	9.4 ± 0.4	9.7 ± 0.7	
HPOD [%]	97.0 ± 0.7	96.0 ± 3.3	96.1 ± 4.5	

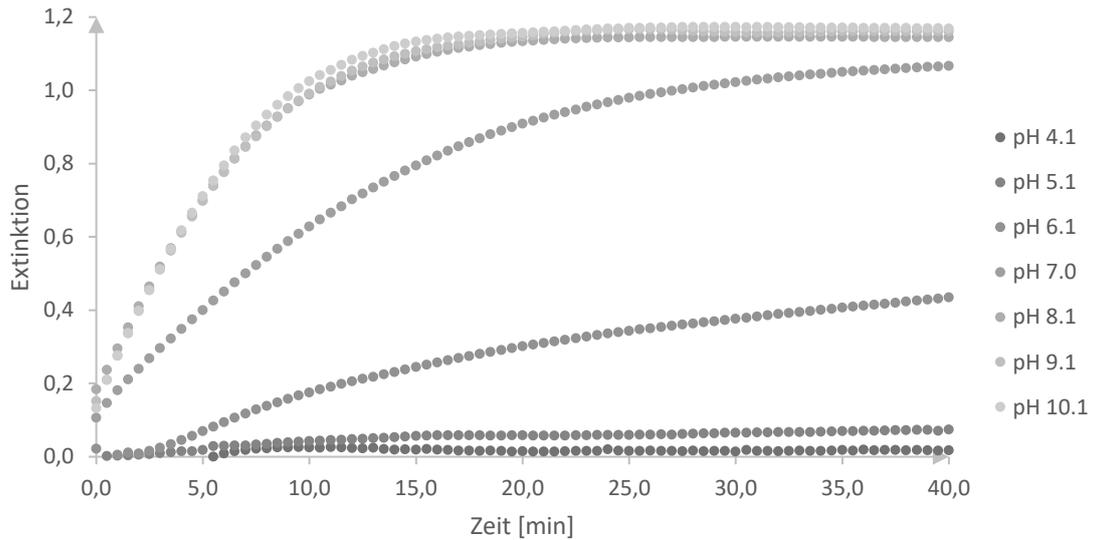


Abbildung 145: Auftragung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit. Es sind die Kurven für die pH-Wert Optimierung mit 0.1 M Puffern abgebildet.

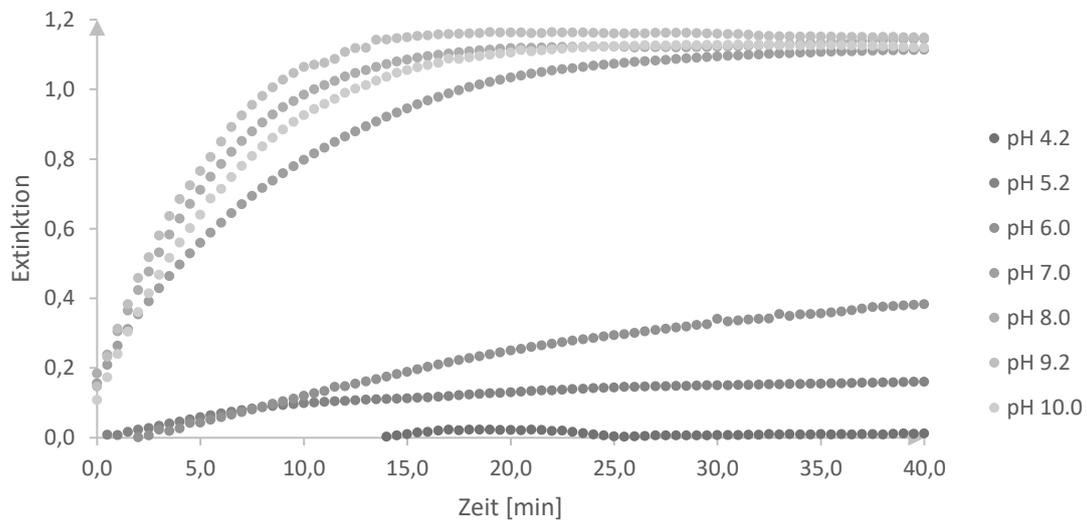


Abbildung 146: Auftragung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit. Es sind die Kurven für die pH-Wert Optimierung mit 50 mM Puffern abgebildet.

Einfluss von Lösemitteln und Aufarbeitung auf die HPOD-Extraktion

Für die Überprüfung des Einflusses von *n*-Hexan und MtBE auf das Extraktionsverhalten der HPOD erfolgte eine photometrische Messung bei 234 nm. Dazu wurden analytische Enzymtests bestehend aus 800 μM LA und $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 0.1 M Tris-HCl Puffer (pH 9.0) angesetzt und für 15 min bei 20°C und $200 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle als Referenzmessung ohne LOX angesetzt und analog inkubiert. Von der Negativkontrolle und einem Enzymtest wurde nach der Inkubationsdauer die Extinktion ermittelt. Die weiteren Enzymtests wurden mit 200 μL Lösemittel (*n*-Hexan oder MtBE) versetzt und 30 sek extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die Extinktion der wässrigen Phase ermittelt. Durch das LAMBERT-BEER'sche Gesetz

wurden anschließend die Konzentrationen an HPOD vor und nach der Extraktion in der wässrigen Phase bestimmt. Aus der Differenz konnte der Anteil an extrahierten HPOD ermittelt werden.

Zusätzlich wurde eine saure und basische Aufarbeitung auf das Extraktionsverhalten der HPOD und LA mit *n*-Hexan überprüft. Dazu wurden in analoger Weise analytische Enzymtests angesetzt und diese für 15 min bei 20°C und 200 U·min⁻¹ inkubiert. Anschließend wurde einem Enzymtests 1 % Ameisensäure zugesetzt. Die Enzymtests wurden anschließend zweimal mit *n*-Hexan (200 µL) extrahiert, das Lösemittel im Stickstoff-Strom entfernt und für die LC-QToF-Messung (**Abbildung 147, Abbildung 148**) in 1 mL MeOH gelöst.

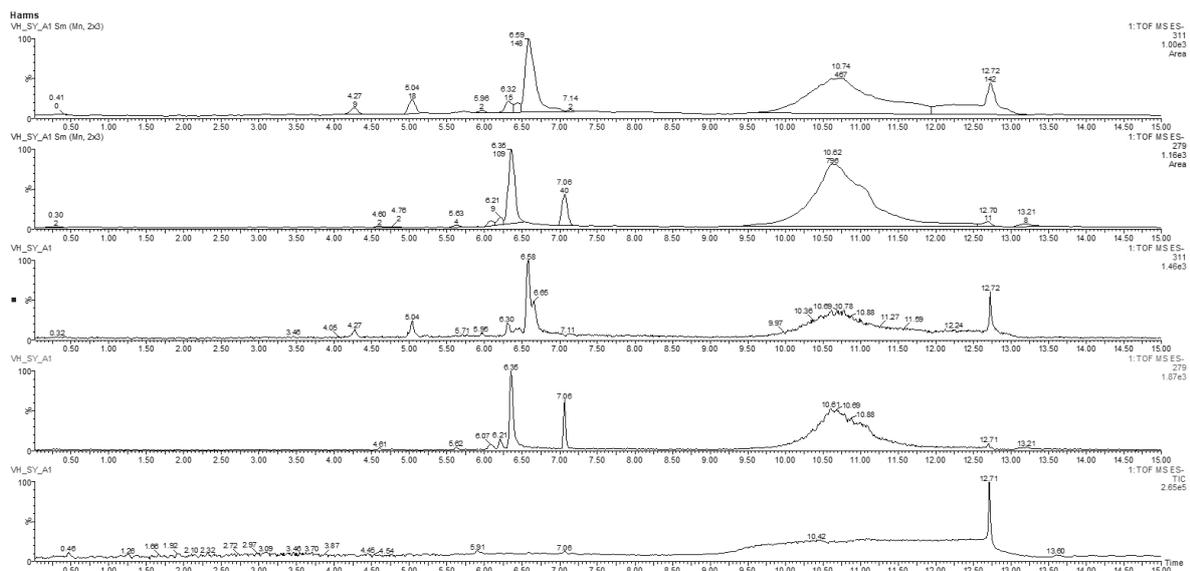


Abbildung 147: LC-QToF-Messung eines analytischen Enzymtests mit basischer Aufarbeitung (pH 9). Von unten nach oben: TIC-Spur, Massenspur *m/z* 279, Massenspur *m/z* 311, Integration *m/z* 279, Integration *m/z* 311.

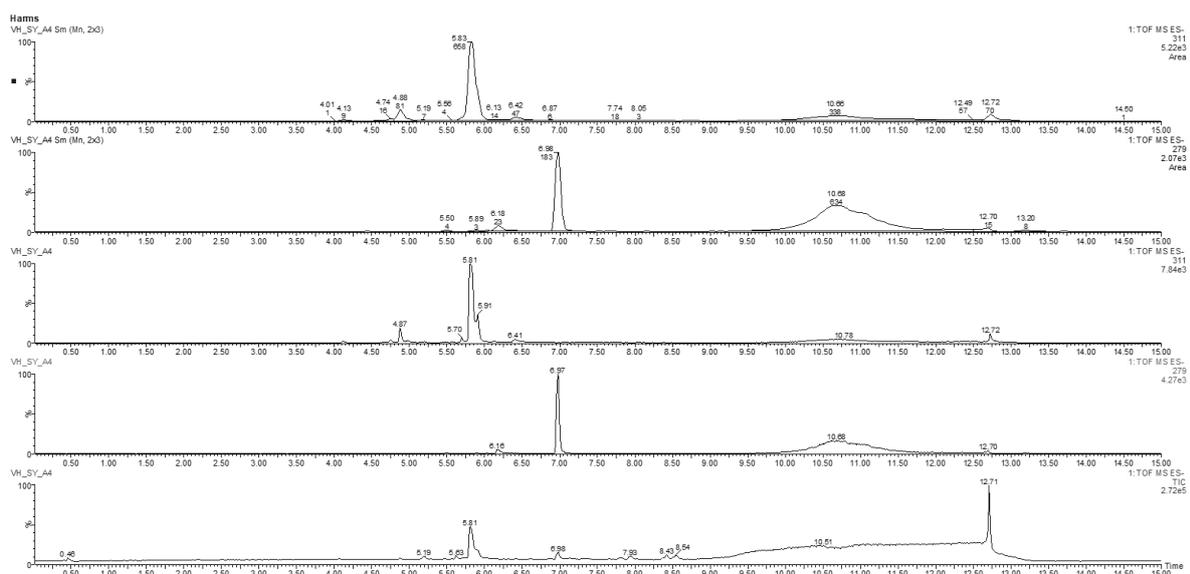


Abbildung 148: LC-QToF-Messung eines analytischen Enzymtests mit saurer Aufarbeitung (pH 3). Von unten nach oben: TIC-Spur, Massenspur *m/z* 279, Massenspur *m/z* 311, Integration *m/z* 279, Integration *m/z* 311.

11.2.2 Analytische Enzymtests

Allgemeine Versuchsvorschrift für einen einstufigen analytischen Enzymtest

Vor den eigentlichen analytischen Enzymtests wurden zunächst Stammlösungen der LA, des Cosubstrates und des Enzyms LOX angesetzt. Von der LA wurde eine 16 mM Stammlösung in 0.1 M HEPES mit einem pH-Wert von pH 8.5 angesetzt. Zusätzlich wurden 1.8 % [v/v] Tween®20 zur Verbesserung der Löslichkeit hinzugefügt. Die Stammlösungen des Cosubstrats wurden in Aceton angesetzt und beliefen sich auf 10 mM. Das Aceton diente gleichzeitig als Lösungsvermittler in den analytischen Enzymtests. Das Enzym LOX wurde als 1 mg · mL⁻¹ Stammlösungen in 0.1 M HEPES bei einem pH-Wert von pH 6.5 angesetzt.

Das Gesamtvolumen der analytischen Enzymtests belief sich auf 1.0 mL, wobei als Reaktionslösung ein 0.1 M HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 6.5 diente. Der Puffer wurde vorgelegt und mit 800 µM LA und 400 µM Cosubstrat versetzt. Dadurch ergab sich ein Volumenanteil von 4 % [v/v] Aceton. Durch die Zugabe von 200 U LOX wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 50°C über 72 h. Anschließend wurden die Enzymtests durch die Zugabe von 1 M NaOH basisch gestellt (pH 9) und zweimal mit *n*-Hexan (200 µL, 100 µL) über eine Dauer von 1 min extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 13.500 g über 3 min. Die organischen Phasen wurden vereinigt, zweimal mit 300 µL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die Phasen erneut durch Zentrifugation (4°C, 13.500 g, 3 min) getrennt. Die organische Phase wurde anschließend direkt für die GC-MS Analytik verwendet.

Allgemeine Versuchsvorschrift für einen zweistufigen analytischen Enzymtest

Für einen zweistufigen Enzymtest erfolgte zunächst die Produktion der HPOD und anschließend die Cooxidation mit dem Testsubstrat. Dazu wurden in Analogie zum einstufigen Enzymtest Stammlösungen der Substrate und des Enzyms LOX angesetzt. Anschließend wurde für die HPOD-Bildung zunächst eine Inkubation in einem 0.1 M Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von pH 9.0 in einem Gesamtvolumen von 1.0 mL durchgeführt. Dazu wurde der Puffer vorgelegt und 800 µM LA und 200 U LOX hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 40°C. Anschließend wurde der Enzymtests durch die Zugabe von Ameisensäure (1 % [v/v]) auf pH 3 eingestellt und die HPOD durch zweimalige Extraktion (300 µL, 1 min) mit MtBE in die organische Phase überführt. Die organische Phase wurde zweimal mit 300 µL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurden die HPOD in einem 0.1 M HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 6.5 gelöst und mit 400 µM Cosubstrat versetzt. Der Enzymtest wurde bei 50°C über 72 h inkubiert und anschließend in Analogie zum einstufigen Enzymtest aufgearbeitet.

Peroxidation mit H₂O₂

Für die Peroxidation mit H₂O₂ wurde zunächst eine 10 mM Valencen-Stammlösung in Methanol angesetzt. Anschließend wurde eine wässrige Lösung mit 0.1 % H₂O₂ vorgelegt und diese mit 400 µM Valencen versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 50 °C über 72 h. Die Aufarbeitung erfolgte in Analogie zum einstufigen analytischen Enzymtest.

11.2.3 Optimierungen der Cooxidation

Autoxidation

Die Überprüfung der Autoxidation erfolgte anhand eines einstufigen analytischen Enzymtests. Während zwei analytische Enzymtests nur mit 100 µM (+)-Valencen (**3**) angesetzt wurden und diese anschließend über 72 h bei 20°C bzw. 50°C inkubiert wurden, erfolgte ein weiterer Enzymtest mit 100 µM (+)-Valencen und 400 µM LA. Dieser wurde ebenfalls bei 50°C für 72 h inkubiert. Die Aufarbeitung der analytischen Enzymtests erfolgte in Analogie zur allgemein Versuchsvorschrift für die einstufigen analytischen Enzymtests (s. Kap. 11.2.2).

Extraktionsgüte der Terpene

Zur Überprüfung der Extraktionsgüte, wurden unterschiedliche Extraktionsprozesse mit *n*-Hexan als Extraktionsmittel und (+)-Valencen (**3**) als Testsubstrat durchgeführt. Die Ermittlung Extraktionsgüte erfolgte anhand der WFR des extrahierten (+)-Valencen (**3**). Dazu wurde zunächst eine externe Kalibrationskurve erstellt, um anschließend der Konzentration des extrahierten (+)-Valencens (**3**) zu ermitteln (**Abbildung 149**). Durch einen Vergleich der ermittelten mit der tatsächlich eingesetzten Konzentration wurde die WFR ermittelt. Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde eine 5 mM (+)-Valencen-Stammlösung in *n*-Hexan angesetzt und durch entsprechende Verdünnungen sieben Kalibrationspunkte in einem Konzentrationsbereich von 25 µM - 1.5 mM erstellt. Die resultierende Geradengleichung wies ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9988$ auf, sodass die Messung als statistisch abgesichert gilt.

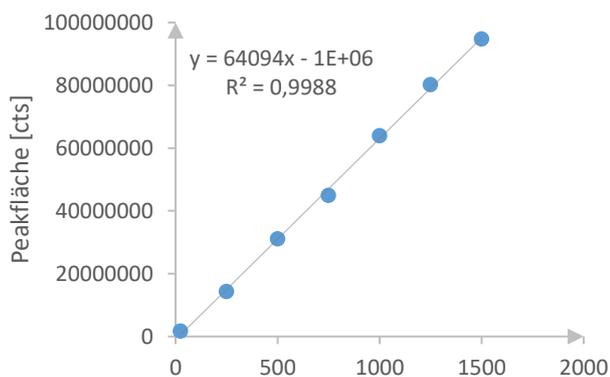


Abbildung 149: Kalibriergerade zur Konzentrationsbestimmung von extrahiertem (+)-Valencen (**3**). Es wurden Kalibrationspunkte im Bereich von 25 µM - 1.5 mM (+)-Valencen (**3**) ausgewählt.

Für die Probelösungen wurde eine wässrige 5 mM (+)-Valencen-Stammlösung angesetzt, welche zur Steigerung der Löslichkeit mit 14.4 % [v/v] Tween®20 versetzt wurde. Durch entsprechende Verdünnung wurden Probelösungen mit einer Konzentration von 200 µM (+)-Valencen (**3**) hergestellt und diese anschließend mit verschiedenen Volumina an *n*-Hexan und unterschiedlicher Extraktionszeit behandelt. Zusätzlich erfolgte ein Extraktionsprozess als zweistufiger Prozess. Die

Konzentration an extrahiertem (+)-Valencen (**3**) in der organischen Phase wurde anschließend anhand der Peakfläche im GC-MS sowie der Geradengleichung der Kalibriergeraden ermittelt.

Ein- und Zweiphasensystem

Für die analytischen Enzymtests wurde eine 16 mM LA-, eine 5 mM (+)-Valencen (**3**) - und eine $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LOX-Stammlösung in 0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) angesetzt. Als Homogenisationspuffer für die analytischen Enzymtests diente ein 0.1 M HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 6.5. Der Puffer wurde vorgelegt und $400 \text{ } \mu\text{M}$ LA und $200 \text{ } \mu\text{M}$ (+)-Valencen (**3**) zugesetzt. Durch die Zugabe von $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LOX wurde die Biotransformation gestartet. Das Zweiphasensystem wurde zusätzlich mit $200 \text{ } \mu\text{L}$ *n*-Hexan überschichtet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit $200 \text{ } \mu\text{M}$ (+)-Valencen (**3**). Die Inkubation erfolgte über eine Dauer von 70 h bei 20°C und $300 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Aufarbeitung erfolgte in Analogie zur allgemeinen Versuchsvorschrift eines einstufigen analytischen Enzymtests (s. Kap. 11.2.2).

Optimierungen

Alle Optimierungen wurden in einen einstufigen Prozess in analytischen Maßstab umgesetzt (s. Kap. 11.2.2). Die Prüfparameter (**Tabelle 107**) sowie abweichende Reaktionsparameter und Konzentrationen an Enzym, Substrat (LA) und Cosubstrat (+)-Valencen können der nachfolgenden **Tabelle 108** entnommen werden. Als Negativkontrolle diente ein analytischer Enzymtest ohne LOX und LA. Alle Messungen wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die prozentualen Flächenanteile des Nootkaton wurden durch Integration der Peakfläche im Chromatogramm ermittelt.

Tabelle 107: Optimierte Parameter, sowie deren Prüfbereich und die festgelegten Prüfwerte. pH-Wert: pH, Puffersysteme, Temperatur: $^\circ\text{C}$, Reaktionszeit: t [min], Verhältnis von Substrat LA zum Cosubstrat (+)-Valencen (CoS) sowie die Enzymaktivität A [U] der LOX und die eingesetzten Lösungsvermittler. Im Falle der pH-Wert Optimierung sind die für jeden pH-Wert genutzten Puffersysteme hinterlegt.

Parameter	Prüfbereich	festgelegte Prüfwerte
pH	pH 5.5 – pH 7.5	5.5 – 6.0 – 6.5 – 6.9 – 7.5 pH 5.5 – 6.0: MES ^A (0.1 M) pH 6.5 – 7.5: HEPES ^A (0.1 M)
Puffersysteme	pH 6.5	0.1 M HEPE S ^A – 50 mM MOPS ^A – 0.1 M Citrat/Na ₂ HPO ₄ – 0.2 M KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
T [$^\circ\text{C}$]	4 $^\circ\text{C}$ – 60 $^\circ\text{C}$	4 – 15 – 22 – 30 – 37 – 50 – 60 $^\circ\text{C}$
t [min]	24 h – 168 h	24 – 48 – 72 – 96 – 168 h
LA : CoS	2:5 – 14:5	2:5 – 6:5 – 2:1 – 14:5
A(LOX) [U]	30 U – 3500 U	30 – 50 – 100 – 500 – 1000 – 1500 – 2500 – 3500 U
Lösungsvermittler	-	Tween [®] 20: 0.6 % [v/v] – Tween [®] 80: 0.6 % [v/v] – Triton [™] X-100: 0.5 % [v/v] – Aceton: 4.0 % [v/v]

^AGOOD-Puffersysteme

Tabelle 108: Reaktionsparameter und Konzentrationen an Reaktanden für die einzelnen Optimierungsschritte. Der jeweils zu optimierende Parameter ist grau (Spalte) eingefärbt und wurde hinsichtlich der in der **Tabelle 107** festgelegten Prüfwerte untersucht. Das Gesamtvolumen der analytischen Enzymtests belief sich auf 1.0 mL.

	pH	Puffer	T [°C]	t [h]	LA : CoS	A _{Lox} [U]	LM
pH		0.1 M HEPES ^A	50	66	4:1	100	Tween®20 0.4 % [v/v]
Puffer	6.5		50	72	4:1	100	Tween®20 0.4 % [v/v]
T [°C]	6.5	0.1 M HEPES ^A		72	2:1	100	Tween®20 0.4 % [v/v]
t [h]	6.5	0.1 M HEPES ^A	50		4:1	100	Tween®20 0.4 % [v/v]
LA : CoS	6.5	0.1 M HEPES ^A	20	96 ^B		2500	Tween®20 0.4 % [v/v]
A _{Lox} [U]	6.5	0.1 M HEPES ^A	20	96 ^B	2:1		Tween®20 0.4 % [v/v]
LM	6.5	0.1 M HEPES ^A	50	66	2:1	100	

^A GOOD-Puffersysteme

^B Inkubation erfolgte mit Schütteln der Reaktionsansätze: 300 U · min⁻¹

11.2.4 Cooxidation ausgewählter Testsubstrate

Als Testsubstrate für die Cooxidation mit den durch LOX-Katalyse produzierten Fettsäure-HPOD wurde neben (+)-Valencen (**3**) das Sesquiterpen (*E,E*-Farnesol (**96**) und die Monoterpene Geraniol (**141**), Myrcen (**137**), Anomadien (**207**), Dihydromyrcenol (**208**), Cyclademol (**209**), Isolinalool (**212**) sowie die beiden Enantiomere des Limonen (**192**) ausgewählt. Die analytischen Enzymtests wurden in Analogie zur allgemeinen Vorschrift eines einstufigen Prozesses durchgeführt (s. Kap. 11.2.2), wobei die in der nachfolgenden **Tabelle 109** angegebenen Bedingungen gewählt wurden. Die Cooxidationen wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Um eine Aussage zur Autoxidation der jeweiligen Cosubstrate zu ermöglichen wurde zudem eine Negativkontrolle (nur das Cosubstrat) unter identischen Bedingungen inkubiert. Weiterhin wurde zur Vergleichbarkeit und Identifizierung von Oxidationsprodukten ein Ausgangschromatogramm der Cosubstrate aufgenommen.

Tabelle 109: Reaktionsparameter und Verhältnisse an Substrat (LA) zu Cosubstrat (CoS) sowie zugesetzte Enzymaktivität an LOX für die Cooxidationen ausgewählter Terpenoide. Die Konzentration an Cosubstrat belief sich auf 400 µM.

pH	Puffer	T [°C]	t [h]	LA : CoS	A _{Lox} [U]	LM
6.5	0.1 M HEPES	50	66	2:1	200	Aceton 4 % [v/v]

Zur Überprüfung der Enantioselektivität der Reaktion wurde mit dem Oxidationsprodukt Carvon (**251**) eine chirale GC durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Hydrodex- β -6TBDM (25 m, 0.25 μ M id.). Zur Identifizierung wurden neben der Probe zwei Referenzen verwendet, bei denen es sich um racemisches Carvon sowie um das enantiomerenreine (+)-Carvon handelte. In der nebenstehenden **Abbildung 150** ist das Chromatogramm der chiralen Trennung gebildeten Carvons (**152**) aus (+)-Limonen (**192**) abgebildet.

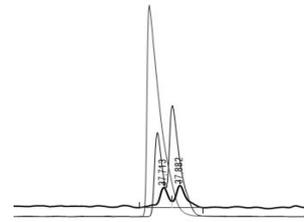


Abbildung 150: chirale GC von Carvon (**152**) aus (+)-**192**.

11.2.5 Fraktionierung etherische Öle

Die Fraktionierung der etherischen Öle Guajakholzöl und Vetiver Öl Haiti erfolgte mit einer BÜCHI Sepacore MPLC. Die Fraktionierung erfolgte in Abhängigkeit von der Polarität, wobei als Lösemittel *n*-Hexan und MtBE dienten. Nach Auftragung der Probe auf die Trennsäule wurde eine Gradientenelution (**Tabelle 110**) durchgeführt.

Tabelle 110: Gradient bestehend aus *n*-Hexan und MtBE für die Fraktionierung der etherischen Öle mittels MPLC.

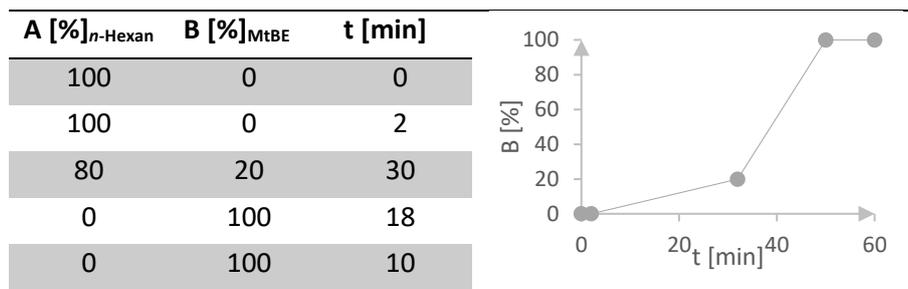


Tabelle 111: Vereinigung der durch MPLC erhaltenen Fraktionen sowie Ermittlung der Masse (m) nach Entfernung des Lösemittels für die etherischen Öle Guajakholzöl und Vetiver Öl Haiti.

vereinigte Fraktionen	Guajakholzöl		Vetiver Öl Haiti	
	Fraktionen	m _{Fraktion} [g]	Fraktionen	m _{Fraktion} [g]
1	Fr. 2-17	0.33	Fr. 4-5	1.10
2	Fr. 18-25	1.03	Fr. 6-16	0.17
3	Fr. 26-38	3.53	Fr. 17-19	0.27
4	Fr. 39-72	0.26	Fr. 20-21	0.34
5			Fr. 22-24	0.35
6			Fr. 25-29	0.97
7			Fr. 30-34	1.62
8			Fr. 35-50	3.56
9			Fr. 51-57	0.15
10			Fr. 58-72	0.18
Gesamt		5.15 g		8.71 g

Hierbei wurden insgesamt 72 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 50.0 mL erhalten. Die Fraktionen wurden anschließend mittels Flash-Chromatographie analysiert und die Fraktionen entsprechend der Chromatogramme vereinigt (**Tabelle 111**). Die Entfernung des Lösemittels erfolgte durch einen BÜCHI Syncore Parallelverdampfer bei 40°C, 300 mbar und 200 U · min⁻¹.

Von dem Guajakholzöl wurden insgesamt 5.16 g für die Fraktionierung eingesetzt. Die Probe wurde in *n*-Hexan gelöst und auf die Probenschleife aufgegeben. Nach chromatographischer Analyse wurden die 72 Fraktionen zu vier Fraktionen vereinigt und das Lösemittel entfernt. Anhand der **Tabelle 111** zeigt sich, dass kein signifikanter Probenverlust festgestellt wurde (WFR = 99.8 %). Für die Fraktionierung des Vetiver Öl Haiti wurden 8.85 g in *n*-Hexan gelöst und auf die Probenschleife aufgetragen. Nach chromatographischer Messung der Fraktionen wurden die Fraktionen der MPLC in zehn Fraktionen vereinigt, die für die nachfolgenden Cooxidationen verwendet wurden. Auch bei dem Vetiver Öl Haiti (**Tabelle 111**), wurde kein signifikanter Probenverlust nach Entfernung des Lösemittels festgestellt (WFR = 98.4 %).

11.2.6 Cooxidation etherischer Öle

Die analytischen Enzymtests der etherischen Öle Guajakholzöl und Vetiver Öl sowie die durch MPLC erhaltenen Fraktionen (s. Kap. 11.2.5) wurden in Analogie zur allgemeinen Vorschrift eines einstufigen Prozesses durchgeführt (s. Kap. 11.2.2), wobei die in der nachfolgenden **Tabelle 112** angegebenen Bedingungen gewählt wurden. Dazu wurde zunächst eine 10 mM Stammlösung der etherischen Öle und Fraktionen in Aceton angesetzt, sowie eine 16 mM LA-Stammlösung in 0.1 M Tris-HCl-Puffer bei einem pH-Wert von pH 8.5. Die Cooxidationen wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Um eine Aussage zur Autoxidation der etherischen Öle zu gewährleisten wurde eine Negativkontrolle, die ausschließlich das etherischen Öl bzw. eine Fraktion des Öls enthielt, unter identischen Bedingungen inkubiert. Weiterhin wurde zur Vergleichbarkeit und Identifizierung von Oxidationsprodukten ein Ausgangschromatogramm der etherischen Öle und Fraktionen aufgenommen.

Tabelle 112: Reaktionsparameter und Verhältnisse an Substrat (LA) zu Cosubstrat (CoS) sowie zugesetzte Enzymaktivität an LOX für die Cooxidationen etherischer Öle und deren Fraktionen. Die Konzentration an etherischen Öl (Cosubstrat) belief sich auf 400 µM. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde Aceton als Lösungsvermittler zugesetzt.

pH	Puffer	T [°C]	t [h]	LA : CoS	A _{LOX} [U]	LM
6.5	0.1 M HEPES	50	66	2:1	200	Aceton 4 % [v/v]

Die Identifizierung der Edukte und Produkte erfolgte anhand einer GC-MS-Analyse und einem Abgleich der RI und MS-Spektren mit internen Datenbanken der Symrise AG. In der nachfolgenden **Tabelle 113** sind die Veränderungen der prozentualen Flächenanteile für identifizierte Verbindungen des etherischen Vetiver Öl Haiti hinterlegt.

Tabelle 113: Tabellarische Auflistung von Verbindungen aus dem Vetiver Öl Haiti, die durch die Cooxidationen eine Zunahme (Cooxidationsprodukte) bzw. Abnahme (akzeptierte Cosubstrate) der A[%] erfahren haben. ^{A-J} A[%] Fr.1-10.

akzeptierte Cosubstrate				akzeptierte Cosubstrate			
	RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}		RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}
3^A	1730	3.7	0.9	300^A	1685	0.5	0.1
95^A	1682	0.3	-	301^A	1766	2.0	-
195^H	2409	1.3	-	302^A	1776	0.7	-
197^H	2542	10.7	6.1	303^A	1813	0.6	-
198^C	2523	2.8	1.8	304^A	1825	0.6	-
198^D	2198	1.0	0.3	305^A	1873	2.5	0.1
253^H	2561	23.3	6.9	307^E	2208	3.5	2.0
256^A	1699	12.6	3.5	312^B	1747	4.3	1.2
257^B	2112	4.7	0.5	313^B	1925	1.7	0.9
259^D	2115	16.6	11.6	314^B	1894	0.8	0.3
260^F	2185	11.9	10.1	315^B	2210	3.7	3.1
267^E	2143	1.2	0.5	316^B	2376	2.1	1.6
291^A	1746	9.1	1.8	317^B	2412	3.1	0.4
292^A	1583	2.9	1.5	318^C	2182	1.3	0.8
293^A	1727	4.4	0.8	319^C	2251	4.9	1.6
294^A	1789	1.1	0.2	320^E	2285	1.7	1.3
295^A	1830	1.2	0.2	321^H	2231	3.1	2.3
296^A	1845	1.3	0.5	322^B	1726	1.1	0.2
297^A	1976	0.8	0.2	323^B	1895	0.8	0.1
298^A	1718	5.0	-	324^B	2353	1.3	-
299^A	1759	7.6	0.1	325^C	2443	6.0	-
				326^A	2218	2.2	0.7
Cooxidationsprodukte				Cooxidationsprodukte			
	RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}		RI _{FFAP}	A[%] _{Ausgang}	A[%] _{Cooxidation}
194^A	2557	-	0.2	307^A	2207	-	0.5
195^A	2409	-	0.7	308^A	2299	-	0.9
196^A	2582	-	1.7	309^A	2419	0.2	1.4
199^E	2201	17.6	22.5	310^A	2428	-	0.5
252^H	2531	24.6	35.4	311^A	2357	-	1.0
257^C	2112	1.5	2.0	325^H	2443	-	1.2
278^C	1773	0.2	1.5	327^B	1879	-	0.2
281^A	2062	-	0.2	328^B	2028	-	0.7
286^G	2183	0.5	1.4	329^C	1896	0.5	1.9
287^G	2092	2.3	3.3	330^J	2527	0.2	1.3
290^G	2250	1.9	2.8	331^E	2353	-	0.9
306^A	2199	0.5	1.2	332^H	2411	3.6	4.6

11.2.7 Vorarbeiten zur semi-präparativen Umsetzung

Für die Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Cooxidation wurden analytische Enzymtests entsprechend der Vorschrift für einen einstufigen Prozess (s. Kap. 11.2.2) durchgeführt und aufgearbeitet. Anstelle von Aceton wurden Methanol und Acetonitril in unterschiedlichen Volumenanteilen zugesetzt (**Tabelle 114**). Die analytischen Enzymtests wurden bei 50°C über eine Dauer von 72 h inkubiert. Die analytischen Enzymtests wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fähigkeit zur Cooxidation anhand der prozentualen Flächenanteile des gebildeten Nootkaton (**194**) bestimmt.

Tabelle 114: Volumenanteile an Methanol (MeOH) und Acetonitril (ACN) für die analytischen Enzymtests mit 400 µM (+)-Valencen (**3**) als Testsubstrat. Das Verhältnis von Substrat zu Cosubstrat belief sich 2:1. Die Enzymaktivität an LOX betrug 200 U.

Enzymtest	1	2	3	4	5	6
MeOH [% (v/v)]	5.0	10.0	15.0	20.0	-	-
ACN [% (v/v)]	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0

Des Weiteren wurden mit Acetonitril als Lösemittel zwei Testreihen zur Bestimmung der maximalen Konzentrationen an Substrat LA und Cosubstrat, sowie zur Ermittlung der Enzymaktivität an LOX durchgeführt (**Tabelle 115, Abbildung 151**). Die Enzymtests erfolgten ebenfalls im analytischen Maßstab gemäß der Vorschrift eines einstufigen Prozesses (s. Kap. 11.2.2). Für die Verifizierung der maximalen Konzentrationen an Substrat LA und Cosubstrat wurde das Verhältnis der Komponenten auf 2:1 festgelegt. Es wurden dabei Konzentration von 400 µM - 1600 µM (+)-Valencen (**3**) eingesetzt. Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgte in einem Bereich von 200 U - 1000 U LOX. Die Inkubation der Enzymtests erfolgte bei 50°C über eine Dauer von 72 h.

Tabelle 115: Konzentrationen an Substrat LA und Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) sowie die Enzymaktivitäten der LOX. **Enzymtest A:** Ermittlung der maximalen Konzentration an Substrat LA und Cosubstrat. **Enzymtest B:** Ermittlung der notwendigen Enzymaktivität bei einer Substrat-Konzentration von 2.4 mM und einer Cosubstrat-Konzentration von 1.2 mM.

Enzymtest A	1	2	3	4
Valencen [µM]	400	800	1200	1600
Linolsäure [µM]	800	1600	2400	3200
LOX [U]	200	400	600	800

Enzymtest B	1	2	3	4	5
A [U] LOX	200	400	600	800	1000

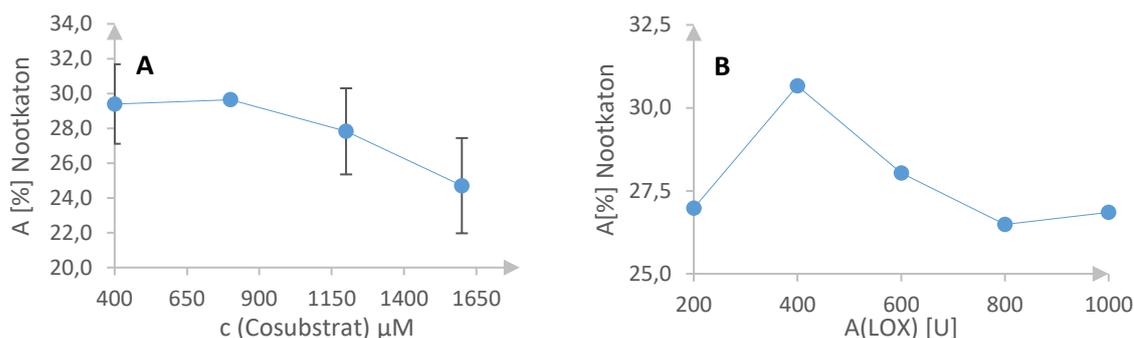


Abbildung 151: A: Steigerung der Cosubstrat-Konzentration und Einfluss auf die Bildung des Nootkaton (194). B: Ermittlung der Enzymaktivität und Einfluss auf die Bildung des Nootkaton (194). Die Cooxidationen wurden bei einer Substrat-Konzentration von 2.4 mM und einer Cosubstrat-Konzentration von 1.2 mM durchgeführt.

11.2.8 Semi-präparative Cooxidationen

Allgemeine Vorschrift für einen einstufigen semi-präparativen Ansatz

Vor den eigentlichen semi-präparativen Umsetzungen wurden zunächst Stammlösungen der LA, des Cosubstrats und des Enzyms LOX angesetzt. Von der LA wurde eine 150 mM Stammlösung und von dem Cosubstrat eine 50 mM Stammlösung in Acetonitril (ACN) hergestellt. Das ACN diente gleichzeitig als Lösungsvermittler in den semi-präparativen Umsetzungen. Das Enzym LOX wurde als $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Stammlösung in 0.1 M HEPES mit einem pH-Wert von pH 6.5 angesetzt. Das Gesamtvolumen des semi-präparativen Ansatzes belief sich auf 60.0 mL, wobei als Reaktionslösung ein 0.1 M HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 6.5 diente. Der Puffer wurde vorgelegt und mit dem Substrat und Cosubstrat versetzt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von weiterem ACN, sodass sich der Volumenanteil auf 15.0 % [v/v] belief. Durch die Zugabe der LOX wurde die Reaktion gestartet (**Tabelle 116**).

Allgemeine Vorschrift für einen zweistufigen semi-präparativen Ansatz

Es wurden zunächst Stammlösungen der LA, des Cosubstrats und des Enzyms LOX hergestellt (s. einstufiger semi-präparativer Ansatz). Das Enzym LOX wurde als $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Stammlösung in 0.1 M HEPES mit einem pH-Wert von pH 9.0 angesetzt. Zunächst wurde ein 0.1 M HEPES Puffer mit einem pH-Wert von pH 9.0 vorgelegt und mit dem Substrat Linolsäure versetzt, sodass ein ACN-Volumenanteil von 8.0 % [v/v] resultierte. Durch die Zugabe des Enzyms LOX wurde die Bildung der HPOD initiiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde der pH-Wert durch die Zugabe von $350 \mu\text{L}$ 2 M HCl auf pH 6.5 abgesenkt und der Ansatz durch die Zugabe von 0.1 M HEPES Puffer auf die Konzentration des einstufigen Ansatzes verdünnt. Durch die Addition von ACN wurde dessen Anteil auf 15.0 % [v/v] erhöht. Anschließend erfolgte die Zugabe des Cosubstrats und der Ansatz wurde über eine Dauer von 72 h inkubiert (**Tabelle 116**).

Allgemeine Vorschrift für die Aufarbeitung semi-präparativer Ansätze

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde der semi-präparative Ansatz mittels 1 M NaOH auf pH 9.0 eingestellt. Danach wurden 5 mL gesättigte $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zum Abbau überschüssiger Hydroperoxide hinzugegeben und die Ansätze für 20 min bei $75 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ inkubiert. Anschließend

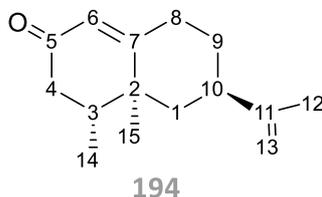
erfolgte eine Extraktion der gebildeten Produkte mit *n*-Pentan (4 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde anschließend zu etwa 90 % am Rotationsverdampfer (750 mbar, 40°C) und anschließend schonend im Stickstoffstrom entfernt.

Tabelle 116: Reaktionsparameter und Reaktanden für die semi-präparative Cooxidation im ein- oder zweistufigen Prozess.

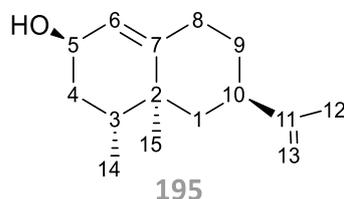
	(+)-Valencen (3)	(+)-Valencen (3)	Fixateur Bois
Ansatzgröße			
Gesamtvolumen [mL]	60.0	60.0	187.5
Prozess	einstufig	zweistufig	zweistufig
Reaktionsbedingungen			
Temperatur [°C]	40	40	40
∅ [U·min ⁻¹]	75	75	75
HPOD-Bildung (zweistufig)			
c(Substrat) [mM]	-	12.0	12.0
A(LOX) [U]	-	2000	2000
ACN [% (v/v)]	-	8.0	8.0
Puffer	-	0.1 HEPES	0.1 HEPES
pH	-	9.0	9.0
Inkubationsdauer [min]	-	30	45
Volumen [mL]	-	12.0	37.5
Cooxidation			
c(Cosubstrat) [mM]	1.2	1.2	1.2
c(Substrat) [mM]	2.4	2.4 ^A	2.4 ^A
A(LOX) [U]	400	400 ^A	400 ^A
ACN [% (v/v)]	15.0	15.0	15.0
Puffer	0.1 HEPES	0.1 HEPES	0.1 HEPES
pH	6.5	6.5	6.5
Inkubationsdauer [h]	72	72	96
Abbau überschüssige HPOD			
Reduktionsmittel	Na ₂ S ₂ O ₃	Na ₂ S ₂ O ₃	Na ₂ S ₂ O ₃
Aufarbeitung			
Art der Aufarbeitung	Extraktion	Extraktion	Extraktion
Lösemittel	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan	<i>n</i> -Pentan
pH	9.0	9.0	9.0
Ausbeute			
in [mg]	11.3	10.4	133.2
in [μM]	52.0	47.7	605.0
in [%]	61.3	56.1	67.3

^A Eingesetzte Linolsäure und LOX aus der HPOD-Bildung. Es wurde kein neues Substrat (LA)/ LOX zugesetzt.

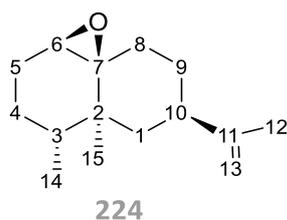
Die HPOD-induzierte Cooxidation mit dem Cosubstrat (+)-Valencen (**3**) lieferte ein hellgelbes Öl in 56.1 % Ausbeute bei Anwendung eines zweistufigen Prozesses. Aus dem erhaltenen Rohprodukt wurden anschließend mittels pGC die Produkte **194**, **195**, **224**, **225** und **227** isoliert und mittels GC-MS-Analyse und NMR-Spektroskopie charakterisiert und die Struktur aufgeklärt.



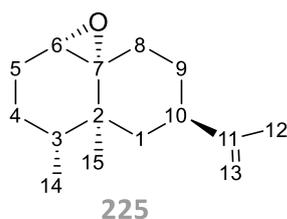
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.82 – 5.80 (m, 1H, H-6), 4.76 (p, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-13b), 4.70 (h, $J = 1.8, 0.9$ Hz, 1H, H-13a), 2.16 (ddd, $J = 16.8, 4.0, 1.0$ Hz, 1H, H-4_{eq}), 2.03 (dd, $J = 16.8, 14.2$ Hz, 1H, H-4_{ax}), 2.00 – 1.94 (m, 2H, H-8_{ax}), 1.85 (ddd, $J = 15.0, 4.2, 2.5$ Hz, 1H, H-8_{eq}), 1.67 (dt, $J = 13.0, 2.9$ Hz, 1H, H-1_{eq}), 1.57 (dq, $J = 14.0, 6.9, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 1.56 (s, 3H, H-12), 1.52 (ddq, $J = 13.1, 5.3, 2.6$ Hz, 1H, H-9_{eq}), 1.01 (dtd, $J = 13.9, 12.5, 4.2$ Hz, 1H, H-9_{ax}), 0.81 (t, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-1_{ax}), 0.63 (s, 3H, H-15), 0.53 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-14); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 197.2 (C-5), 167.6 (C-7), 149.2 (C-11), 125.4 (C-6), 109.4 (C-13), 44.1 (C-1), 42.4 (C-4), 40.5 (C-10), 40.5 (C-3), 39.2 (C-2), 32.7 (C-8), 31.8 (C-9), 20.8 (C-12), 16.5 (C-15), 14.7 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 218.1671 [M]⁺; gefunden: 218.1669 [M]⁺.



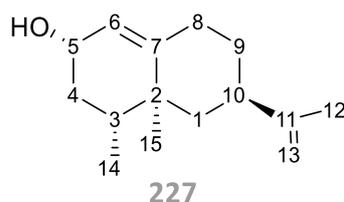
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.39 (dt, $J = 5.1, 1.8$ Hz, 1H, H-6), 4.80 – 4.78 (m, 2H, H-13), 3.92 (p, $J = 4.4, 2.0$ Hz, 1H, H-5), 2.18 – 2.11 (m, 1H, H-8_{ax}), 2.12 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-10), 1.97 (ddd, $J = 14.2, 4.2, 2.5$ Hz, 1H, H-8_{eq}), 1.86 (dt, $J = 12.8, 2.8$ Hz, 1H, H-1_{eq}), 1.74 – 1.69 (m, 1H, H-9_{eq}), 1.70 – 1.65 (m, 1H, H-3), 1.64 (t, $J = 1.2$ Hz, 3H, H-12), 1.52 (ddt, $J = 14.1, 3.3, 1.7$ Hz, 1H, H-4_{ax}), 1.46 (ddd, $J = 14.0, 12.8, 4.2$ Hz, 1H, H-4_{eq}), 1.18 (dtd, $J = 13.9, 12.4, 4.2$ Hz, 1H, H-9_{ax}), 0.99 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-1_{ax}), 0.77 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-14), 0.74 – 0.73 (m, 3H, H-15); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 150.0 (C-11), 147.4 (C-7), 122.8 (C-6), 109.1 (C-13), 64.2 (C-5), 44.9 (C-1), 41.0 (C-10), 38.5 (C-2), 36.6 (C-4), 35.2 (C-3), 32.9 (C-9), 32.8 (C-8), 20.9 (C-12), 16.8 (C-15), 15.4 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺; 202.1722 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1718 [M-H₂O]⁺.



¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 4.80 (p, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-13b), 4.79 (dp, $J = 1.9, 0.9$ Hz, 1H, H-13a), 2.81 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6), 2.07 (td, $J = 13.8, 4.4$ Hz, 1H, H-8_{ax}), 2.02 (tt, $J = 12.1, 3.0$ Hz, 1H, H-10), 1.91 – 1.86 (m, 1H, H-5_{eq}), 1.81 (dt, $J = 13.3, 3.0$ Hz, 1H, H-1_{eq}), 1.64 (t, $J = 1.2$ Hz, 3H, H-12), 1.63 – 1.59 (m, 1H, H-9_{eq}), 1.51 – 1.41 (m, 2H, H-4_{ax}, H-5_{ax}), 1.21 (t, $J = 13.0$ Hz, 1H, H-1_{ax}), 1.19 – 1.11 (m, 1H, H-9_{ax}), 1.10 (dt, $J = 13.8, 3.8, 3.2$ Hz, 1H, H-8_{eq}), 1.04 – 1.03 (m, 3H, H-15), 1.04 – 0.99 (m, 1H, H-4_{eq}), 0.97 (dq, $J = 10.0, 7.0, 3.0$ Hz, 1H, H-3), 0.79 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-14); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 149.9 (C-11), 108.9 (C-13), 63.5 (C-6), 63.1 (C-7), 46.1 (C-1), 41.8 (C-3), 40.5 (C-10), 36.2 (C-2), 33.5 (C-8), 31.0 (C-9), 26.0 (C-5), 24.9 (C-4), 21.2 (C-12), 17.1 (C-15), 16.2 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺; 202.1722 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1722 [M-H₂O]⁺.

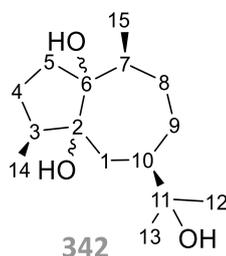


¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 4.86 (dp, $J = 1.8, 0.9$ Hz, 1H, H-13b), 4.80 (p, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-13a), 2.68 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-6), 2.25 (tt, $J = 12.5, 3.6$ Hz, 1H, H-10), 1.94 (dq, $J = 12.8, 7.0, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 1.91 (td, $J = 13.5, 4.3$ Hz, 1H, H-8_{ax}), 1.87 (dtd, $J = 15.7, 10.3, 9.7, 0.4$ Hz, 1H, H-5_{eq}), 1.80 (dtd, $J = 13.5, 12.5, 4.0$ Hz, 1H, H-9_{eq}), 1.72 (ddd, $J = 12.8, 3.6, 2.1$ Hz, 1H, H-1_{eq}), 1.67 (t, $J = 1.2$ Hz, 3H, H-12), 1.66 – 1.61 (m, 1H, H-9_{ax}), 1.53 (dddd, $J = 15.6, 8.8, 4.0, 1.4$ Hz, 1H, H-5_{ax}), 1.47 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-1_{ax}), 1.07 (tt, $J = 14.1, 12.7, 10.2, 9.0$ Hz, 1H, H-4_{ax}), 1.00 (dddt, $J = 13.7, 9.3, 3.9, 1.0$ Hz, 1H, H-4_{eq}), 0.96 (ddd, $J = 13.3, 4.0, 2.5$ Hz, 1H, H-8_{eq}), 0.78 (s, 3H, H-15), 0.61 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-14); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 150.1 (C-11), 109.3 (C-13), 64.9 (C-7), 60.0 (C-6), 41.0 (C-10), 40.4 (C-1), 36.2 (C-2), 33.8 (C-3), 31.0 (C-8), 29.0 (C-9), 25.0 (C-4), 22.9 (C-5), 20.7 (C-12), 15.3 (C-14), 14.9 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺; 202.1722 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1725 [M-H₂O]⁺.

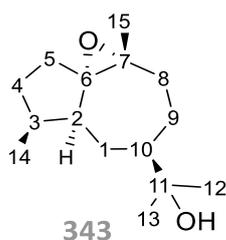


$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 5.31 (q, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-6), 4.78 (dt, $J = 2.1, 1.0$ Hz, 2H, H-13), 4.10 (tt, $J = 9.2, 6.7, 2.0$ Hz, 1H, H-5), 2.16 (tdt, $J = 14.0, 4.4, 2.2$ Hz, 1H, H-8_{ax}), 2.14 (tt, $J = 12.5, 3.3$ Hz, 1H, H-10), 1.97 (ddd, $J = 14.0, 4.2, 2.6$ Hz, 1H, H-8_{eq}), 1.81 (dt, $J = 12.7, 2.8$ Hz, 1H, H-1_{eq}), 1.69 (dddt, $J = 12.7, 4.9, 3.3, 2.4$ Hz, 1H, H-9_{eq}), 1.63 (t, $J = 1.1$ Hz, 3H, H-12), 1.59 (ddt, $J = 11.9, 6.6, 1.6$ Hz, 1H, H-4_{eq}), 1.33 (dq, $J = 13.0, 6.7, 2.0$ Hz, 1H, H-3), 1.27 (ddd, $J = 13.0, 11.4, 9.8$ Hz, 1H, H-4_{ax}), 1.16 (dtd, $J = 13.9, 12.4, 4.2$ Hz, 1H, H-9_{ax}), 0.92 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-1_{ax}), 0.83 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, H-15), 0.72 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H-14); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 150.1 (C-11), 144.7 (C-7), 125.8 (C-6), 109.0 (C-13), 67.9 (C-5), 44.9 (C-1), 41.1 (C-10), 39.6 (C-3), 38.4 (C-2), 37.7 (C-4), 33.2 (C-9), 32.6 (C-8), 20.9 (C-12), 18.2 (C-15), 15.5 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 220.1827 [M]⁺; 202.1722 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1718 [M-H₂O]⁺.

Die HPOD-induzierte Cooxidation mit der Komposition Fixateur Bois lieferte ein hellgelbes Öl in 67 % Ausbeute bei Anwendung eines zweistufigen Prozesses. Aus dem Rohprodukt wurden anschließend die Produkte **342** und **343** durch eine pGC und anschließende pHPLC isoliert und deren Struktur aufgeklärt.



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 2.40 (dq, $J = 14.3, 2.0$ Hz, 1H, H-1a), 2.27 (qt, $J = 7.2, 3.5$ Hz, 1H, H-7), 2.14 – 2.02 (m, 1H, H-3), 1.91 (tt, $J = 13.2, 3.5, 2.1$ Hz, 1H, H-8a), 1.88 – 1.75 (m, 2H, H-4a, H-5a), 1.68 (tt, $J = 11.9, 1.9$ Hz, 1H, H-10), 1.69 – 1.61 (m, 1H, H-9a), 1.65 – 1.56 (m, 1H, H-5b), 1.57 (dd, $J = 14.3, 11.8$ Hz, 1H, H-1b), 1.44 – 1.37 (m, 1H, H-8b), 1.02 (s, 3H, H-13), 1.00 (s, 3H, H-12), 1.00 – 0.92 (m, 1H, H-4b), 0.90 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-14), 0.91 – 0.83 (m, 1H, H-9b), 0.74 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-15); **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, C_6D_6) δ [ppm]: 72.9 (C-6), 72.4 (C-11), 72.1 (C-2), 47.4 (C-10), 40.7 (C-3), 32.8 (C-7), 31.6 (C-8), 29.7 (C-1), 29.6 (C-5), 27.73 (C-13), 27.6 (C-4), 26.4 (C-12), 25.3 (C-9), 17.0 (C-15), 16.1 (C-14); **HR-GCMS**: berechnet: 256.2038 [M]⁺; 202.1720 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1724 [M-H₂O]⁺.



¹H NMR (600 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 2.46 – 2.31 (m, 1H, H-3), 2.00 (ddd, $J = 13.8, 7.8, 0.8$ Hz, 1H, H-8a), 1.97 (ddd, $J = 14.7, 10.3, 1.9$ Hz, 1H, H-5a), 1.89 (dq, $J = 13.4, 1.7$ Hz, 1H, H-1a), 1.81 – 1.73 (m, 1H, H-9a), 1.72 (dd, $J = 11.7, 6.4$ Hz, 1H, H-2), 1.74 – 1.64 (m, 1H, H-4a), 1.71 – 1.61 (m, 1H, H-2b), 1.51 (t, $J = 13.8, 12.4$ Hz, 1H, H-8b), 1.19 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H, H-14), 1.18 – 1.11 (m, 1H, H-4b), 1.10 (tt, $J = 11.4, 2.6$ Hz, 1H, H-10), 0.99 (s, 3H, H-13), 0.99 (s, 3H, H-14), 0.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-15), 0.94 – 0.86 (m, 1H, H-9b), 0.72 (dt, $J = 13.4, 11.7$ Hz, 1H, H-1b); **¹³C NMR** (151 MHz, C₆D₆) δ [ppm]: 75.3 (C-6), 72.7 (C-11), 62.8 (C-7), 54.5 (C-10), 49.3 (C-2), 38.2 (C-3), 37.6 (C-1), 31.1 (C-4), 29.5 (C-2), 27.7 (C-13), 27.1 (C-12), 26.2 (C-9), 25.2 (C-1), 20.5 (C-14), 15.4 (C-15); **HR-GCMS**: berechnet: 238.1933 [M]⁺; 202.1722 [M-H₂O]⁺, gefunden: 202.1717 [M-H₂O]⁺.

Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.^[297]

12 Literaturverzeichnis

- [1] N. Kaushik, S. Biswas, J. Singh, *SciTech J.* **2014**, *1*, 15.
- [2] W. Schwab, C. Fuchs, F.-C. Huang, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 3.
- [3] M. Müller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 591.
- [4] H. Bisswanger, *Enzyme. Struktur, Kinetik und Anwendungen*, Wiley-VCH, Hoboken, **2015**.
- [5] A. Illanes, *Enzyme biocatalysis. Principles and applications*, Springer, Dordrecht, **2008**.
- [6] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- [7] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336.
- [8] W. A. Loughlin, *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 49.
- [9] K. van der Saal, *Biochemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2020**.
- [10] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [11] G. DeSantis, B. G. Davis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 139.
- [12] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471.
- [13] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.
- [14] R. A. Jensen, *Ann. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409.
- [15] M. D. Toscano, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3274.
- [16] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156.
- [17] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3408.
- [18] C. A. Orengo, D. T. Jones, J. M. Thornton, *Nature* **1994**, *372*, 631.
- [19] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144.
- [20] a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185; b) C. Jäckel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 153.
- [21] N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567.
- [22] V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VCH, Hoboken, **2008**.
- [23] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **110**, *1998*, 3285.
- [24] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayre, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem.* **113**, *2001*, 4068.
- [25] U. T. Bornscheuer, B. Hauer, K. E. Jaeger, U. Schwaneberg, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 36.
- [26] a) A. Hille-Rebfield, *Biol. Unserer Zeit* **2018**, *48*, 358; b) Z.-G. Zhang, L. P. Parra, M. T. Reetz, *Chemistry* **2012**, *18*, 10160.
- [27] L. G. Otten, F. Hollmann, Arends, I. W. C. E., *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 46.
- [28] a) D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym et al., *Nature* **2008**, *453*, 190; b) J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard et al., *Science* **2010**, *329*, 309.
- [29] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11570.
- [30] F. J. Leeper, J. C. Vederas, *Biosynthesis. Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2000**.

- [31] M. Christmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9775.
- [32] B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones (Hrsg.) *Biochemistry & molecular biology of plants*, Wiley, Chichester, **2015**.
- [33] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *10*, 357.
- [34] E. Breitmaier, *Terpene. Aromen, Dufte, Pharmaka, Pheromone*, Wiley-VCH, Hoboken, **2008**.
- [35] C. C. C. R. de Carvalho, da Fonseca, M. M. R., *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 134.
- [36] R. H. Thomson (Hrsg.) *Chemistry of Natural Products*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**.
- [37] a) B. Schäfer, *Chemie unserer Zeit* **2013**, *47*, 174; b) R. Croteau, S. L. Munck, C. C. Akoh, H. J. Fisk, D. M. Satterwhite, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *256*, 56; c) M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature* **2011**, *469*, 116; d) D.-Y. Xie, D.-M. Ma, R. Judd, A. L. J. Jones, *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 1093.
- [38] S. Kumari, P. Priya, G. Misra, G. Yadav, *Phytochem. Rev.* **2013**, *12*, 255.
- [39] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1917.
- [40] a) H. K. Lichtenthaler, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 785-789; b) H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer, J. Schwender, *Physiol. Plant.* **1997**, *101*, 643; c) W. N. Hunter, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21573.
- [41] a) P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181; b) E. Vranová, D. Coman, W. Gruissem, *Mol. Plant* **2012**, *5*, 318.
- [42] E. Oldfield, F.-Y. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1124.
- [43] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412.
- [44] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 60.
- [45] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 13543.
- [46] E. Y. Shishova, F. Yu, D. J. Miller, J. A. Faraldos, Y. Zhao, R. M. Coates, R. K. Allemann, D. E. Cane, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15431.
- [47] P. Baer, P. Rabe, K. Fischer, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, M. Groll, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7652.
- [48] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 87.
- [49] J. Degenhardt, T. G. Köllner, J. Gershenzon, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621.
- [50] D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1089.
- [51] D. J. Tantillo, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2847.
- [52] F. Bohlmann, C. Zdero, J. Jakupovic, H. Robinson, R. M. King, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2239.
- [53] A. Y. Hong, B. M. Stoltz, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5350.
- [54] C. Pinedo, C.-M. Wang, J.-M. Pradier, B. Dalmais, M. Choquer, P. Le Pêcheur, G. Morgant, I. G. Collado, D. E. Cane, M. Viaud, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 791.
- [55] a) I. G. Collado, J. R. Hanson, A. J. M. Sanchez, *Journal of Chemical Research* **2017**, *41*, 435; b) I. G. Collado, A. J. M. Sánchez, J. R. Hanson, *Natural product reports* **2007**, *24*, 674.
- [56] a) C. Z. F. Bohlmann, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2529; b) J. J. F. Bohlmann, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 259.

- [57] J. R. Hanson, *Pure and Appl. Chem.* **1981**, *53*, 155.
- [58] a) A. Peter W. Bradshaw, James R. Hanson, Robert Nyfeler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 2187; b) A. Peter W. Bradshaw, James R. Hanson, Robert Nyfeler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 1469.
- [59] C.-M. Wang, R. Hopson, X. Lin, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8360.
- [60] S. F. R. Hinkley, N. B. Perry, R. T. Weavers, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1489.
- [61] S. C. Wang, D. J. Tantillo, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4827.
- [62] R. M. Coates, Z. Ho, M. Klobus, S. R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9249.
- [63] P. Hu, S. A. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5007.
- [64] D. E. Cane, C. Pargellis, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *254*, 421.
- [65] a) D. E. Cane, H. Ikeda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 463; b) D. E. Cane, A. M. Tillman, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 122.
- [66] K. F. Chater, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2006**, *361*, 761.
- [67] B. K. Koe, B. A. Sobin, W. D. Celmer, *Antibiot. Annu.* **1957**, 672.
- [68] Y.-J. Kim, Y. Yoon, H.-Y. Lee, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7810.
- [69] D. H. Hua, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3835.
- [70] M. K. Pallerla, J. M. Fox, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5625.
- [71] P. H. M. Harrison, J. S. Oliver, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5922.
- [72] P. Gutta, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6172.
- [73] M. Seemann, G. Zhai, J.-W. de Kraker, C. M. Paschall, D. W. Christianson, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7681.
- [74] D. E. Cane, J.-K. Sohng, C. R. Lamberson, S. M. Rudnicki, Z. Wu, M. D. Lloyd, J. S. Oliver, B. R. Hubbard, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5846.
- [75] D. E. Cane, J. S. Oliver, P. H. M. Harrison, C. Abell, B. R. Hubbard, C. T. Kane, R. Lattman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4513.
- [76] M. W. Lodewyk, D. Willenbring, D. J. Tantillo, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 887.
- [77] C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *227*, 1820.
- [78] M. Seemann, G. Zhai, K. Umezawa, D. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 591.
- [79] L. Zu, M. Xu, M. W. Lodewyk, D. E. Cane, R. J. Peters, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11369.
- [80] F. Lopez-Gallego, S. A. Agger, D. Abate-Pella, M. D. Distefano, C. Schmidt-Dannert, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1093.
- [81] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787.
- [82] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1732.
- [83] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, *271*, 163.
- [84] J. M. Caruthers, I. Kang, M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25533.
- [85] a) L. S. Vedula, J. Y. Jiang, T. Zakharian, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 469; b) D. E. Cane, Q. Xue, J. E. Van Epp, Y. S. Tsantrizos, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*; c) X. Lin, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6332.

- [86] A. Deligeorgopoulou, S. E. Taylor, S. Forcat, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* **2003**, *17*, 2162.
- [87] A. Deligeorgopoulou, R. K. Allemann, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7741.
- [88] F. López-Gallego, G. T. Wawrzyn, C. Schmidt-Dannert, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7723.
- [89] P. Baer, P. Rabe, C. A. Citron, C. C. de Oliveira Mann, N. Kaufmann, M. Groll, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 213.
- [90] C. M. Starks, K. Back, J. S. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*, 1815.
- [91] V. Harms, A. Kirschning, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1080.
- [92] M. Chen, N. Al-lami, M. Janvier, E. L. D'Antonio, J. A. Faraldos, D. E. Cane, R. K. Allemann, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5441.
- [93] a) D. E. Cane, G. Yang, R. M. Coates, H. J. Pyun, T. M. Hohn, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3454; b) L. S. Vedula, Y. Zhao, R. M. Coates, T. Koyama, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *466*, 260.
- [94] a) D. E. Cane, G. Yang, Q. Xue, J. H. Shim, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2471; b) D. E. Cane, T. E. Bowser, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1127; c) A. Vattekkatte, S. Garms, W. Boland, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2855; d) H.-T. C. Y.-L. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.* **2006**, *53*, 1161.
- [95] D. E. Cane, Y. S. Tsantrizos, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11037.
- [96] a) D. E. Cane, G. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *59*, 5794; b) J. A. Faraldos, D. J. Grundy, O. Cascon, S. Leoni, M. W. van der Kamp, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 14027; c) D. E. Cane, J. L. Pawlak, R. M. Horak, T. M. Hohn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5476.
- [97] J. A. Faraldos, Y. Zhao, P. E. O'Maille, J. P. Noel, R. M. Coates, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1826.
- [98] C. D. Poulter, H. C. Rilling, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 307.
- [99] F. Yu, D. J. Miller, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* **2007**, 4155.
- [100] D. J. Miller, F. Yu, R. K. Allemann, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1819.
- [101] D. J. Miller, F. Yu, D. W. Knight, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 962.
- [102] D. J. Grundy, M. Chen, V. González, S. Leoni, D. J. Miller, D. W. Christianson, R. K. Allemann, *Biochemistry* **2016**, *55*, 2112.
- [103] J. A. Faraldos, D. J. Miller, V. González, Z. Yoosuf-Aly, O. Cascón, A. Li, R. K. Allemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5900.
- [104] O. Cascón, S. Touchet, D. J. Miller, V. Gonzalez, J. A. Faraldos, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9702.
- [105] S. Touchet, K. Chamberlain, C. M. Woodcock, D. J. Miller, M. A. Birkett, J. A. Pickett, R. K. Allemann, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7550.
- [106] K. A. Rising, C. M. Crenshaw, H. J. Koo, T. Subramanian, K. A. H. Chehade, C. Starks, K. D. Allen, D. A. Andres, H. P. Spielmann, J. P. Noel et al., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1729.
- [107] F. Huynh, D. J. Grundy, R. L. Jenkins, D. J. Miller, R. K. Allemann, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1834.
- [108] C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11802.

- [109] a) X. Tang, M. Demiray, T. Wirth, R. K. Allemann, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1314; b) M. Demiray, X. Tang, T. Wirth, J. A. Faraldos, R. K. Allemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4347.
- [110] R. Lauchli, K. S. Rabe, K. Z. Kalbarczyk, A. Tata, T. Heel, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *125*, 5681.
- [111] R. G. Berger (Hrsg.) *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [112] C. M. Oberhauser, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2018**.
- [113] J. W. Dubendorff, F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 45.
- [114] T. Reinard, *Molekularbiologische Methoden*, 1. Aufl., Ulmer, Stuttgart, **2010**.
- [115] a) Novagen, *pET System Manual*, USA, **2005**; b) F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113.
- [116] "ExpASY - ProtParam tool", zu finden unter <https://web.expasy.org/protparam/>, **2020**.
- [117] G. Hannig, S. C. Makrides, *Tibtech* **1998**, *16*, 54.
- [118] F. Lottspeich, J. W. Engels (Hrsg.) *Bioanalytik*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2009**.
- [119] H. Döbeli, A. Trzeciak, D. Gillessen, H. Matile, I. K. Srivastava, L. H. Perrin, P. E. Jakob, U. Certa, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, *41*, 259.
- [120] J. Crowe, B. S. Masone, J. Ribbe, *Mol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 247.
- [121] K. Cammann (Hrsg.) *Instrumentelle analytische Chemie. Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2010**.
- [122] E. R. Kuhn, *LCGC Asia Pacific* **2002**, *5*, 30.
- [123] R. P. Adams, *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 515.
- [124] W. Brandt, L. Bräuer, N. Günnewich, J. Kufka, F. Rausch, D. Schulze, E. Schulze, R. Weber, S. Zakharova, L. Wessjohann, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1758.
- [125] K.-E. Jaeger, A. Liese, C. Sylidat (Hrsg.) *Einführung in die Enzymtechnologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [126] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 81.
- [127] a) A. Wallqvist, D. G. Covell, and D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 427; b) B. J. Bennion, V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5142; c) P. J. Rossky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 16825.
- [128] G. Maurer (Hrsg.) *Thermodynamic Properties of Complex Fluid Mixtures. Influence of Additives on Hydrophobic Association in Polynary Aqueous Mixtures. An NMR Relaxation and Self-Diffusion Study*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [129] A. K. Bhuyan, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13386.
- [130] N. Prota, R. Mumm, H. J. Bouwmeester, M. A. Jongsma, *Phytochemistry* **2014**, *108*, 129.
- [131] D. E. Cane, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 1109.
- [132] B. K. Tidd, *J. Chem. Soc.* **1971**, 1168.
- [133] M. Binnewies, M. Jäckel, H. Willner, G. Rayner-Canham, *Allgemeine und anorganische Chemie*, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.

- [134] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 467.
- [135] D. N. Brems, H. C. Rilling, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 8351.
- [136] L. A. Johnson, A. Dunbabin, J. C. R. Benton, R. J. Mart, R. K. Allemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *132*, 8564.
- [137] J. K. Heinonen, R. J. Lahti, *Analyt. Biochem.* **1981**, *113*, 313.
- [138] B. A. Kerwin, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2924.
- [139] J. M. Neugebauer, *Method. Enzymol.* **1990**, *182*, 239.
- [140] T. Scheper, W. Babel, H. W. Blanch, C. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klivanov, B. Mattiasson, S. B. Primrose, *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1998**.
- [141] M. Sköld, A.-T. Karlberg, M. Matura, A. Börje, *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 538.
- [142] K. R. Kopecky, H. J. Reich, *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2265.
- [143] J. Degenhardt, J. Gershenzon, *Planta* **2000**, *210*, 815.
- [144] a) D. A. Dougherty, M. L. Wise, M. Urbansky, R. M. Coates, R. B. Croteau, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15375; b) M. Chen, W. K. W. Chou, N. Al-lami, J. A. Faraldos, R. K. Allemann, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2016**, *55*, 2864.
- [145] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman, *J. Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 3389.
- [146] A. A. Schaffer, L. Aravind, T. L. Madden, S. Shavirin, J. L. Spouge, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, S. V. Altschul, *Nucl. Acids Res.* **2001**, *29*, 2994.
- [147] G. T. Wawrzyn, M. B. Quin, S. Choudhary, F. López-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 772.
- [148] a) K. Seidel, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2017**; b) B. Schröder, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2018**.
- [149] C. S. Sell, *Chemistry and the Sense of Smell*, Wiley, Hoboken, **2014**.
- [150] E. T. Theime, *Fragrance Chemistry: The Science of the Sense of Smell*, Elsevier, Amsterdam, **2012**.
- [151] V. Harms, B. Schröder, C. M. Oberhauser, D. T. Cong, S. Winkler, G. Dräger, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4360.
- [152] a) J. S. Dickschat, T. Nawrath, V. Thiel, B. Kunze, R. Müller, S. Schulz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8287; b) N. L. Brock, S. R. Ravella, S. Schulz, J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2100.
- [153] a) J.-W. de Kraker, M. C. R. Franssen, M. Joerink, A. de Groot, H. J. Bouwmeester, *Plant. Physiol.* **2002**, *129*, 257; b) A. M. Adio, C. Paul, H. Tesso, P. Kloth, W. A. König, *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 1631.
- [154] J.-W. de Kraker, M. C. R. Franssen, A. de Groot, W. A. König, H. J. Bouwmeester, *Plant. Physiol.* **1998**, *117*, 1381.
- [155] T. H. W. Frister, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2015**.

- [156] a) T. Gerhards, U. Mackfeld, M. Bocola, E. von Lieres, W. Wiechert, M. Pohl, D. Rother, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2805; b) M. Vihinen, *Prot. Eng., Des. Sel.* **1987**, *1*, 477; c) I. Maffucci, D. Laage, F. Sterpone, G. Stirnemann, *Chemistry* **2020**.
- [157] P. E. O'Maille, A. Malone, N. Dellas, B. Andes H., L. Smentek, I. Sheehan, B. T. Greenhagen, J. Chappell, G. Manning, J. P. Noel, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 617.
- [158] P. A. Fields, *Comp. Biochem. Physiol. A* **2001**, *129*, 417.
- [159] T. E. Siebert, C. Wood, G. M. Elsey, A. P. Pollnitz, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3745.
- [160] A.-C. Huang, S. Burrett, M. A. Sefton, D. K. Taylor, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10809.
- [161] L. Fitjer, A. Malich, C. Paschke, S. Kluge, R. Gerke, B. Rissom, J. Weiser, M. Noltemeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9180.
- [162] V. A. Khan, Y. V. Gatilov, Z. V. Dubovanko, V. A. Pentegova, *Chem. Nat. Compd.* **1979**, *15*, 572.
- [163] S. Shankar, R. M. Coates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9177.
- [164] N. L. Brock, K. Huss, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 311.
- [165] Y. Iijima, G. Wang, E. Fridman, E. Pichersky, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *448*, 141.
- [166] P. Rabe, J. Rinkel, T. A. Klapschinski, L. Barra, J. S. Dickschat, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 158.
- [167] X. Lin, M. Hezari, A. E. Koepp, H. G. Floss, R. Croteau, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2968.
- [168] J. A. Faraldos, S. Wu, J. Chappell, R. M. Coates, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7733.
- [169] K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *30*, 1525.
- [170] J. Rinkel, J. S. Dickschat, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2426.
- [171] A. M. Adio, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1533.
- [172] P. Rabe, L. Barra, J. Rinkel, R. Riclea, C. A. Citron, T. A. Klapschinski, A. Janusko, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13649.
- [173] A. M. Adio, P. C. Klotha, W. A. König, *Phytochemistry* **2004**, *65*.
- [174] M. Kodama, S. Yokoo, Y. Matsuki, S. Itô, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *19*, 1687.
- [175] a) A. J. Weinheimer, W. W. Youngblood, P. H. Washecheck, T. K. B. Karns, L. S. Ciereszko, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *7*, 497; b) C. Nishino, W. S. Bowers, M. E. Montgomery, L. R. Nault, M. W. Nielson, *J. Chem. Ecol.* **1976**, *3*, 149.
- [176] E.-M. Wichtmann, E. Stahl-Biskup, *Flavour Fragrance J.* **1987**, *2*, 83.
- [177] P. Rabe, J. Rinkel, B. Nubbemeyer, T. G. Köllner, F. C., J. S. Dickschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15420.
- [178] a) C. S. Sell, *Chemistry of the sense of smell*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, **2014**; b) E. T. Theimer (Hrsg.) *Fragrance Chemistry. Science of the Sense of Smell*, Elsevier Science, Oxford, **1982**.
- [179] M. A. Umbreit, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526.
- [180] K. M. Höld, N. S. Sirisoma, S. E. Sparks, J. E. Casida, *Xenobiotica* **2002**, *32*, 251.
- [181] M. Dein, P. C. K. Wickramasinghe, J. P. Munafo, *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10388.
- [182] M. A. Upshur, H. M. Chase, B. F. Strick, C. J. Ebben, L. Fu, H. Wang, R. J. Thomson, F. M. Geiger, *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 2684.

- [183] T. Siemon, Z. Wang, G. Bian, T. Seitz, Z. Ye, Y. Lu, S. Cheng, Y. Ding, Y. Huang, Z. Deng et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 2760.
- [184] "alpha-Pinen No. 2898", zu finden unter SDBSWeb : <https://sdfs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 06.10.2020).
- [185] S. W. M. Crossley, F. Barabé, R. A. Shenvi, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16788.
- [186] D. D. Ford, L. P. C. Nielsen, S. J. Zuend, C. B. Musgrave, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15595.
- [187] S. E. Schaus, B. D. Brandes, J. F. Larrow, M. Tokunaga, K. B. Hansen, A. E. Gould, M. E. Furrow, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1307.
- [188] a) A. Nakamura, M. Nakada, *Synthesis* **2013**, *45*, 1421; b) D. Arigoni, A. Vasella, K. B. Sharpless, Harbo P. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7916; c) H. P. Jensen, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 264-265; d) M. A. Warpehoski, B. Chabaud, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2897; e) K. B. Sharpless, R. F. Lauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7155.
- [189] F. Saito, J. Becker, P. R. Schreiner, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 4441.
- [190] R. L. Nyland, Y. Xiao, P. Liu, C. L. Freel M., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17734.
- [191] S. D. Yeoh, C. E. Skene, J. M. White, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 311.
- [192] R. Li, W. K. W. Chou, J. A. Himmelberger, K. M. Litwin, G. G. Harris, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2014**, *53*, 1155.
- [193] a) L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. E. Sternberg, *Nature Protocols* **2015**, *10*, 845; b) Protein [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (NCBI), "Q6WP50.1", zu finden unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q6WP50.1>, **2004**.
- [194] C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 695.
- [195] a) Mathis J.R., Back K., Starks C., Noel J., Poulter C. D., Chappell J., *Biochemistry* **1997**, *36*, 8340; b) Back K., Chappell J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6841.
- [196] a) Cane D. E., Xue Q., Fitzsimons B. C., *Biochemistry* **1996**, *35*, 12369; b) Cane D. E., Shim J. H., Xue Q., Fitzsimons B. C., Hohn T. M., *Biochemistry* **1995**, *34*, 2480.
- [197] Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078.
- [198] D. B. Little, R. B. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 120.
- [199] D. J. Tantillo, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 10172.
- [200] Jenson C., Jorgensen W. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846.
- [201] K. Z. Kalbarczyk, *Diplomarbeit*, California Institute of Technology, Pasadena, Kalifornien, **2013**.
- [202] J. A. Marco, J. F. Sanz-Cervera, M. D. Morante, V. García-Lliso, J. Vallès-Xirau, J. Jakupovic, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 837.
- [203] P. Weyerstahl, H. Marschall, M. Schulze, I. Schwöpe, *Liebigs Ann.* **1996**, 799.
- [204] a) K. L. Dhar (Hrsg.) *Newer trends in essential oils and flavours. Selected papers pres. at the International Symposium on Newer Trends in Essential Oils and Flavours ISNTEOF-91 Jammu*

- Tawi*, October 21 - 23, 1991, Tata McGraw-Hill, New Delhi, **1993**; b) P. Weyerstahl, H. Marschall, M. Schröder, H.-C. Wahlberg, V. K. Kaul, *Flavour Fragrance J.* **1997**, *12*, 315.
- [205] A. González-Coloma, F. Valencia, N. Martin, J. J. Hoffmann, L. Hutter, J. A. Marco, M. Reina, *J. Chem. Ecol.* **2020**, *28*, 117.
- [206] P. Rabe, T. Schmitz, J. S. Dickschat, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1839.
- [207] R. Chiba, A. Minami, K. Gomi, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594.
- [208] P. Weyerstahl, H. Marschall, I. Seelmann, J. Jakupovic, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1205.
- [209] S. Melching, W. A. König, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 517.
- [210] S. C. Pinto, G. G. Leitão, H. R. Bizzo, N. Martinez, E. Dellacassa, F. M. dos Santos, F. L. P. Costa, M. B. de Amorim, S. G. Leitão, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4785.
- [211] P. Joseph-Nathan, S. G. Leitão, S. C. Pinto, G. G. Leitão, H. R. Bizzo, F. L. P. Costa, M. B. de Amorim, N. Martinez, E. Dellacassa, A. Hernández-Barragán et al., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1963.
- [212] A. Y. Hong, B. M. Stoltz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9674.
- [213] L.-D. Syntrivanis, I. Némethová, D. Schmid, S. Levi, A. Prescimone, F. Bissegger, D. T. Major, K. Tiefenbacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 5894.
- [214] T. M. Khomenko, I. Yu. Bagryanskaya, Yu. V. Gatilov, D. V. Korchagina, V. P. Gatilova, Zh. V. Dubovenko, V. A. Barkash, *Zh. Org. Khim.* **1985**, *21*, 677.
- [215] S. C. Pinto, G. G. Leitão, D. R. de Oliveira, H. R. Bizzo, D. F. Ramos, T. S. Coelho, P. E. A. Silva, M. S. C. Lourenço, S. G. Leitão, *Nat. Prod. Comm.* **2009**, *4*, 1675.
- [216] X. Tang, R. K. Allemann, T. Wirth, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2*, 414.
- [217] R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694.
- [218] P.-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, E. M. Papamichael, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1846.
- [219] Nielsen P. M., Brask J., Fjerbaek L., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 692.
- [220] M. Kapoor, M. N. Gupta, *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 555.
- [221] Krishna H. S., Karanth N. G., *Catal Rev.* **2002**, *44*, 499.
- [222] C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 711.
- [223] Kuo S.-J., Parkin K.L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 393.
- [224] K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biol.* **2002**, *13*, 390.
- [225] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *118*, 155.
- [226] R. Sharma, Y. Christi, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627.
- [227] G. Reed, H.-J. Rehm (Hrsg.) *Biotechnology. A multi-volume comprehensive treatise*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1993**.
- [228] M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145.
- [229] a) Lang D. A., Mannesse M. L. M., De Haas G. H., Verheij H. M., Dijkstra B. W., *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 333; b) Lang D. A., Dijkstra B. W., *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 115.
- [230] Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Krieger N., Soccol V. T., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 119.

- [231] Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M. E., Miller R., *Adv. Colloid Interf. Sci.* **2009**, 147-148, 237.
- [232] Kokkinou M., Theodorou L. G., Papamichael E. M., *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2012**, 55, 231.
- [233] P. Domínguez de María, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, A. R. Alcántara, *Biotechn. Adv.* **2006**, 24, 180.
- [234] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12843.
- [235] S. Benjamin, A. Pandey, *Yeast* **1998**, 14, 1069.
- [236] M. Cygler, J. D. Schrag, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 205.
- [237] P. Domínguez de María, J. V. Sinisterra, J. M. Sánchez-Montero, M. Lotti, F. Valero, A. R. Alcántara, *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 38, 199.
- [238] G. Benzonana, S. Esposito, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 231, 15.
- [239] a) J. F. Shaw, C. H. Chang, *Biotechnol. Lett.* **1989**, 11, 779; b) W. Wu, H., Akoh, C. C., R. S. Phillips, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 18, 536.
- [240] I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, 53, 275.
- [241] H. W.-S. Chan, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 327, 32.
- [242] D. F. Hildebrand, *Physiol. Plant.* **1989**, 76, 249.
- [243] H. Theorell, R. T. Holman, A. Akeson, *Acta Chem. Scand.* **1947**, 1, 571.
- [244] T. Baysal, A. Demirdöven, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 491.
- [245] J. N. Siedow, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, 42, 145.
- [246] A. Liavonchanka, I. Feussner, *J. Plant Physiol.* **2006**, 163, 348.
- [247] B.-J. Kim, K.-C. Shin, D.-K. Oh, *J. microbiol. biotechnol.* **2014**, 24, 359.
- [248] Gilles I., Georges L., Jacques B., Gérard B., Christian T., *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1690.
- [249] M. E. Newcomer, A. R. Brash, *Protein Sci.* **2015**, 24, 298.
- [250] R. Heshof, L. H. de Graaff, J. J. Villaverde, A. J. D. Silvestre, T. Haarmann, T. K. Dalsgaard, J. Buchert, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 36, 665.
- [251] A. Andreou, I. Feussner, *Phytochemistry* **2009**, 70, 1504.
- [252] L. E. Chohany, K. A. Bishop, H. Camic, S. J. Sup, P. M. Findeis, C. H. Clapp, *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 94.
- [253] H. W. Gardner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 73, 1347.
- [254] A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 23679.
- [255] C. Göbel, I. Feussner, *Phytochemistry* **2009**, 70, 1485.
- [256] H. Fukushige, D. F. Hildebrand, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 6877.
- [257] Doris W., Peter S., *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 626.
- [258] V. S. Chedea, M. Jisaka, *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, 12, 2786.
- [259] J. M. Faubion, R. C. Hosney, *cereal Chem.* **1981**, 58, 175.
- [260] A. Nemchenko, S. Kunze, I. Feussner, M. Kolomiets, *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 3767.
- [261] H. W. Gardener, *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 7, 65.
- [262] J. C. Boyington, B. J. Gaffney, L. M. Amzel, *Science* **1993**, 260, 1482.

- [263] E. Skrzypczak-Jankun, R. A. Bross, R. T. Carroll, W. R. Dunham, M. O. Funk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10814.
- [264] W. R. Dunham, R. T. Carroll, J. F. Thompson, R. H. Sands, M. O. Funk Jr., *Eur. J. Biochem.* **1990**, *190*, 611.
- [265] W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J. T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10687.
- [266] G. Coffa, A. N. Imber, B. C. Maguire, G. Laxmikanthan, C. Schneider, B. J. Gaffney, A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38756.
- [267] G. Coffa, A. R. Brash, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 15579.
- [268] E. Hornung, M. Walther, H. Kühn, I. Feussner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4192.
- [269] H. W. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1084*, 221.
- [270] H. W. Gardener, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1001*, 274.
- [271] M. R. Egmond, J. F. G. Vliegthart, J. Boldingh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *48*, 1055.
- [272] C. Jansen, K. Hofheinz, R. Vogel, J. Roffeis, M. Anton, P. Reddanna, H. Kuhn, M. Walther, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 37804.
- [273] S. Aziz, Z. Wu, D.S. Robinson, *Food. Chem.* **1999**, *64*, 227.
- [274] Y. Waché, A. Bosser-De Ratuld, J.-M. Belin, *Proc. Biochem.* **2006**, *41*, 2337.
- [275] I. Plagemann, U. Krings, R. G. Berger, *J. Biosci.* **2014**, *69*, 149.
- [276] S. Krügener, U. Krings, H. Zorn, R. G. Berger, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 457.
- [277] U. Krings, N. Lehnert, M. A. Fraatz, B. Hardebusch, H. Zorn, R. G. Berger, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9944.
- [278] a) N. Lehnert, U. Krings, D. Sydes, M. Wittig, R. G. Berger, *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 329; b) M. A. Fraatz, S. J.L. Riemer, R. Stöber, R. Kaspera, M. Nimtz, R. G. Berger, H. Zorn, *J. Mol. Catal., B Enzym.* **2009**, *61*, 202.
- [279] R. Kaspera, U. Krings, D. S. M. Pescheck, J. Schrader, R. G. Berger, *J. Biosci.* **2005**, *60*, 459.
- [280] B. Muller, C. Dean, C. Schmidt, J.-C. Kuhn, 5.847.226, **1997**.
- [281] *ISO 9235:2013(en), Aromatic natural raw materials — Vocabulary*, **2013**.
- [282] S. Bhattacharya in *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (Hrsg.: V. R. Preedy), Elsevier Ltd, Amsterdam, **2015**, S. 19–29.
- [283] A. Stratakos, A. Koidis in *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (Hrsg.: V. R. Preedy), Elsevier Ltd, Amsterdam, **2015**, S. 31–38.
- [284] Q. Lang, C. M. Wai, *Talanta* **2001**, *53*, 771.
- [285] M. Khajeh, Yadollah Y., N. Bahramifar, F. Sefidkon, M. R. Pimoradei, *Food Chem.* **2005**, *91*, 639.
- [286] M. J. Piggott, E. L. Ghisalberti, R. D. Trengove, *Flavour Fragrance J.* **1997**, *12*, 43.
- [287] C. Turek, F. C. Stintzing, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40.
- [288] V. R. Preedy (Hrsg.) *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Elsevier Ltd, Amsterdam, **2015**.

- [289] a) K. Malatova, N. Hitimana, T. Niyibizi, J. E. Simon, H. R. Juliani, *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1348; b) A. J. Karamanos, D. E.K. Sotiropoulou, *Ind. Crops Prod.* **2013**, *46*, 246; c) W. C. Evans, D. Evans, G. E. Trease (Hrsg.) *Trease and Evans pharmacognosy*, Saunders/Elsevier, Edinburgh, **2009**.
- [290] S.-T. Chou, Y. Shih, C.-C. Lin in *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (Hrsg.: V. R. Preedy), Elsevier Ltd, Amsterdam, **2015**, S. 843–848.
- [291] G. Ohloff, W. Pickenhagen, P. Kraft, *Scent and chemistry. The molecular world of odors*, Verl. Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH, Zürich, Weinheim, **2012**.
- [292] I. Notar Francesco, J.-J. Filippi, S. Antoniotti, *ChemPlusChem* **2017**, *82*, 407.
- [293] J.-C. Ellena, *H&R Contact* **2000**, *82*, 27.
- [294] H. J. Kim, F. Chen, X. Wang, H. Y. Chung, Z. Jin, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7691.
- [295] a) H. Spreitzer, A. Pichler, W. Holzer, M. Shahabi, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1857; b) H. Spreitzer, A. Pichler, W. Holzer, I. Toth, B. Zuchard, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 139; c) H. Spreitzer, A. Pichler, W. Holzer, C. Schlager, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 40; d) P. Weyerstahl, H. Marschall, U. Splittergerber, D. Wolf, H. Surberg, *Flavour Frag. J.* **2000**, *15*, 395.
- [296] J. M. Rodilla, L. A. Silva, N. Martinez, D. Lorenzo, D. Davyt, L. Castillo, C. Giménez, R. Cabrera, A. González-Coloma, J. Zrostlíková et al., *Ind. Crops. Prod.* **2011**, *33*, 497.
- [297] L. Tissandié, M. Gaysinski, H. Brévard, U. J. Meierhenrich, J.-J. Filippi, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 526.
- [298] T. Waller, M. Barros, J. Draque, P. Micucci, *Med. Plant Conserv.* **2012**, *15*, 4.
- [299] G. Geske, US2007/0231417 A1, **2007**.
- [300] M. R. Hiebert, M. E. Flores-Giubi, J. E. Barua, G. M. Molina-Salinas, E. A. Ferro, N. L. Alvarenga, *Rev. Latinoamer. Quim.* **2012**, *40*, 7.
- [301] H.-L. Wang, J.-C. Chang, L.-W. Fang, H.-F. Hsu, L.-C. Lee, J.-F. Yang, M.-T. Liang, P.-C. Hsiao, C.-P. Wang, S.-W. Wang et al., *Molecules* **2018**, *23*.
- [302] M. B. Erman, B. J. Kane, *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 910.
- [303] a) P. N. Davey, M. J. Earle, J. T. Hamill, S. P. Katdare, D. W. Rooney, K. R. Seddon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 628; b) I. Kiran, Ö. Özşena, K H. Can Başer, F. Demirci, *Nat. Prod. Comm.* **2017**, *12*, 1529.
- [304] N. M. Vandewiele, K. M. van Geem, M.-F. Reyniers, G. B. Marin, *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2011**, *90*, 187.
- [305] S. Antoniotti, *Molecules* **2014**, *19*, 9203.
- [306] N. López, M. A. Pernas, L. M. Pastrana, A. Sánchez, F. Valero, M. L. Rúa, *Biotechnol. Proc.* **2004**, *20*, 65.
- [307] P. Domínguez de María, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, A. R. Alcántara, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 180.
- [308] M. D. Romero, L. Calvo, C. Alba, A. Daneshfar, H. S. Ghaziaskar, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 42.
- [309] A. Pühler, D. R. Kelly, G. Reed, H.-J. Rehm, P. Stadler (Hrsg.) *Biotechnology. Volume 8a: Biotransformations I*, Wiley-VCH, Weinheim, New--York, Chichester, **1998**.

- [310] M. N. Gupta (Hrsg.) *Methods and tools in biosciences and medicine*, Birkhäuser, Basel, **2000**.
- [311] H. Frykman, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1367.
- [312] A. Ghogare, G. S. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 134.
- [313] B. Berger, C. G. Rabiller, K. Königsberger, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron Asymmetry* **1990**, *1*, 541.
- [314] V. Athawale, N. Manjrekar, M. Athawale, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4797.
- [315] J. Ramilijaona, E. Raynaud, C. Bouhler, E. Sarrazin, X. Fernandez, S. Antoniotti, *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 2291.
- [316] H. K. Weber, H. Stecher, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 803.
- [317] L. N. Yee, C. C. Akoh, R. S. Phillips, *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 67.
- [318] S.-J. Kuo, K. L. Parkin, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 393.
- [319] D. O'Hagan, N. A. Zaldi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1111.
- [320] D. O'Hagan, N. A. Zaidi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 947.
- [321] S. Antoniotti, X. Fernandez, E. Duñach, *Biocatal. Biotransformation* **2008**, *26*, 228.
- [322] E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211.
- [323] J. Pleiss, M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, R. D. Schmid, *J. Mol. Catal., B Enzym.* **2000**, *10*, 491.
- [324] G. Langrand, N. Rondot, C. Triantaphylides, J. Baratti, *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 581.
- [325] a) L. da Silva Corrêa, R. O. Henriques, J. V. Rios, L. A. Lerin, D. de Oliveira, A. Furigo Jr., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *190*, 574; b) M. Iwai, S. Okumura, Y. Tsujisaka, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2731; c) C.-J. Shieh, C. C. Akoh, L. N. Yee, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *51*, 371; d) H. Abbas, L. Comeau, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 589.
- [326] a) F. Z. Belkacemi, M. Merabet-Khelassi, L. Aribi-Zoulouche, O. Riant, *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44*, 6847; b) F. Benamia, S. Benouis, A. Belafriekh, N. Semache, N. Rebbani, Z. Djeghaba, *Chem. Pap.* **2017**, *71*, 785; c) D. Brady, S. Reddy, B. Mboniswa, L. H. Steenkamp, A. L. Rousseau, C. J. Parkinson, J. Chaplin, R. K. Mitra, T. Moutlana, S. F. Marais et al., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *75*, 1; d) C.-S. Chen, S.-H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812; e) W.-H. Wu, C. C. Akoh, R. S. Phillips, *J. Food Lipids* **1996**, *3*, 189.
- [327] T. Castagnet, G. Aguirre, J. M. Asua, L. Billon, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 7503.
- [328] W.-D. Chiang, S.-W. Chang, C.-J. Shieh, *Proc. Biochem.* **2003**, *38*, 1193.
- [329] S. G. Cao, Z. B. Liu, Y. Feng, L. Ma, Z. T. Ding, Y. H. Cheng, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, *32*, 1.
- [330] D. L. Shen, X. He, W. Guan, Y. P. Liu, B. G. Sun, *Adv. Mat. Res.* **2013**, *781-784*, 983.
- [331] J. Kim, S. Haam, D.-W. Park, I.-S. Ahna, Ta. G. Lee, H.-S. Kimb, W.-S. Kim, *Chem. Eng. J.* **2004**, *99*, 15.
- [332] a) S. Divakar (Hrsg.) *Enzymatic transformation*, Springer, New Delhi, **2013**; b) K. R. Kiran, C. V. Suresh Babu, S. Divakar, *Proc. Biochem.* **2001**, *36*, 885; c) R. García, M. Martínez, J. Aracil, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 173.
- [333] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.

- [334] a) J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543; b) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512; c) I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092; d) T. Kusumi, Y. Fujita, I. Ohtani, H. Kakisawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2923; e) G. Jürjens, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3000.
- [335] M. Hamberg, *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 515.
- [336] J. C. Boyington, B. J. Gaffney, L. M. Amzel, *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 744.
- [337] B. Axelrod, T. M. Cheesbrough, S. Laakso, *Methods Enzymol.* **1981**, *71*, 441.
- [338] A. E. Johnston, K. T. Ziolk, E. Selke, H. J. Dutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1961**, *38*, 367.
- [339] S. Kermasha., N. Dioum, B. Bisakowski, *J. Mol. Catal. B: Enzym* **2001**, *11*, 909.
- [340] P. Drouet., D. Thomas., M. D. Legoy., *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3923.
- [341] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 5329.
- [342] I. Plagemann, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2014**.
- [343] Osamu H., Toro N., Toshihiko Y., Yashushi K., Osamu S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 1911.
- [344] V. Weidmann, M. Schaffrath, H. Zorn, J. Rehbein, W. Maison, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2233.
- [345] G. Rothenberg, Y. Sasson, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5417.
- [346] R. Bernardi, T. Caronna, D. Coggiola, F. Ganazzoli, S. Morrocchi, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1045.
- [347] B. Hong, R. Lebeuf, S. Delbaere, P. Alsters, V. Nardello-Rataj, *Catalysts* **2016**, *6*, 184.
- [348] L. J. J. Laarhoven, P. Mulder, D. D. M. Wayner, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 342.
- [349] A. G. Davies, I. G. E. Davison, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1989**, *2*, 825.
- [350] J. Onken, R.G. Berger, *J. Biotechnol.* **1999**, *69*, 163.
- [351] R. Kaspera, *Dissertation*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2004**.
- [352] a) E. A. Espinosa-Fuentes, L. C. Pacheco-Londoño, M. Hidalgo-Santiago, M. Moreno, R. Vivas-Reyes, S. P. Hernández-Rivera, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 10753; b) L. Jensen, P. M. Mortensen, R. Trane, P. Harris, and R. W. Berg, *Appl. Spectrosc.* **2009**, *63*, 92.
- [353] G. O. Schenck, O.-A. Neumüller, W. Eisfeld, *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 595.
- [354] U. Neuenschwander, K. F. Jensen, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 601.
- [355] N. H. Anh, H. Ripperger, T. van Sung, G. Adam, *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1167.
- [356] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden., H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.

13 Anhang

13.1 Gen- und Proteinsequenzen

Tabelle 117: Sequenzen der verwendeten synthetischen Gene der STC BcBOT2 und STC PenA.

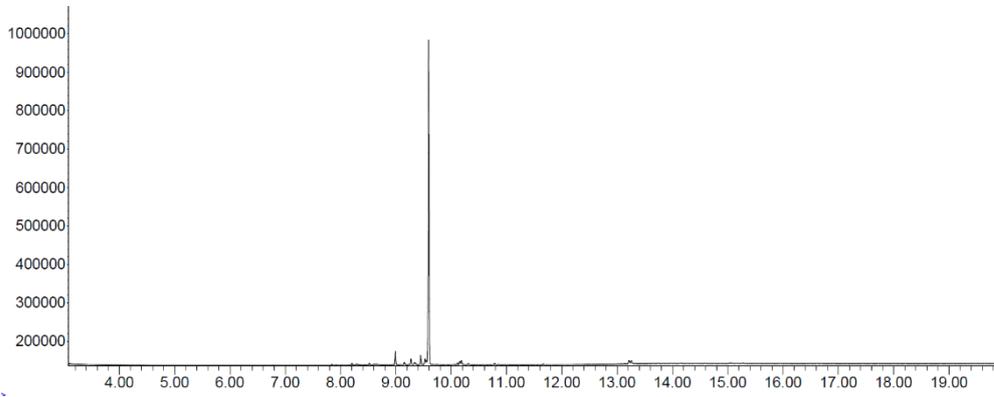
BcBOT2	1213 bp
<p>GAATTCATATGGCCATTCCGGCACTGGAGCCGAGCTGCATGATGCCGATACAAGCAGCAACAACATGAGCAGC AACAGCACCGATAGTGGCTATGACACCAACAGCACACACCGCTGGAAAAAGCGAAAAGCCGAATACCCAGGAG CTGAAACAGCAGCAGTTAGATCCGAAGCGCCCGCCGTTTGTGCGCGTTCCTGATCTGTTTGGTAGCATTATGAGCA CCAAGCCGGTGGTGAATCCTAACTACTTCGAGCCAAGGCCCGTGGTGACCGTTGGATCGCCCGTGTGATGAACTT CAACAAAGCCGTGGCCGACGCAACAGCAAAGTGGACCTGTGCTTTCTGGCCAGTATGTGGGCACCGGATGCACC GGAAGATCGTCTGGTGTGATGCTGGATTGGAACCACTGGGTGTTCTGTTTCGATGACCAGTTTGACGAGGGTCAC CTGAAAGAAGATCCGGCCGAGCCGCCGAAGAAGTGAAGCAGACCATTGCCATTATGGGCGGTAACGCACCGCGT TACACCGCCGAAAGCAACCCGATCCGTTACGTGTTTCAGCAGTGCTGGGATCGTCTGAAAGCCGTGAGCAGTCAGG AAATGCAGCAGCGTTGGATTGACCAGCACAAGCGCTACTTCGATCAGCTGTTAGTGCAAGTGGACCAGCAGGTGG GTGGTGAGAACCTTACCCGTGATGTGGAAGCATATATGGACCTGCGCCGCGGTACCATTGGTGTGTATCCTGCCAT CAGCCTGAGTGAGTATGGCGCAGGCGTTAATGTTCCGAGCAGCTGTATGACCATCCGAGCCTGCAGGAATGCAT GAAAGTGAGCGCCGATCTGGTGACCCTGGTGAACGACGTGCTGAGCTACCGCAAAGACTTAGAACTGGGCGTGGA CCATAACCTGATGAGCCTGCTGATGACGCGTGACAATCTGAGCGCACAAACAGGCCGTGGACGTGATCGGCGATAT GGTGAATGAATGCTATCGCCGCTGGTATCTGGCACTGGCAGAAGTCCGAGCTACGGTGAGAAGATCGATTACAA TGTGATGAAATTTGTGGAGATTTGCCGTGCCGTTGCCAGGGTAACCTGTACTGGAGTTTTAGACCGGCCGCTAT CTGGGTCCGGAGGGCCACGAAGTGACGAAACCGGTATCATGTACCTGCCTCCGGCCGCAAATTTAGTGGTGGCC TAAGCTT</p>	
PenA	1023 bp
<p>GGATCCATGCCGACGAGCGTGGATTTTCATATCCGCTGCCTGGTCGTCAGAGCCCGGATCATGCACGTGCAGAGG CCGAACAGTTAGCTGGCCGCGTAGTCTGGGCTGATTTCGAGCGATGCAGCAGCAGAACGCCACCTGCGTGGTG GCTATGCCGATCTGGCCAGCCGCTTCTATCCTCATGCCACAGGTGCAGATCTGGATCTGGGTGTGGACCTGATGAG CTGGTTTTTTCTGTTTCGATGATCTGTTTGTGATGGCCCGCGTGGCGAAAATCCGGAGGATACCAAACAGCTGACCGAC CAGGTGGCCCGCCGCTTAGATGGTCCGCTGCCTGATACCGCACCGCGATTGCCACGGTTTTGCAGATATCTGGC GTCGTACCTGTGAGGGCATGACCCCGCATGGTGTGCACGTAGCGCCCGTCATTGGCGCAACTATTTTCGATGGCTA CGTGGATGAGGCCGAAAGTCGTTTTGGAATGCCCGTGCATAGCGCAGCCAGTATCTGGCCATGCGCCGTCAC ACCATCGGTGTGCAGCCGACCGTTGATCTGGCAGAACGCGCCGGTTCGTTTTGAAGTGCCGCATCGCGTTTTTATA GTGCCGTGATGAGTGCATGCTGCAGATTGCCGTTGATGTGAACCTGCTGCTGAACGATATCGCCAGCCTGGAAAA AGAAGAAGCTCGTGGCGAGCAGAATAACATGGTTATGATCCTGCGTCGCGAACATGGCTGGAGCAAGAGCCGTA CGTGAGCCATATGCAGAATGAAGTGCCTGCCCGCCTGGAACAGTACCTGTTACTGGAAAGTTGTCTGCCGAAGGT GGGCGAAATCTATCAGCTGGACACCGCAGAACGCGAAGCCCTGGAGCGCTATCGTACCGATGCCGTTTCGTACCGT GATTCGCGGCAGTTATGACTGGCATCGTAGCAGCGCCGTTACGATGCCGAGTTTGCCTGGCCGAGGCGCCCA GGGTTATCTGGAAGAACTGGGTAGTAGCGCCATAAGCTT</p>	

Tabelle 118: Proteinsequenzen der STC BcBOT2 und STC PenA nach Expression in pET28a(+). Farblich hervorgehoben sind die Proteinsequenz der STC (schwarz), der 6xHis-Tag (orange), das DDxxD-Motiv (rot), das NSE/DTE-Motiv (blau) und die Effektortriade (grün). Der Extinktionskoeffizient (ϵ) und das theoretische Molekulargewicht wurden mittels dem ProtParam Tool bestimmt.

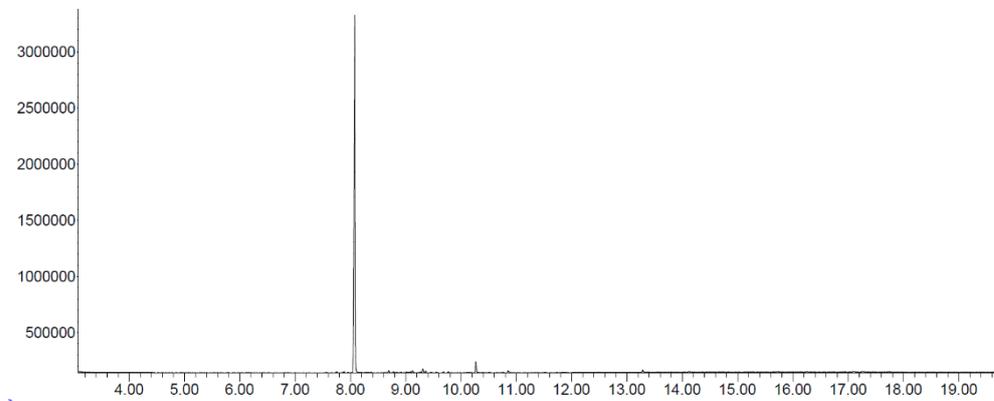
BcBOT2	$\epsilon = 69330$	47.43 kDa
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAIPALEPQLHDADTSSNNMSSNSTDSGYDTNSTTPLEKSEKPNQELKQQQLDPKR PPFVRVPDLFGSIMSTKPVVNPNYFAAKARGDRWIARVMNFNKAVAARNKVDLCFLASMWAPDAPEDRLVMMLD WNHWVFLFDQDFDEGHLKEDPAAAAEEVKQTIAIMGGNAPRYTAESNPIRYVVFQQCWDRKAVSSQEMQQRWIDQ HKRYFDQLLVQVDQVGGENFTRDVEAYMDLRGTIGVYPAISLSEYGAGVNVQHVYDHPSLQECMKVSADLVTLV NDVLSYRKDLELGVDHNLMSLLMQRDNLSAQQAVDVIQDMVNECYRRWYLALAEALPSYGEKIDYNVMMKFVEICRAVA QGNLYWSFQTGRYLGPEGHEVHETGIMYLPAAANLVVA		
PenA	$\epsilon = 60390$	43.07 kDa
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMQPQDVFHIPLPGRQSPDHARAEAEQLAWPRSLGLIRSDA AAERHLRGGYADLASRFYPHATGADLDLGVDLMSWFFLFDLFDGPRGENPEDTKQLTDQVAAALDGPLPDTAPPIAH GFADIWRRTCGMPAWCARSHWRNYFDGYVDEAESRFWNAPCDSAAQYLAMRRHTIGVQPTVDLAERAGRFE VPHRVFDSAVMSAMLQIADVNNLLNDIASLEKEEARGEQNNMVMILRREHGWSKRSVSHMQNEVRARLEQYLLLE SCLPKVGEIYQLDTAEREALERYRTDAVRTVIRGSYDWHRSSGRYDAEFALAAGAQQYLEELGSSAHKLAAALEHHHHH H		

13.2 Chromatogramme

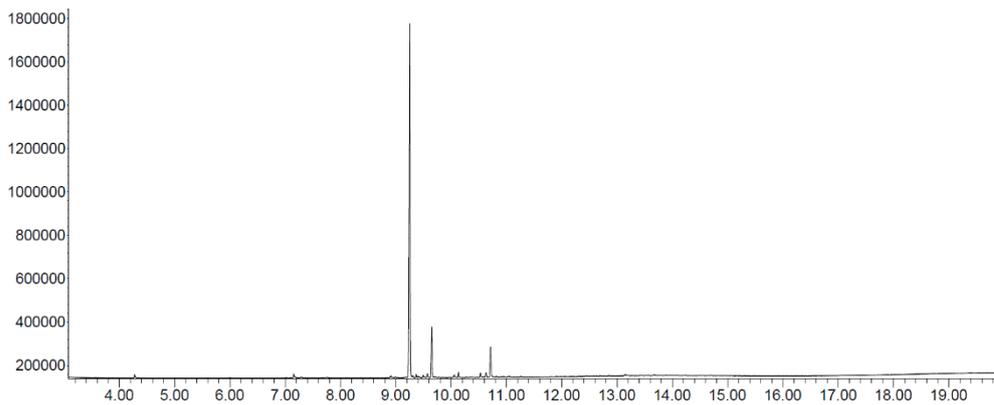
BcBOT2 + FPP (12)



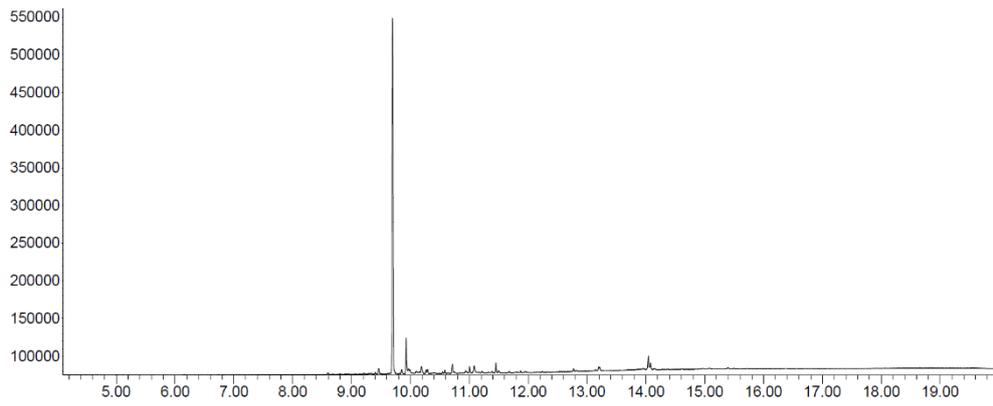
PenA + FPP (12)



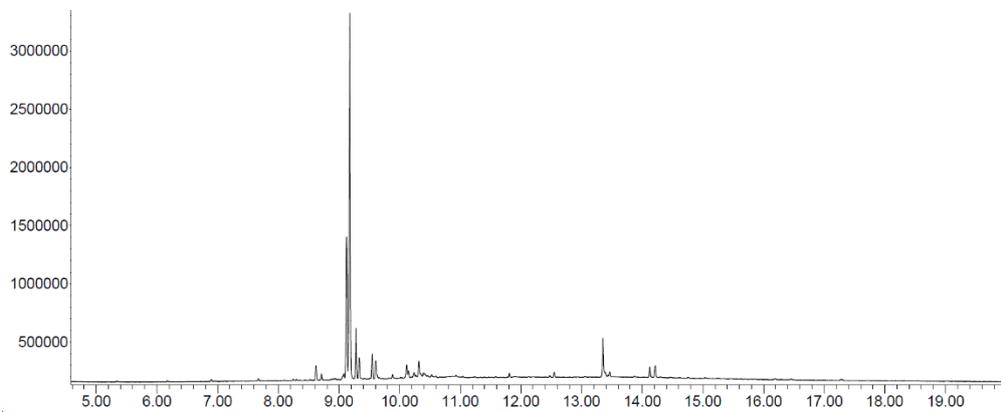
BcBOT2 + 78



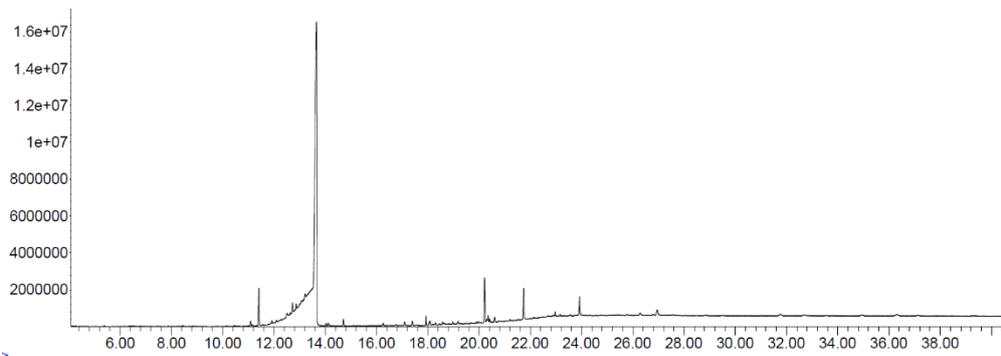
BcBOT2 + 109



BcBOT2 + 110

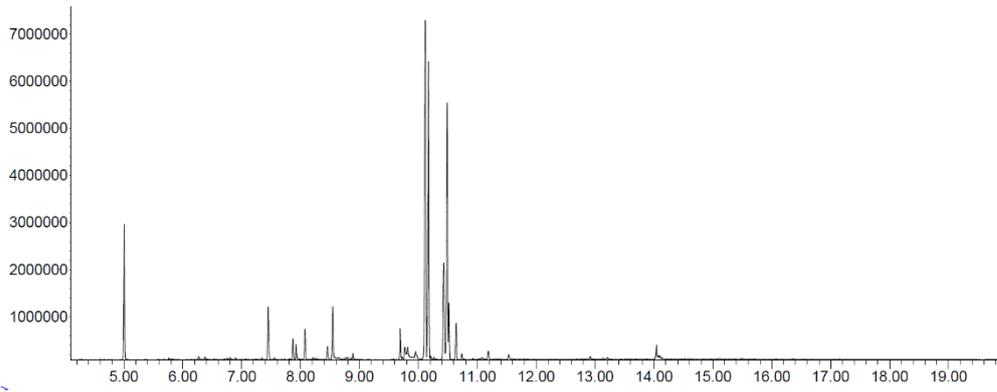


BcBOT2 + 111

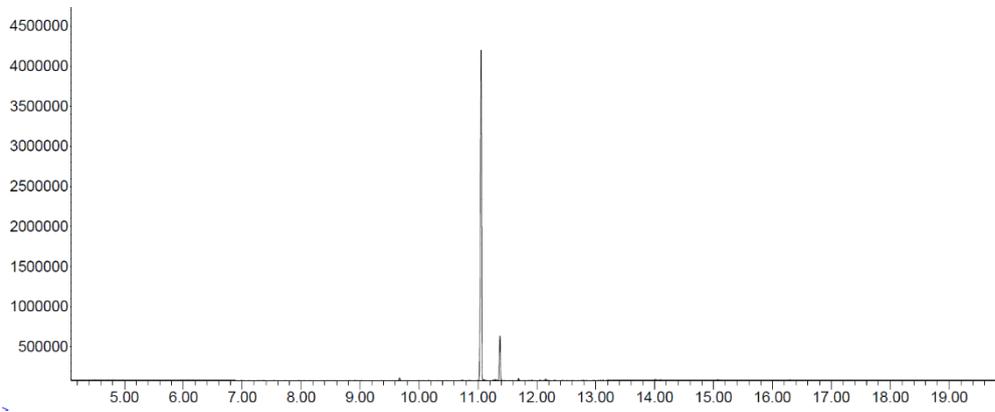


Messung über FFAP-Säule und Abbildung der MS-Spur.

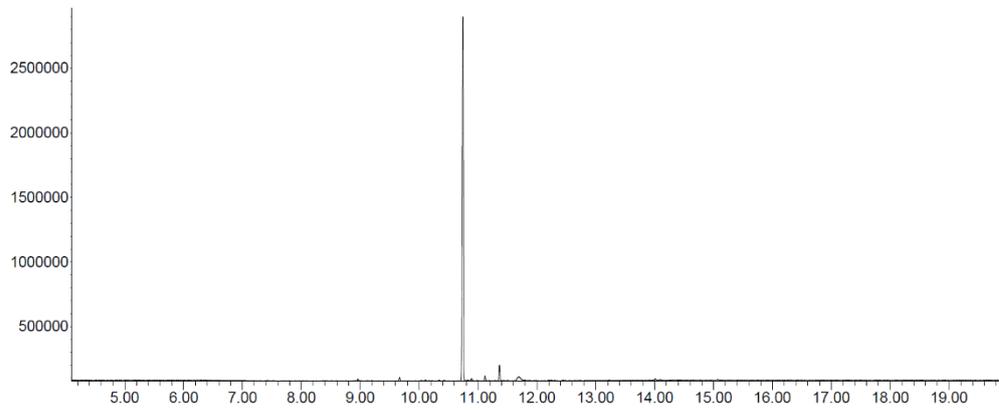
PenA + 78



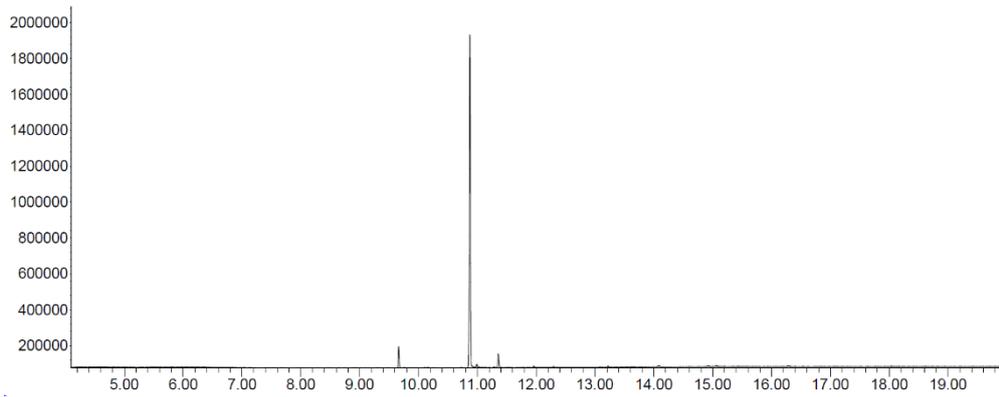
Riley-Oxidationsprodukt 165



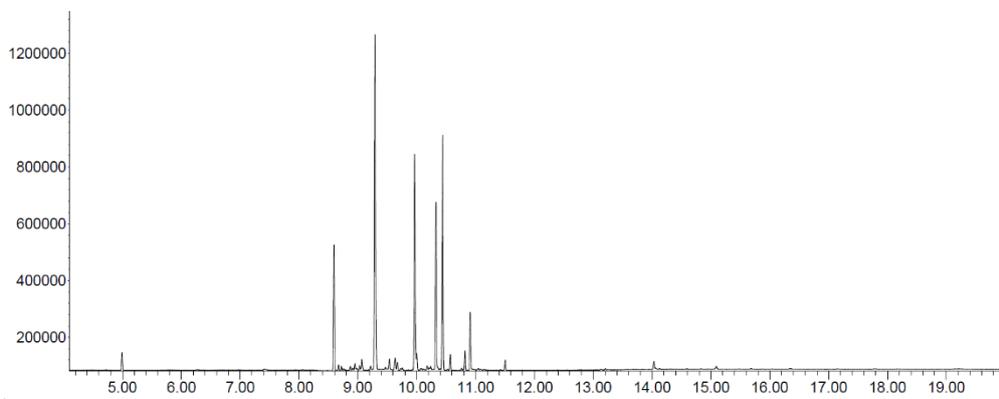
Ozonolyseprodukt 166



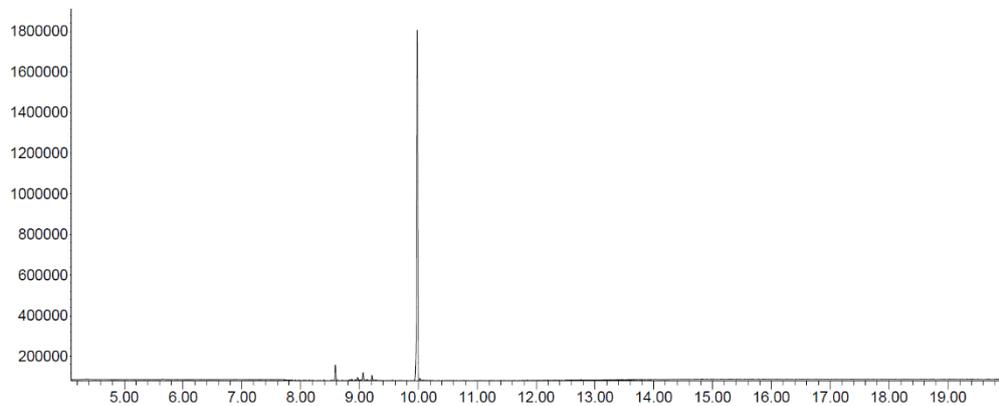
Reduktionsprodukt 167



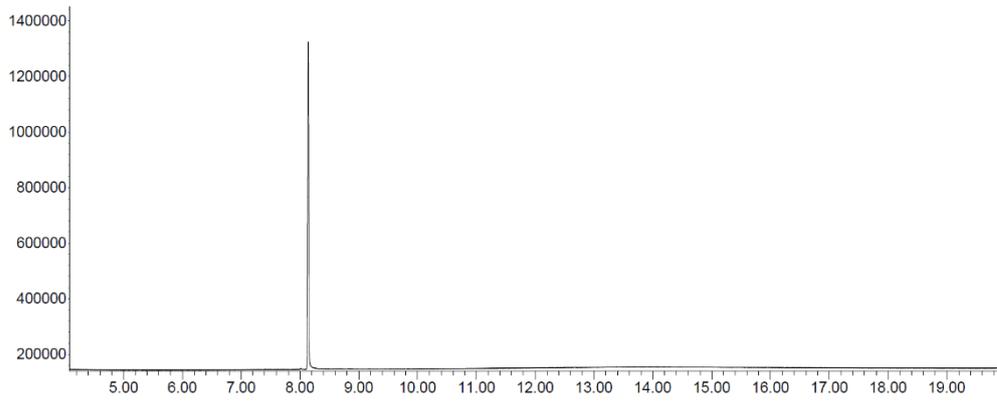
BcBOT2-F138V + FPP (12)



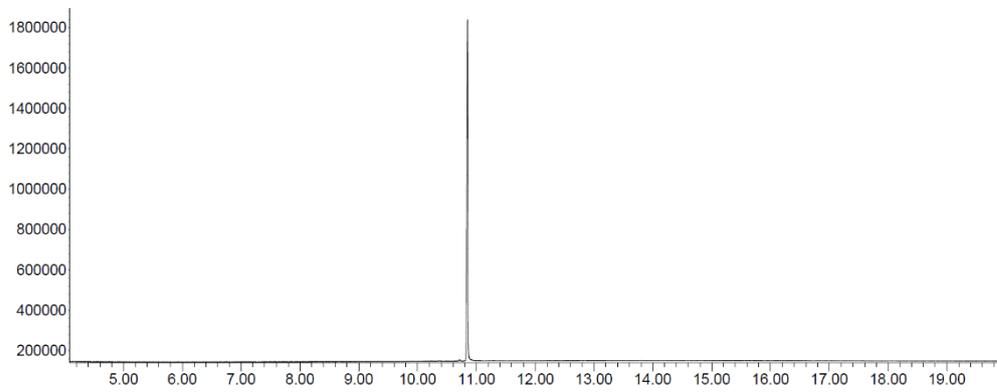
BcBOT2-W118Q + FPP (12)



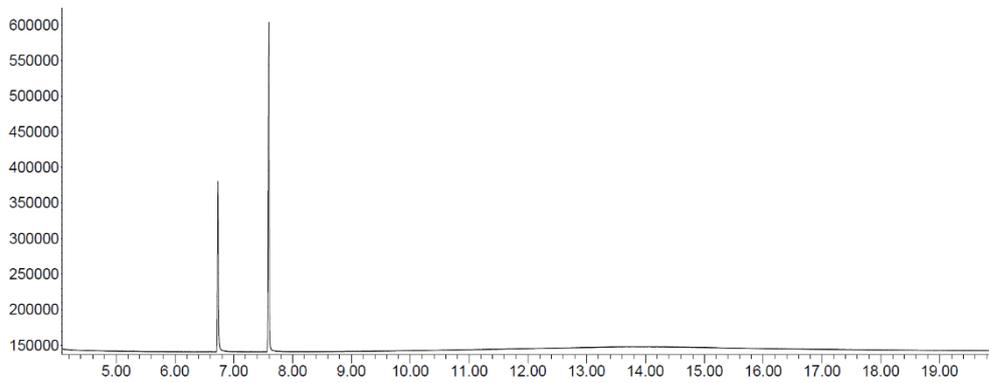
Biotransformation von Lipase CrL mit Geraniol (141) zu Geranylacetat (219)



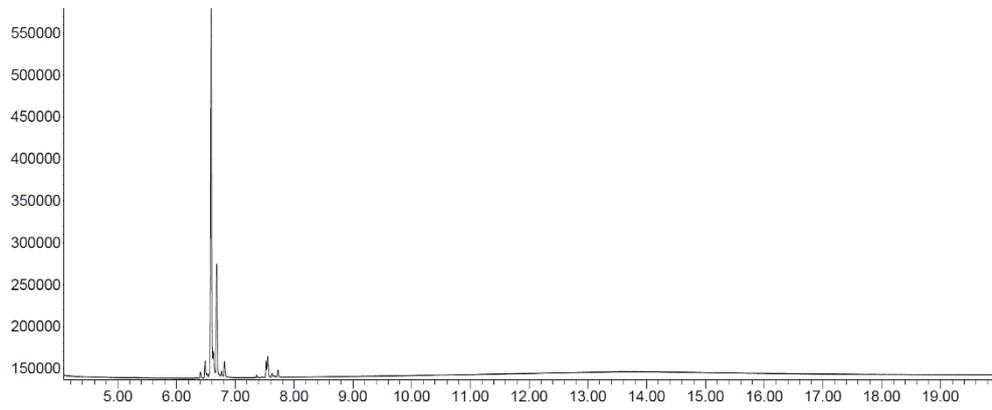
Biotransformation von Lipase CrL mit (E,E)-Farnesol (96) zu (E,E)-Farnesylacetat (220)



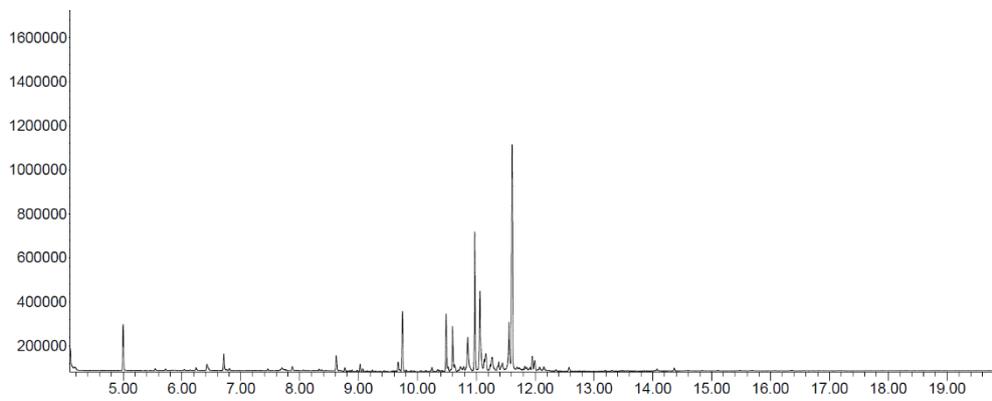
Biotransformation von Lipase CrL mit L-Menthol (1) zu L-Menthylacetat (221)



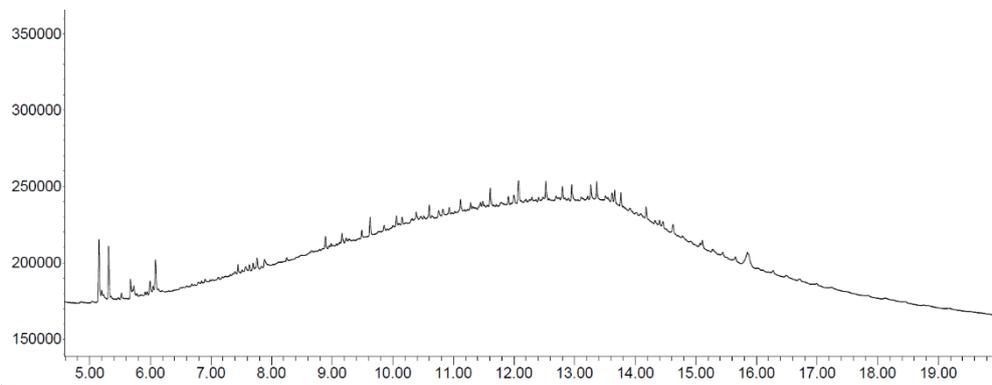
Biotransformation von Lipase CrL mit Cyclademol (209) zu Rosamusk (222)



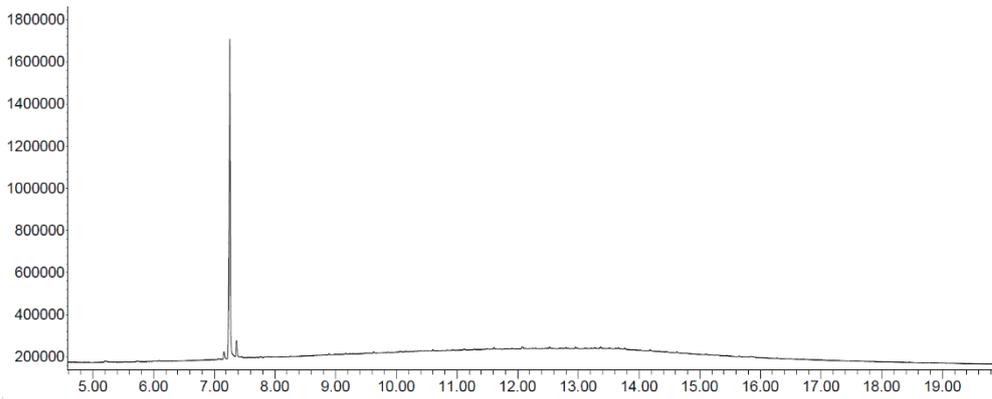
Cooxidation von (+)-Valencen (3)



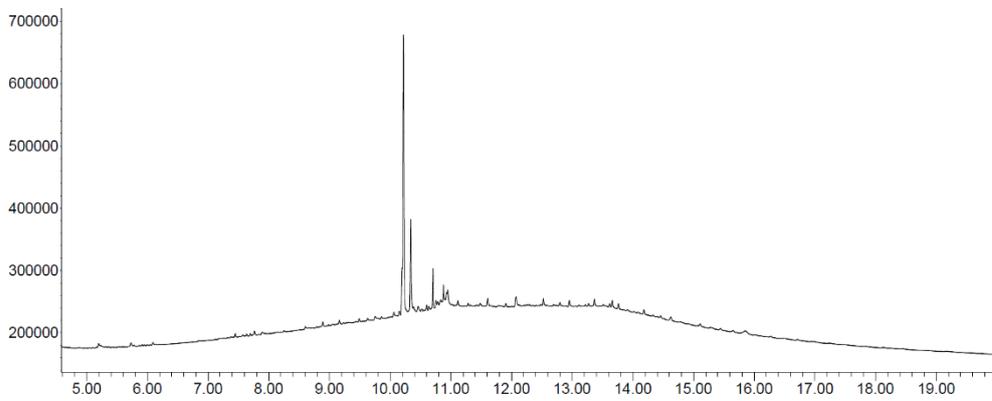
Cooxidation von Myrcen (137)



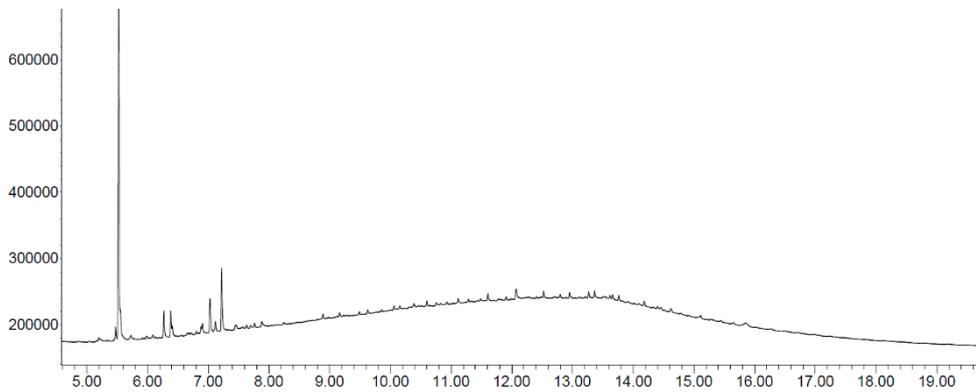
Cooxidation von Geraniol (141)



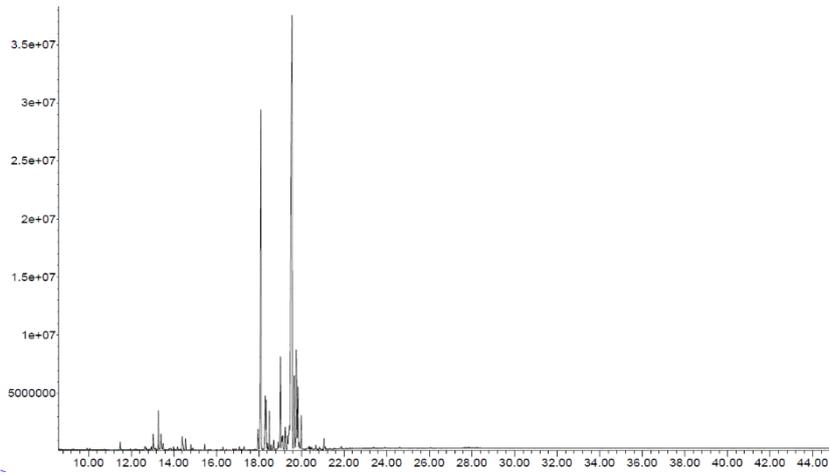
Cooxidation von (*E,E*)-Farnesol (96)



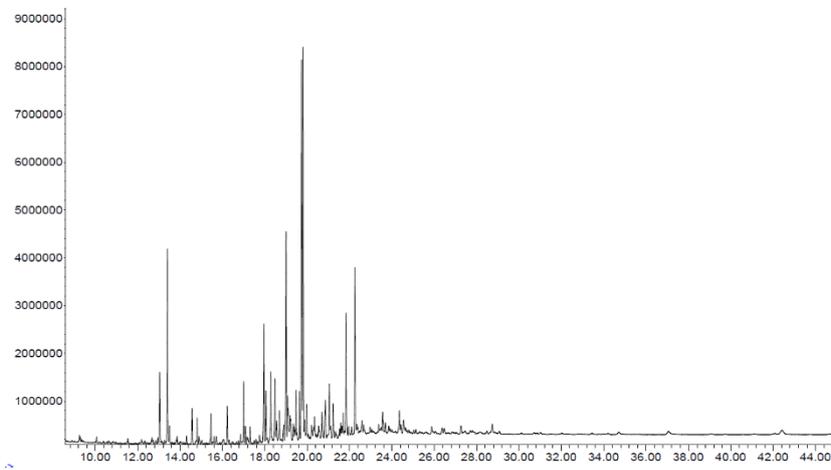
Cooxidation von Limonen (192)



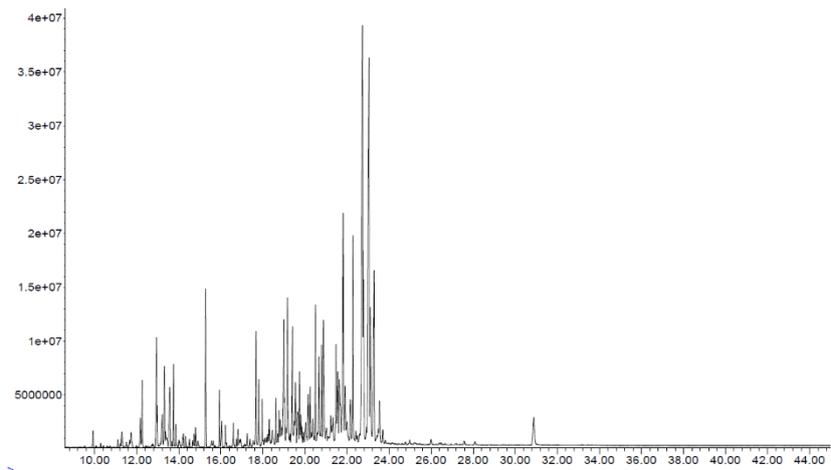
Guajakholzöl Ausgang



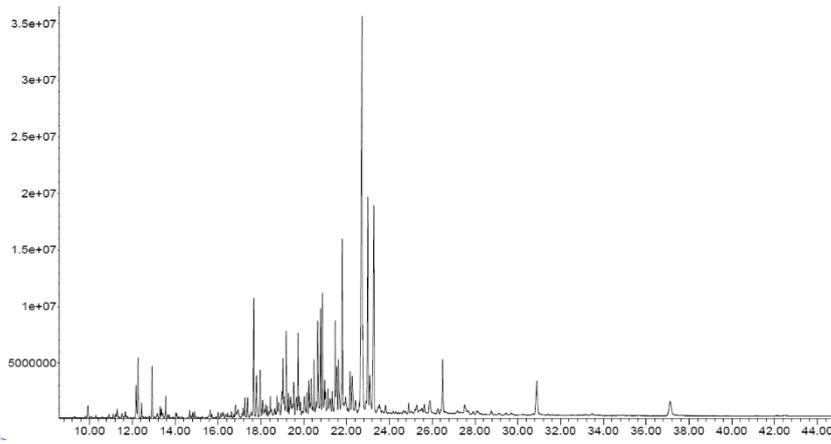
Cooxidation Guajakholzöl



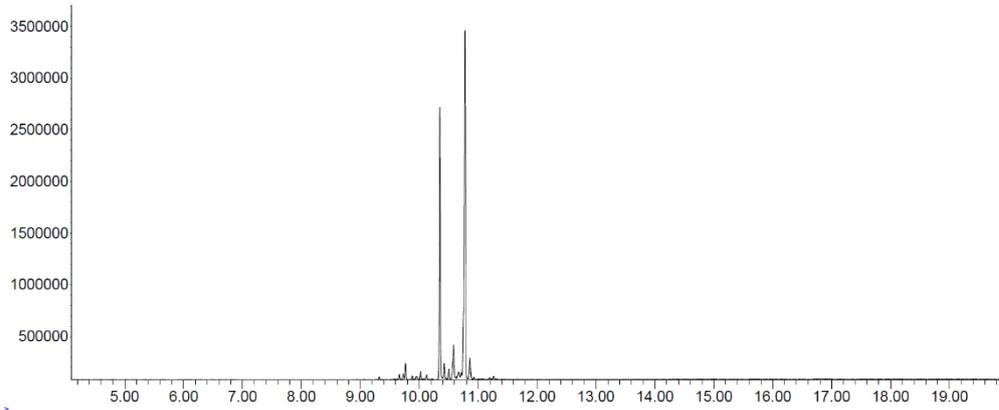
Ausgang Vetiver Öl Haiti



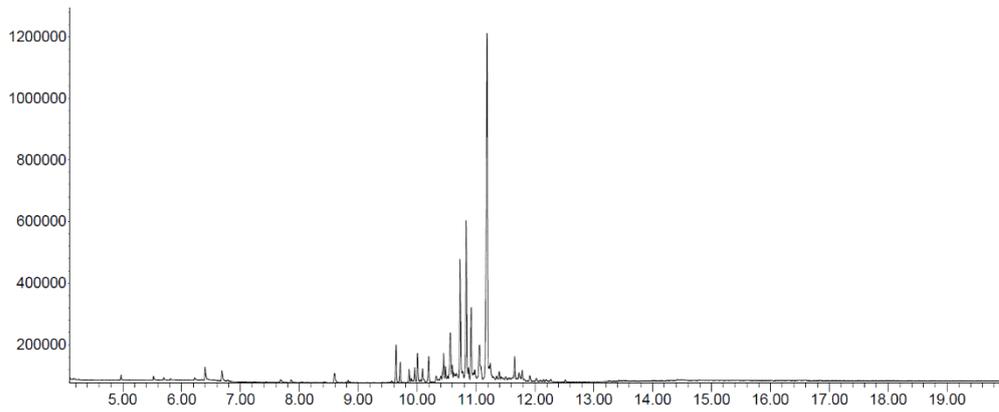
Cooxidation Vetiver Öl Haiti



Ausgang Fixateur Bois

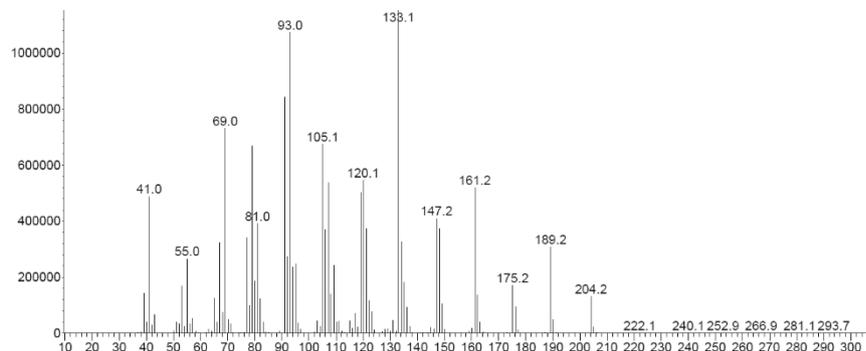


Cooxidation Fixateur Bois

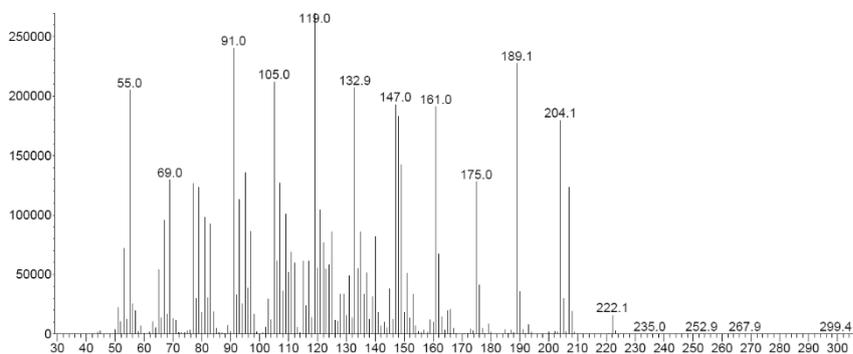


13.3 Massenspektren

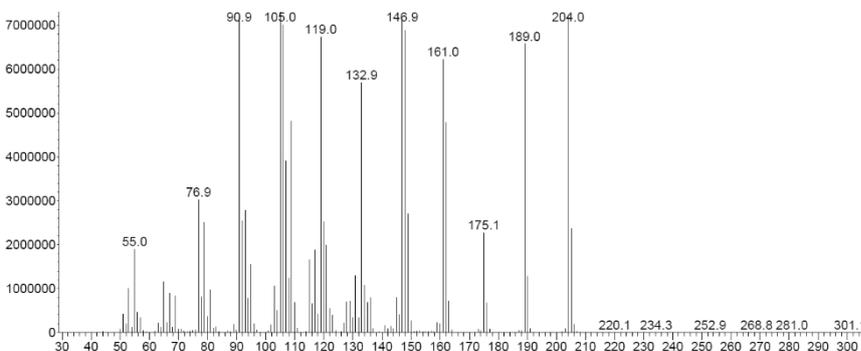
β -Caryophyllen (24)



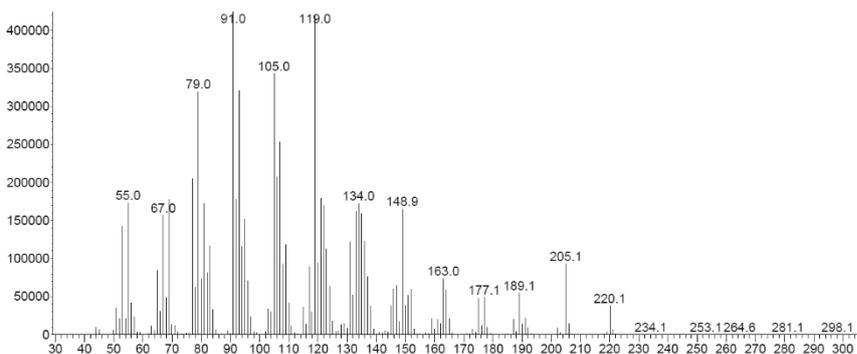
Presilphiperfolan-8 β -ol (29)



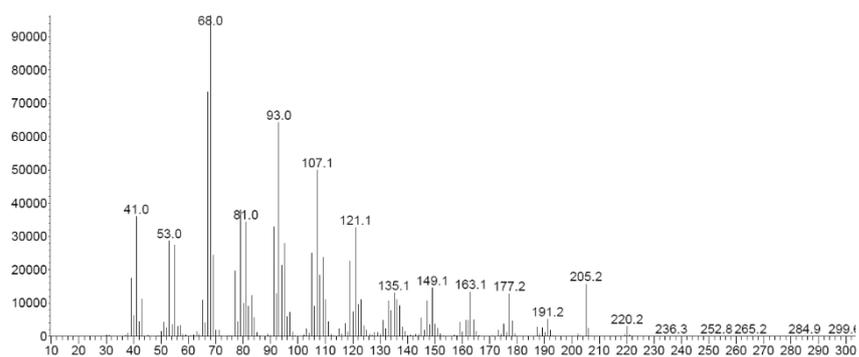
Pentalenen (37)



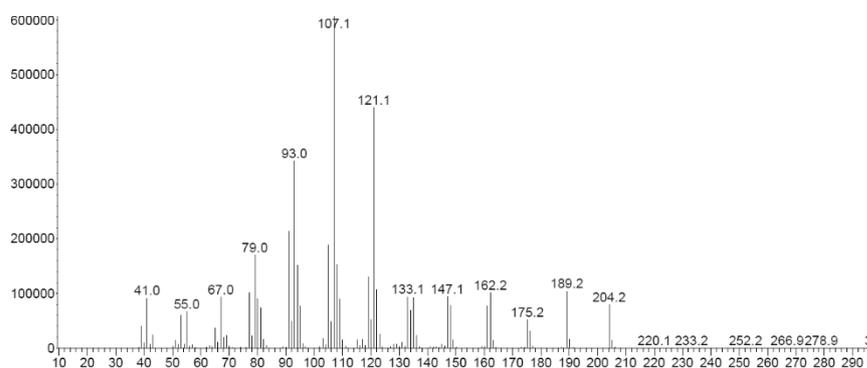
Biotransformationsprodukt 112



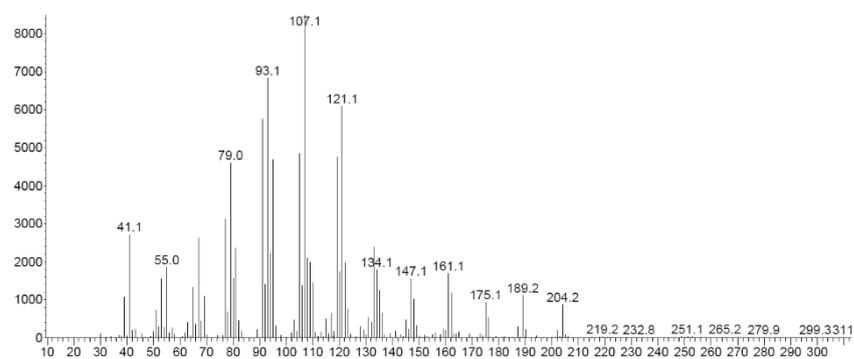
Biotransformationsprodukt 113



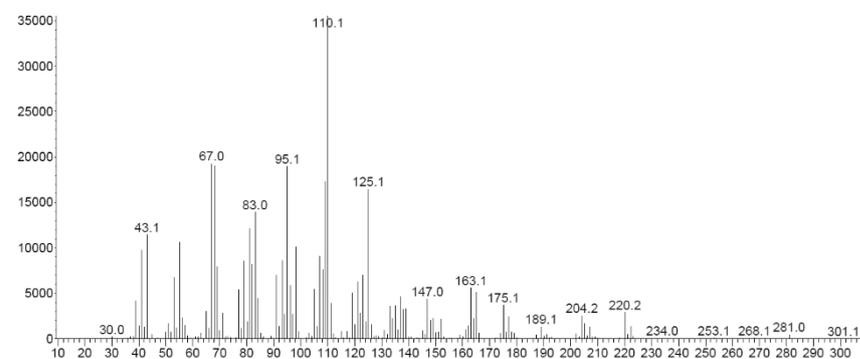
Biotransformationsprodukt 114



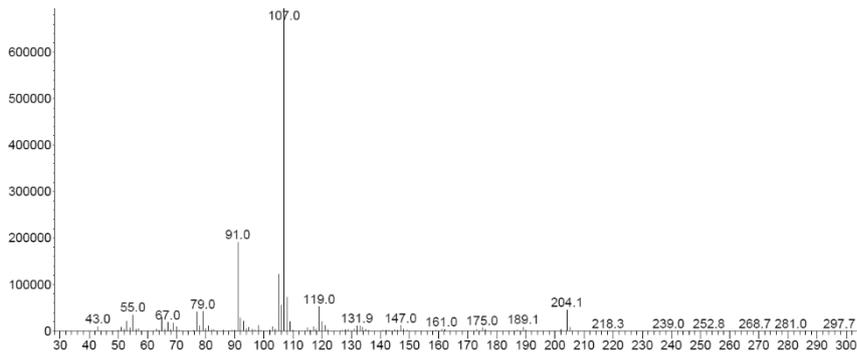
Biotransformationsprodukt 115



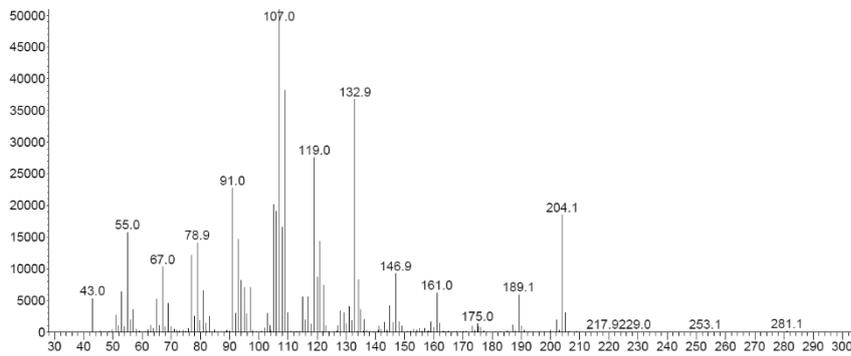
Biotransformationsprodukt 116



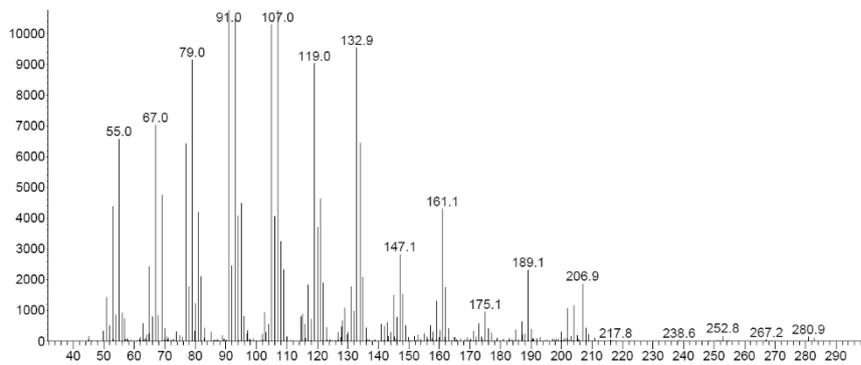
Biotransformationsprodukt 117



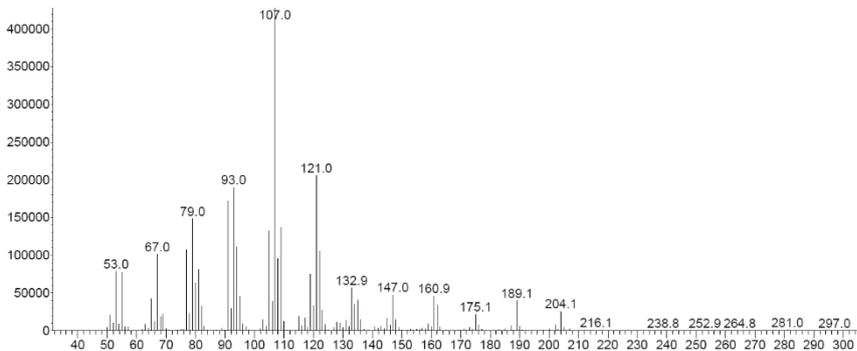
Biotransformationsprodukt 118



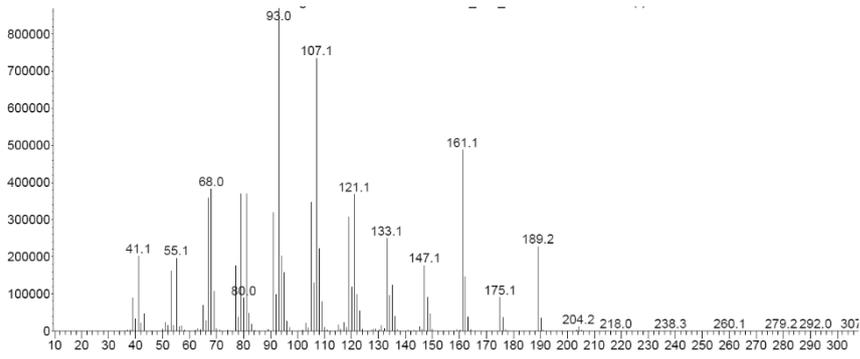
Biotransformationsprodukt 119



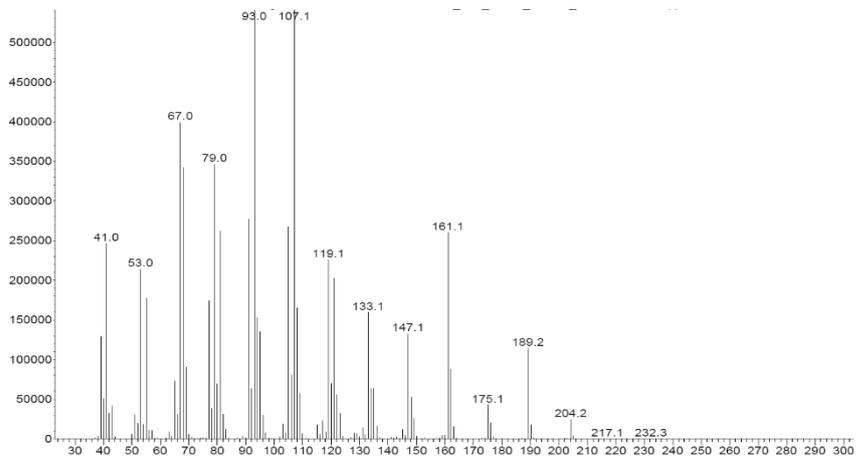
Biotransformationsprodukt 120



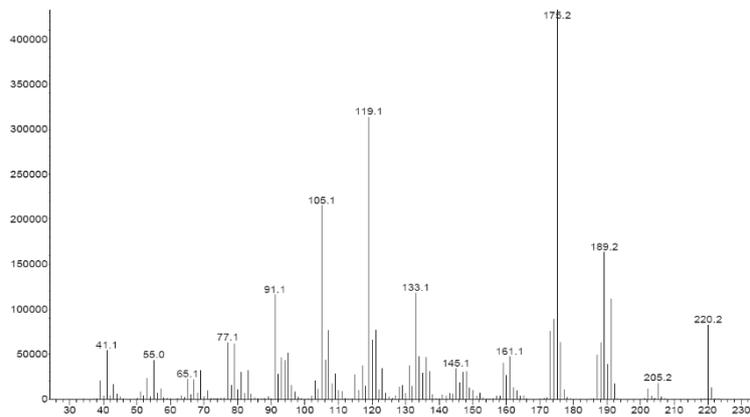
Biotransformationsprodukt 122



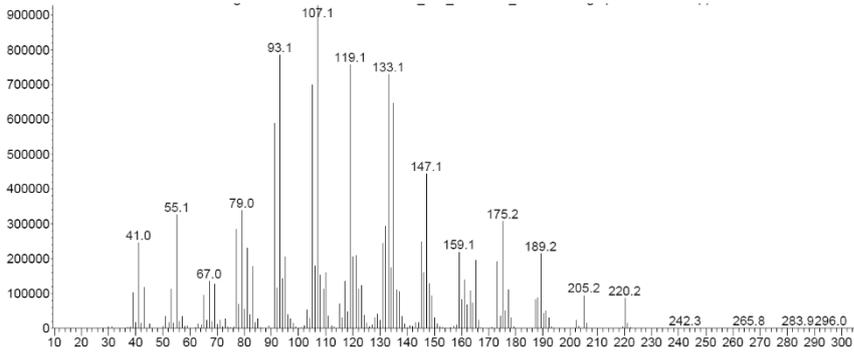
Biotransformationsprodukt 123



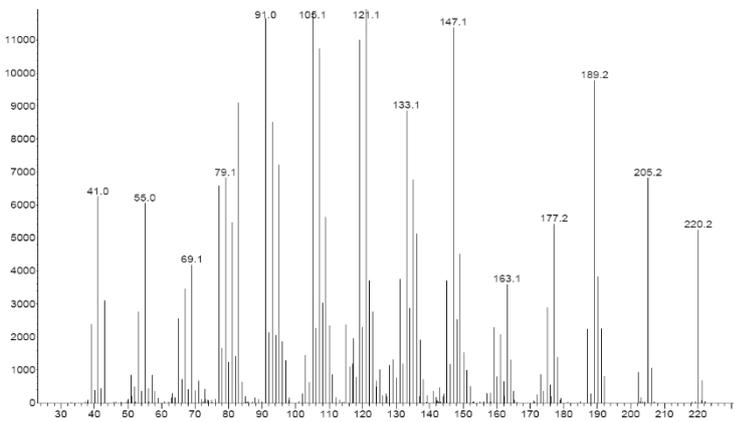
Biotransformationsprodukt 124a



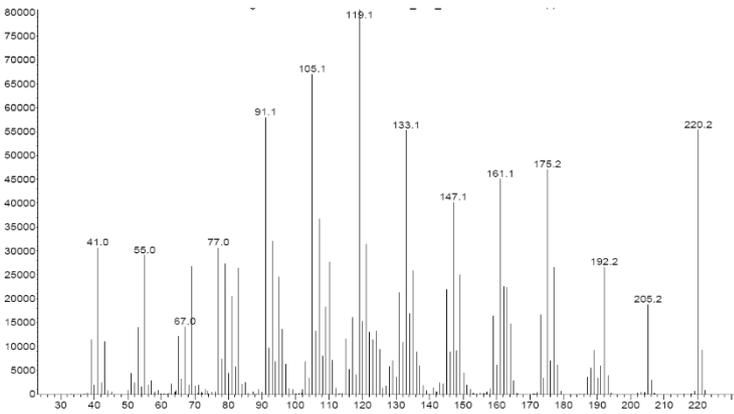
Biotransformationsprodukt 125



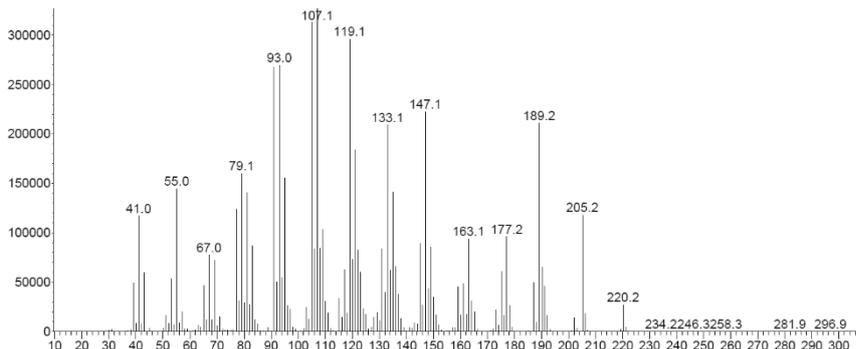
Biotransformationsprodukt 126a



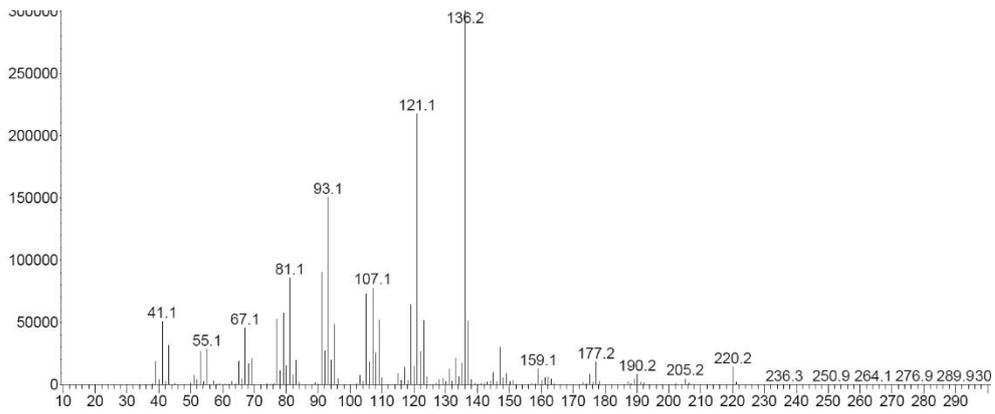
Biotransformationsprodukt 126b



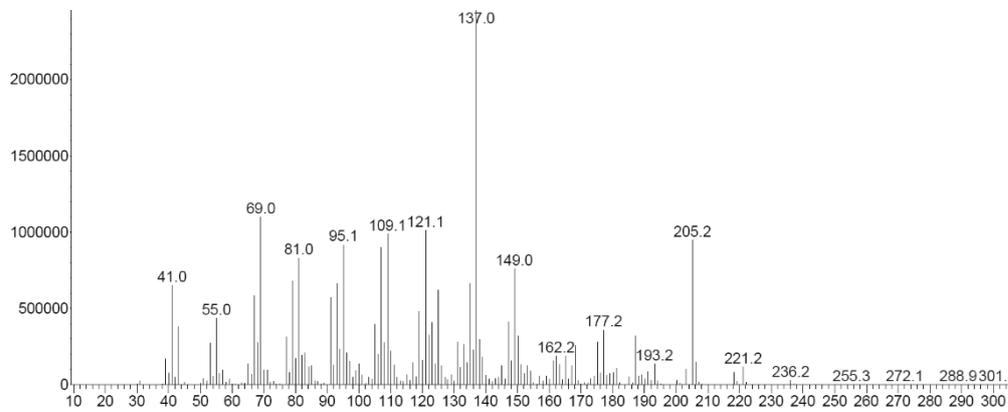
Biotransformationsprodukt 127



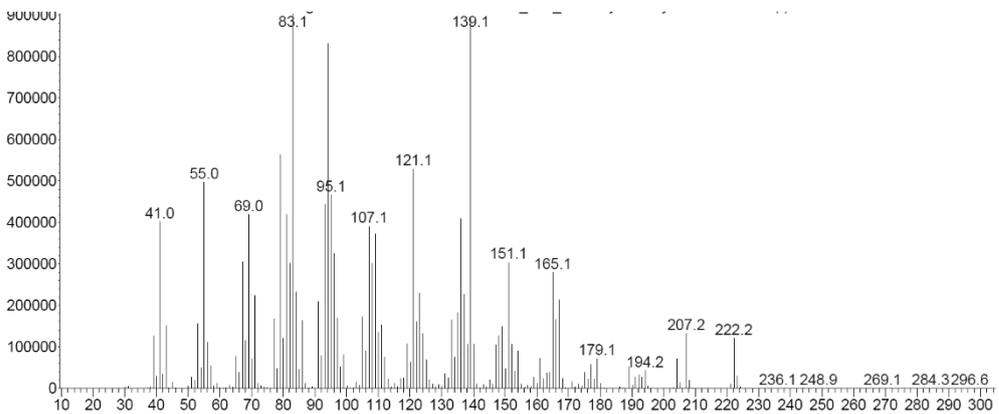
Biotransformationsprodukt 128

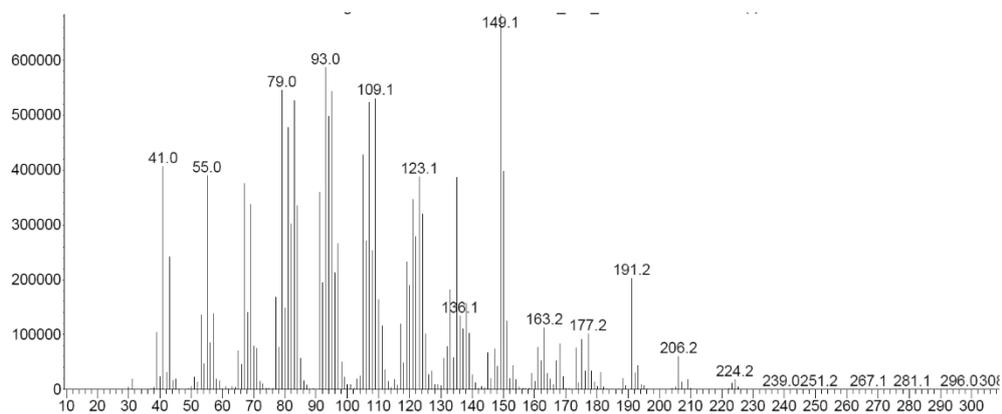
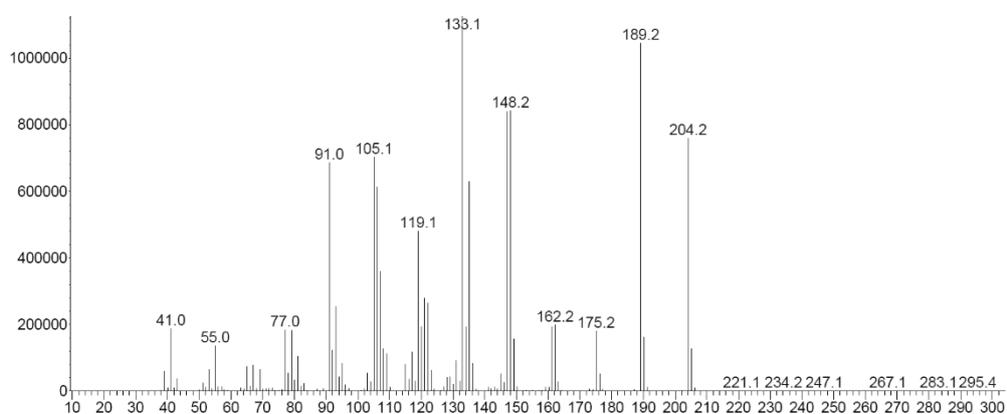
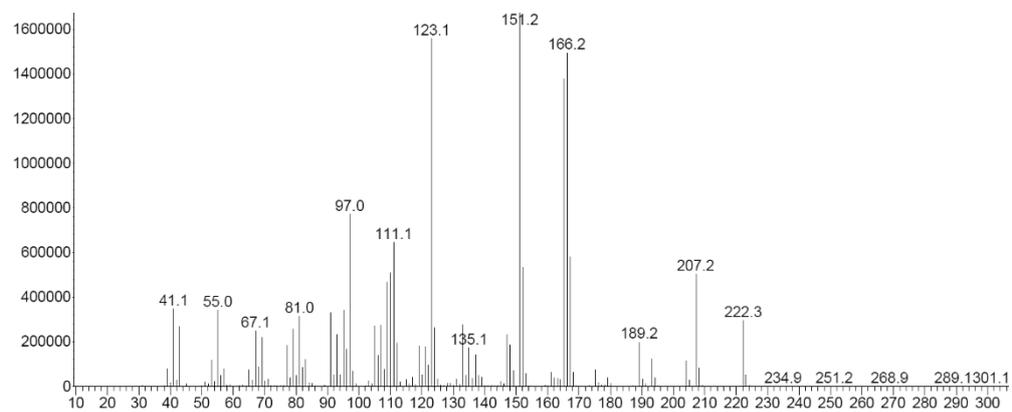


RILEY-Oxidationsprodukt 165

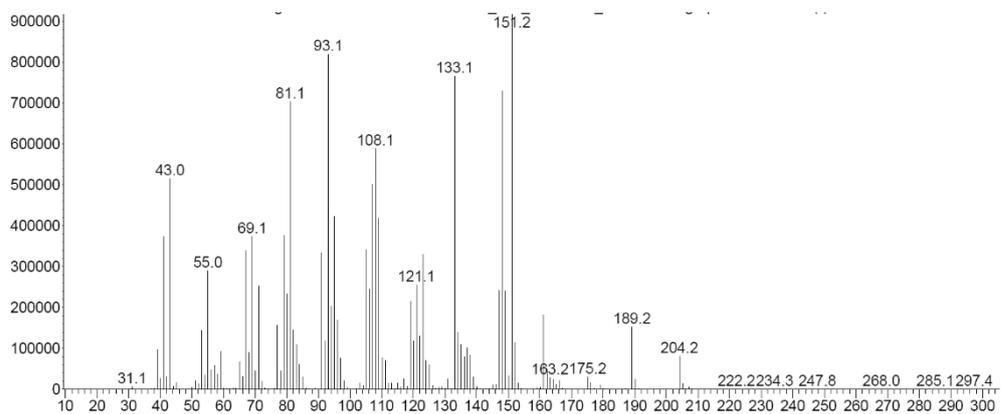


Ozonolyseprodukt 166

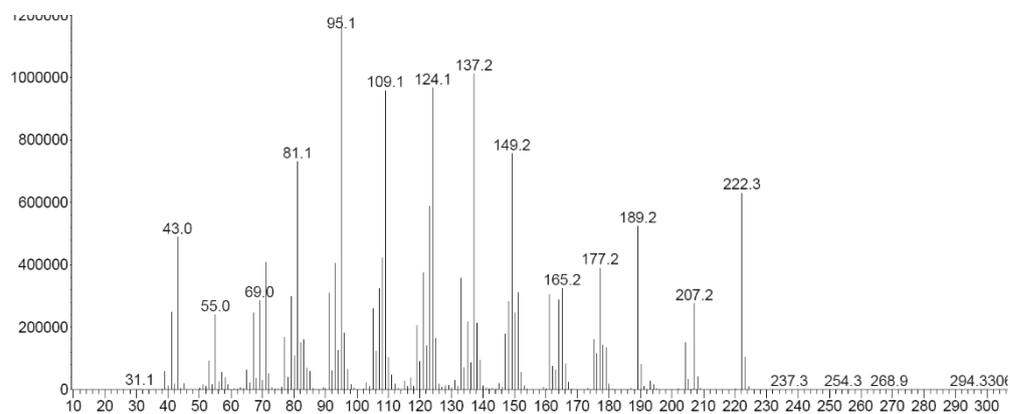


Reduktionsprodukt 167**Presilhiperfol-1-en (170)****Presilhiperfolan-1 α -ol (176)**

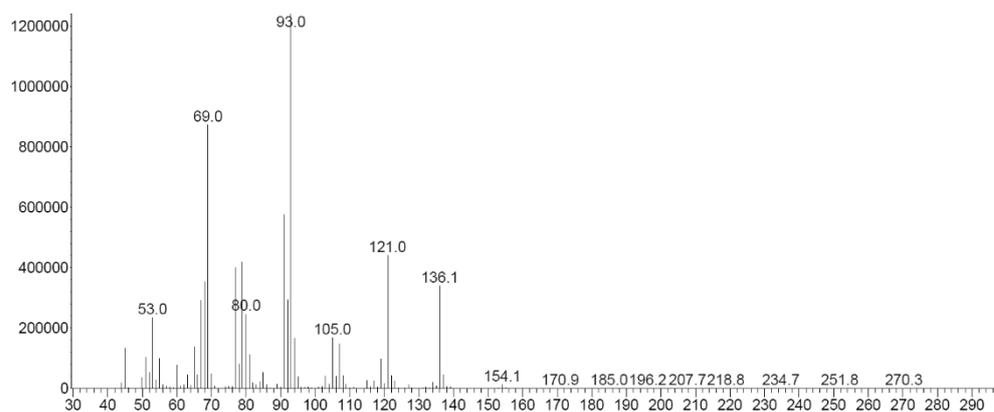
Caryophyllen-8 β -ol (177)

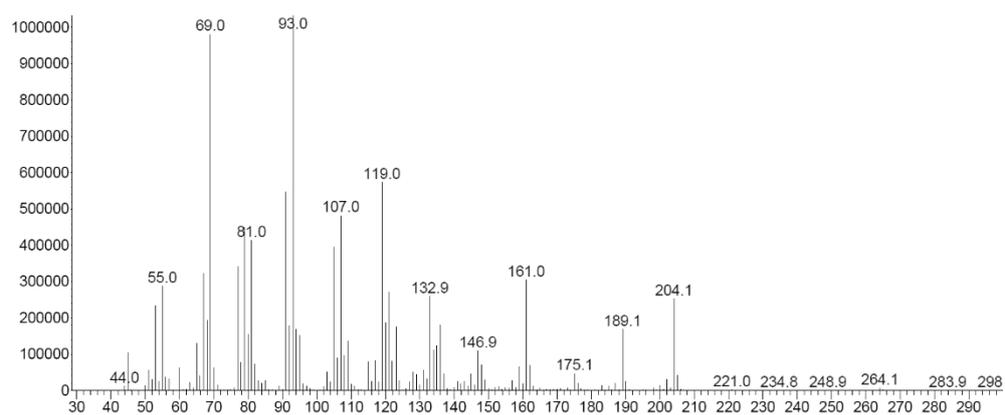
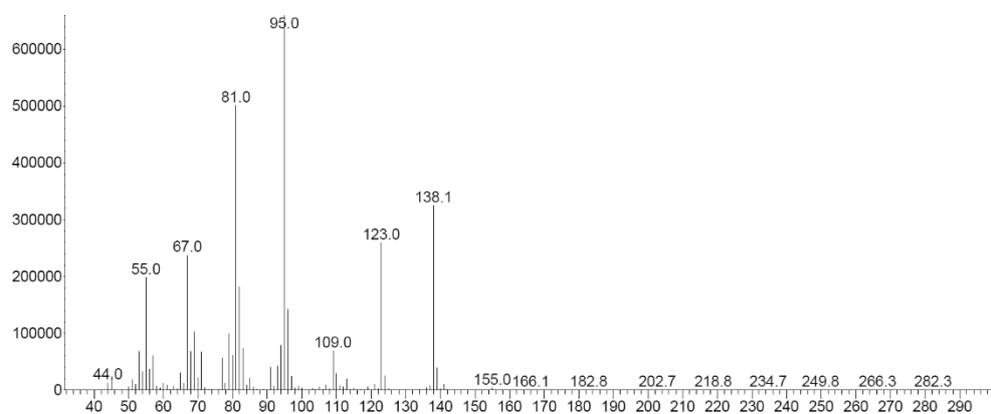
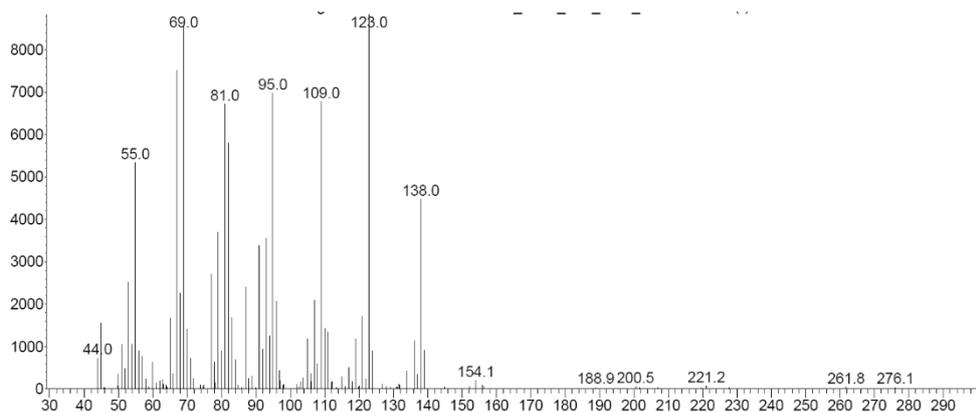


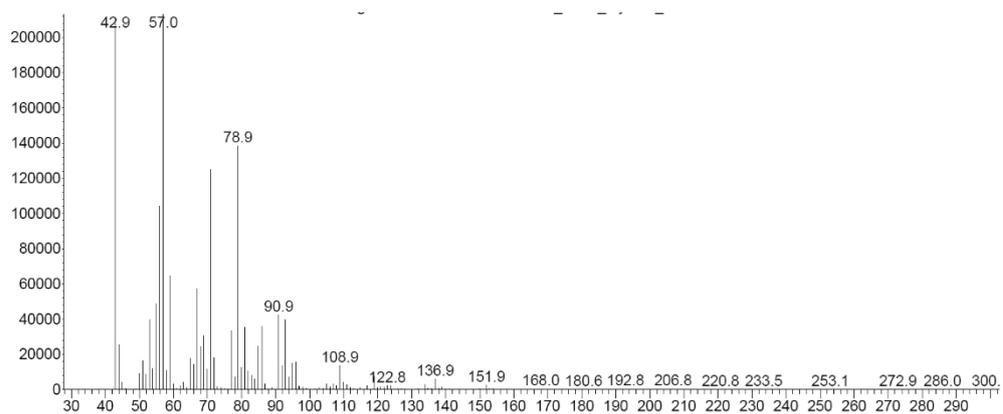
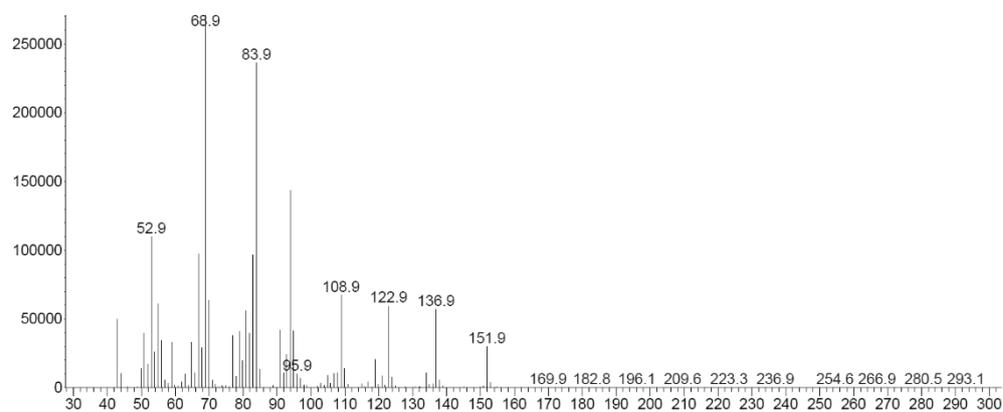
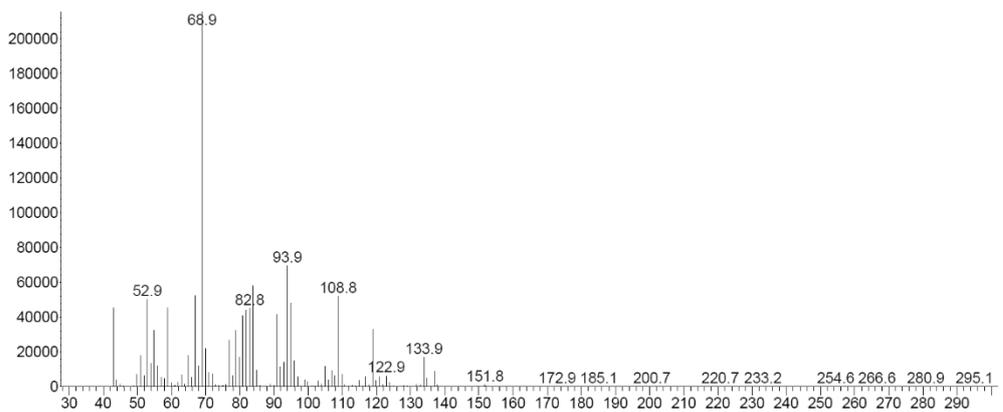
Presilphiperfolan-9 β -ol (178)

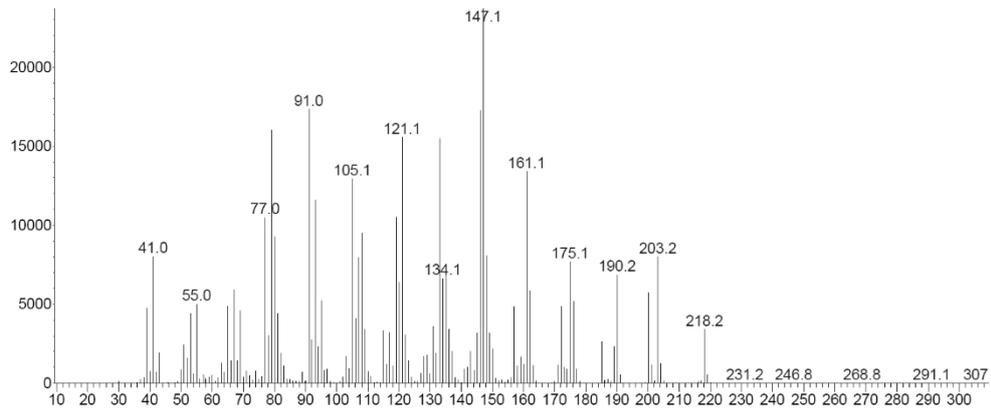
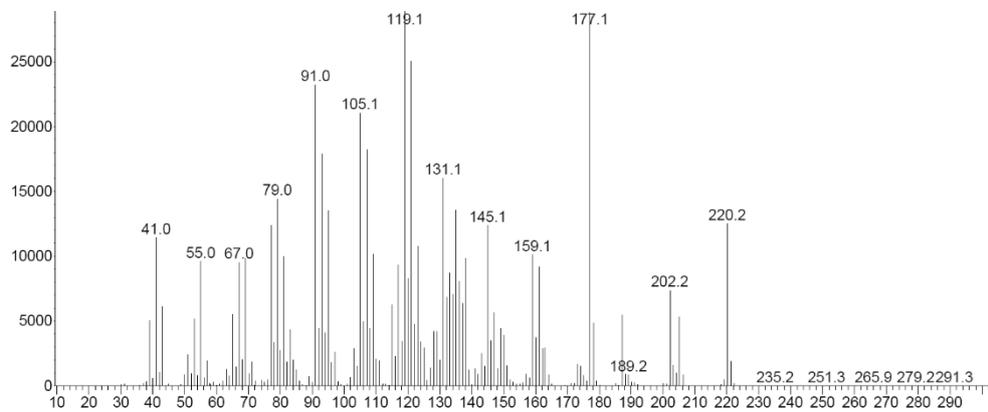
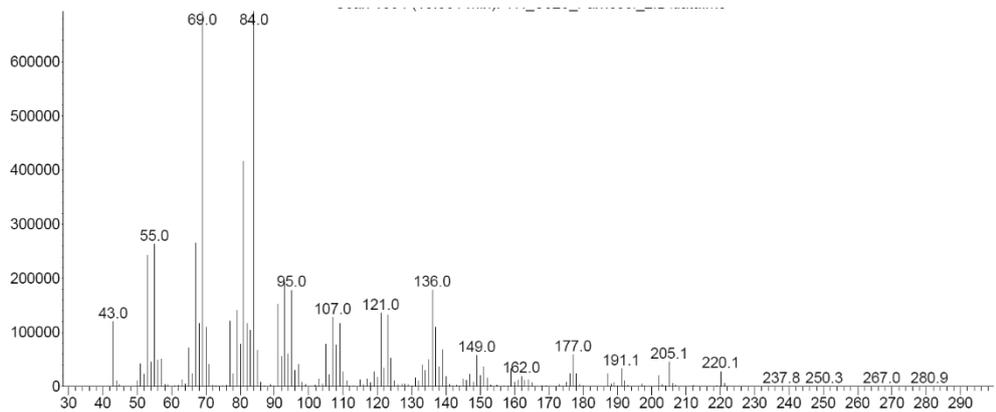


Geranylacetat (219)

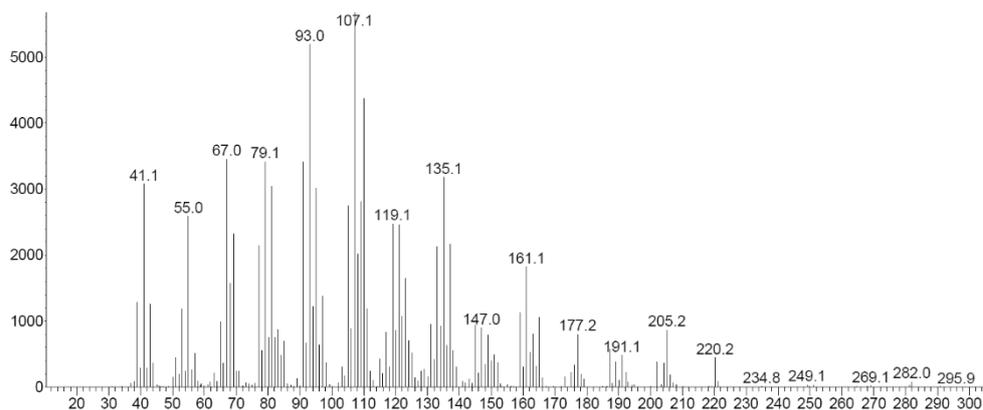


(E,E)-Farnesylacetat (220)**L-Menthylacetat (221)****Rosamusk (222)**

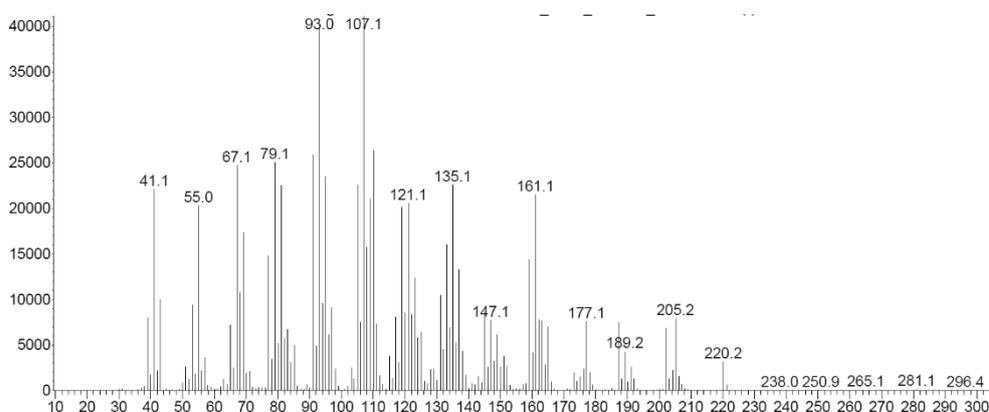
Cooxidationsprodukt Myrcenepoxid (137)**Cooxidationsprodukt Geranial (142)****Cooxidationsprodukt Neral (144)**

Cooxidationsprodukt Nootkaton (194)**Cooxidationsprodukt *exo*-Nootkatol (195)****(*E,E*)-Farnesal (214)**

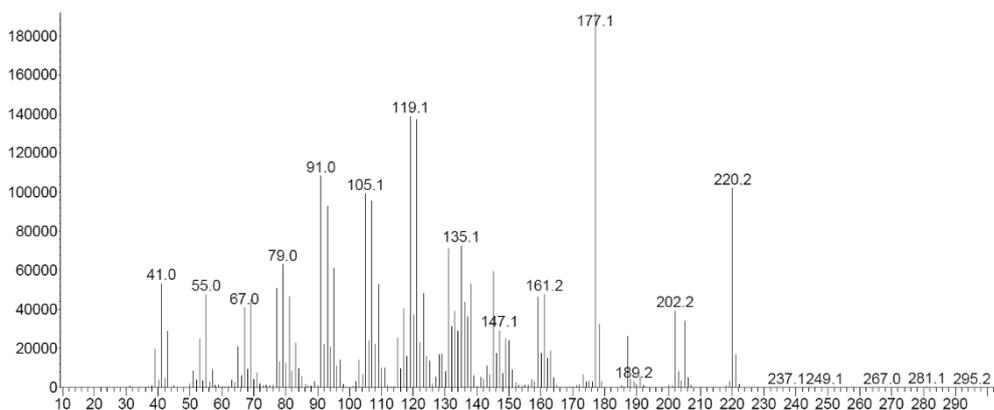
Cooxidationsprodukt (+)-*cis*-Valencenepoxid (224)

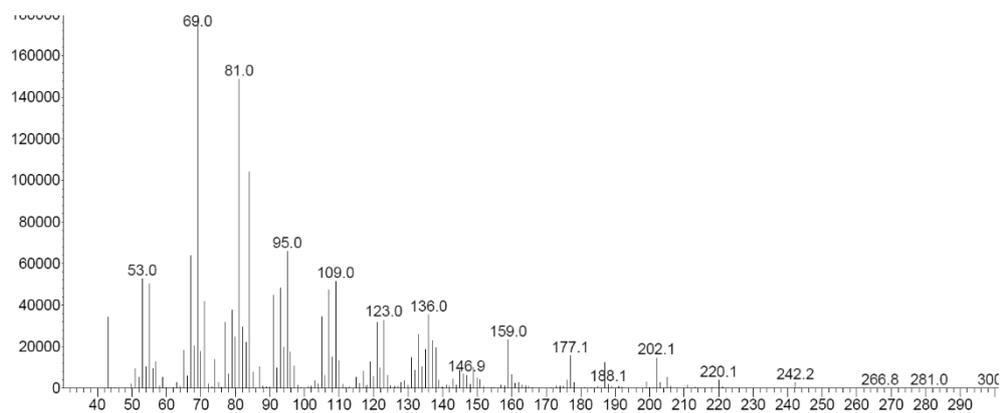
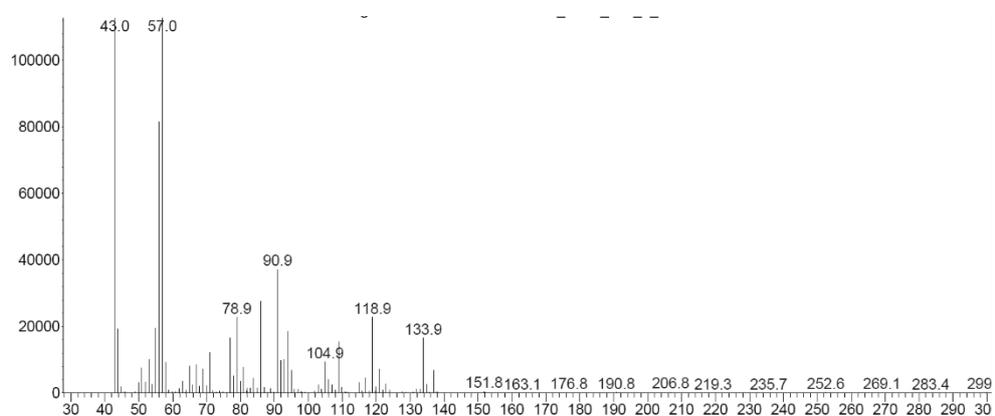
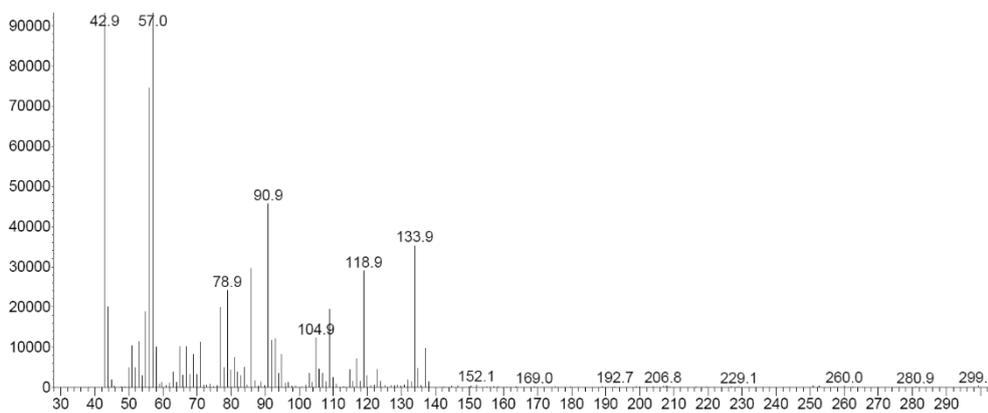


Cooxidationsprodukt (-)-*cis*-Valencenepoxid (225)

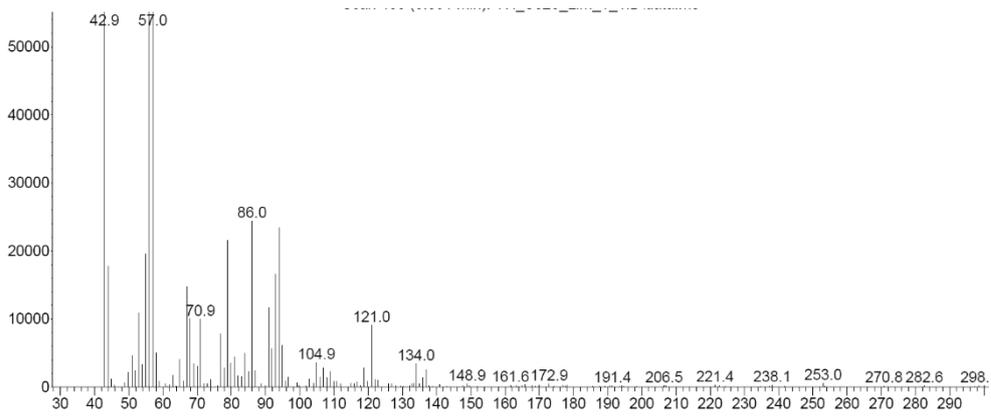


Cooxidationsprodukt *endo*-Nootkaton (227)

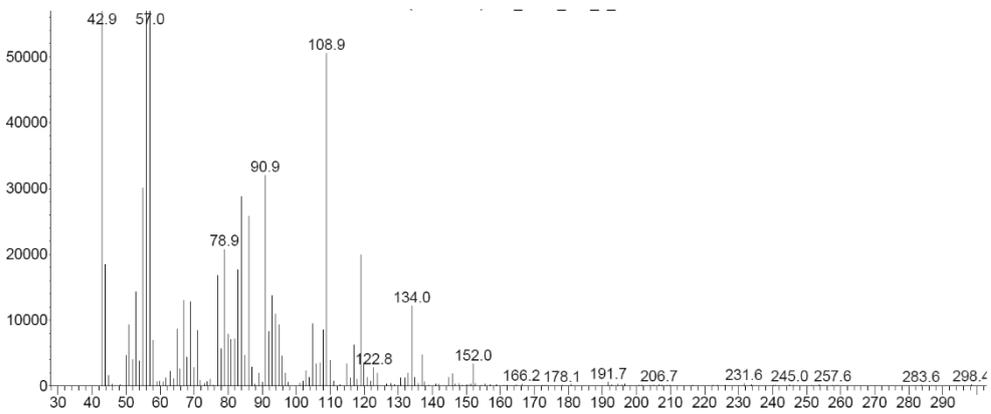


Cooxidationsprodukt (*E,Z*)-Farnesal (246)**Cooxidationsprodukt *p*-Menthatrien (247)****Cooxidationsprodukt 1,2-Limonenepoxid (248)**

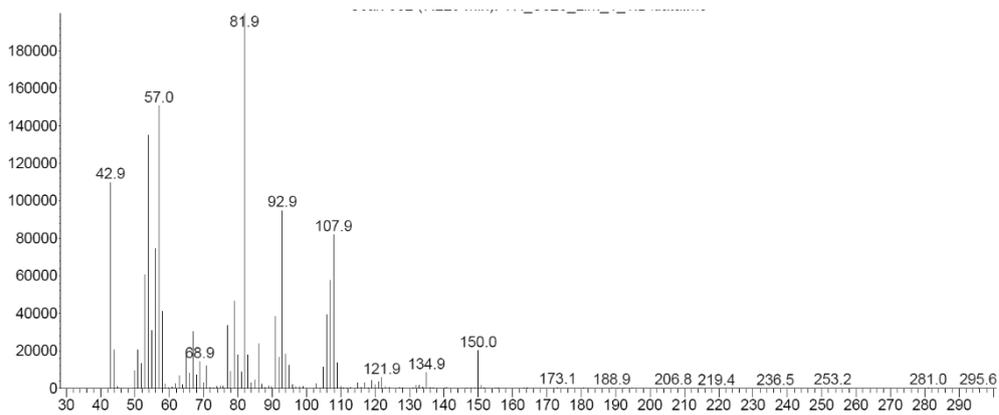
Cooxidationsprodukt 8,9-Limonenepoxid (249)

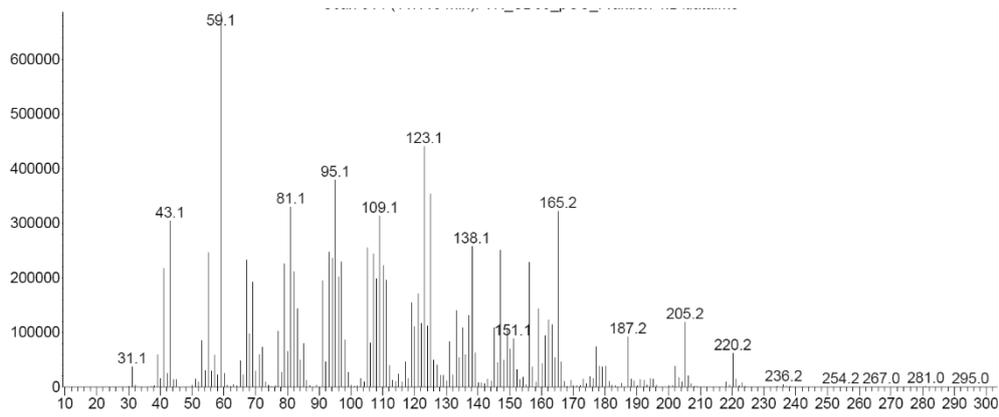
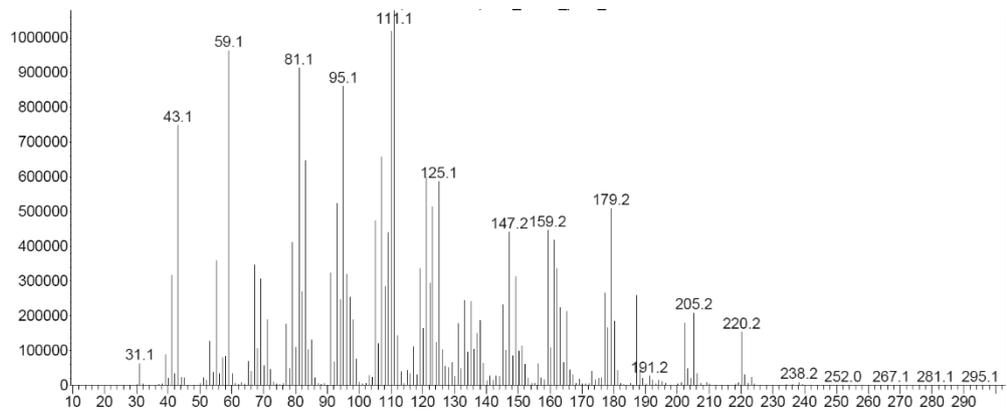


Cooxidationsprodukt Carveol (250)



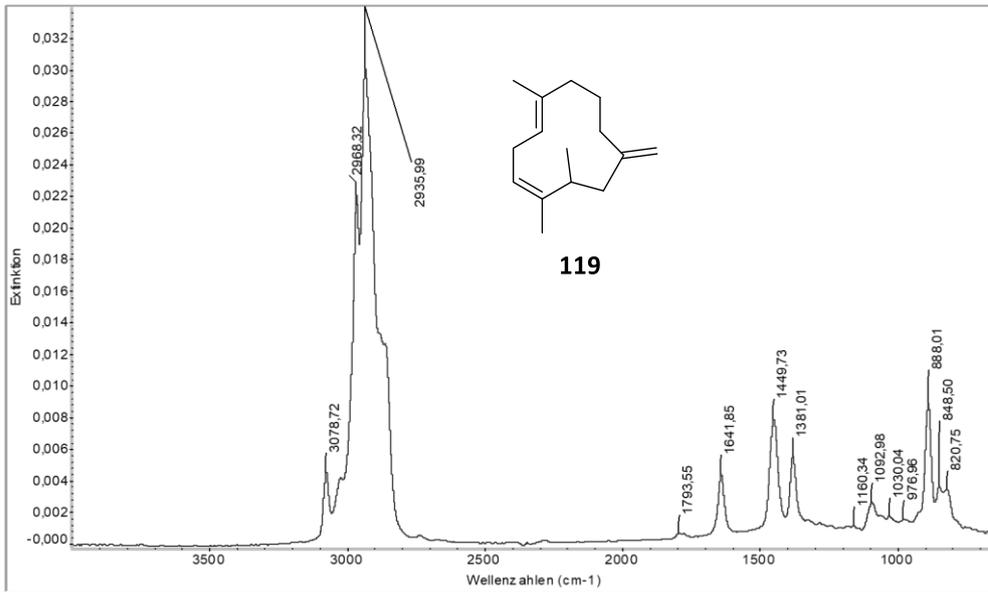
Cooxidationsprodukt Carvon (251)



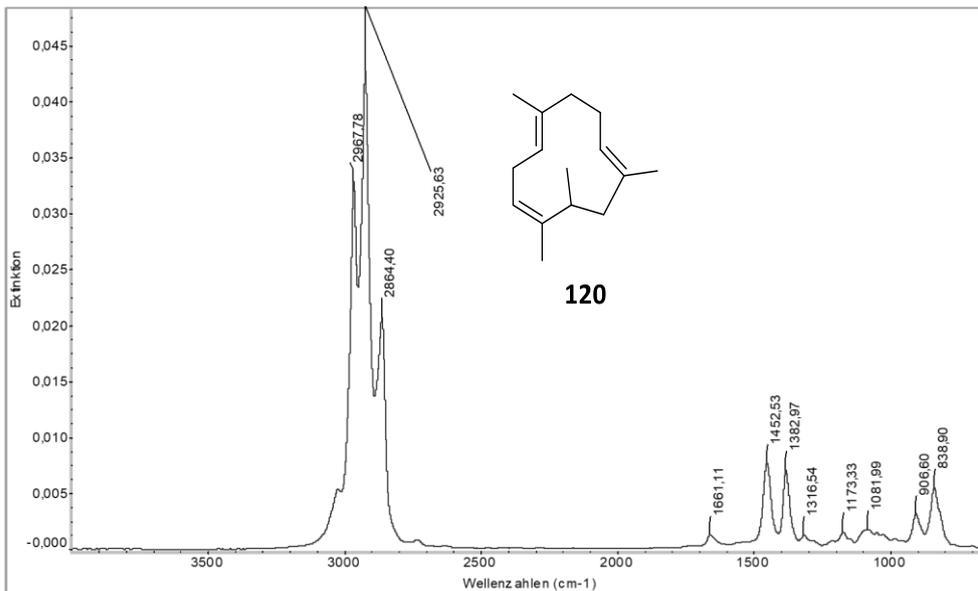
Cooxidationsprodukt 342**Cooxidationsprodukt 1,10-Epoxyguaian-11-ol (343)**

13.4 IR-Spektren

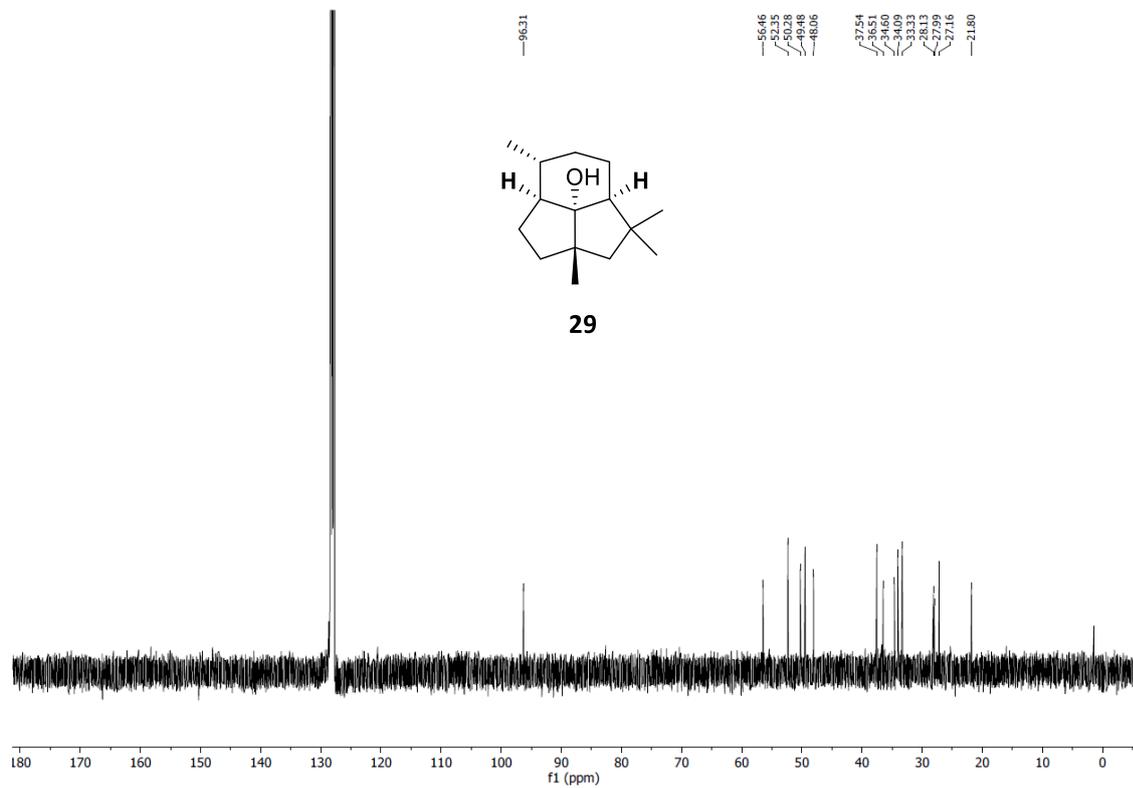
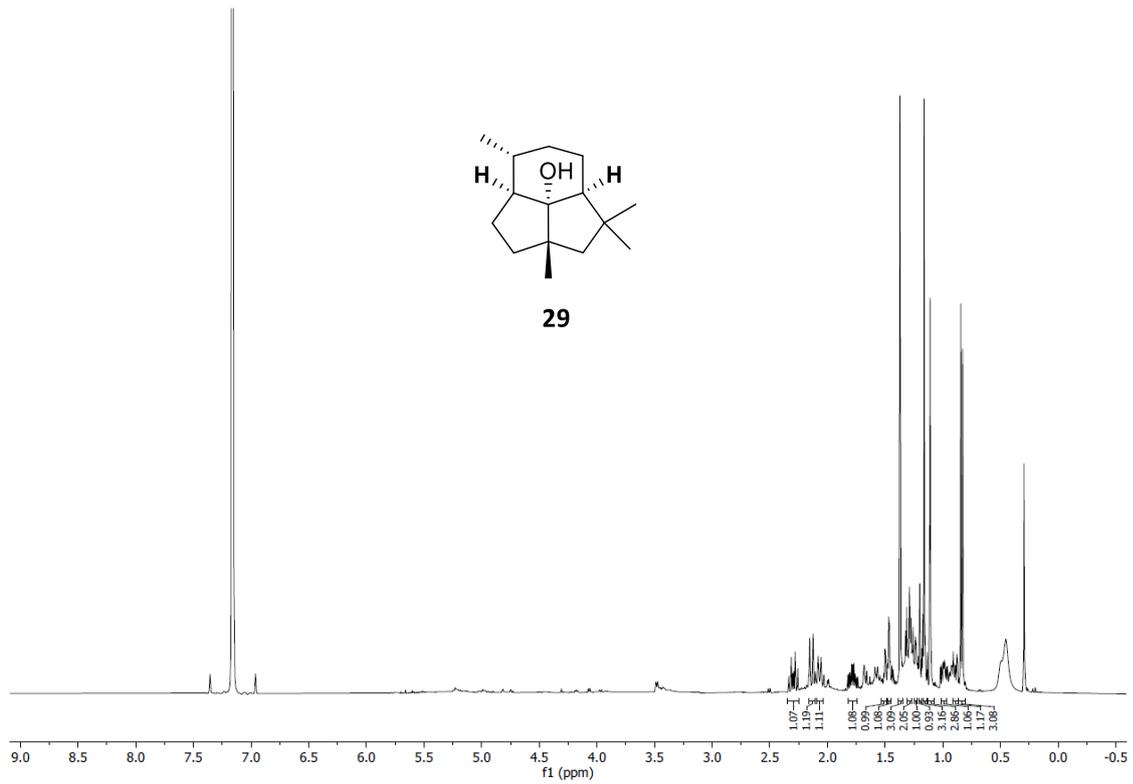
Biotransformationsprodukt 119



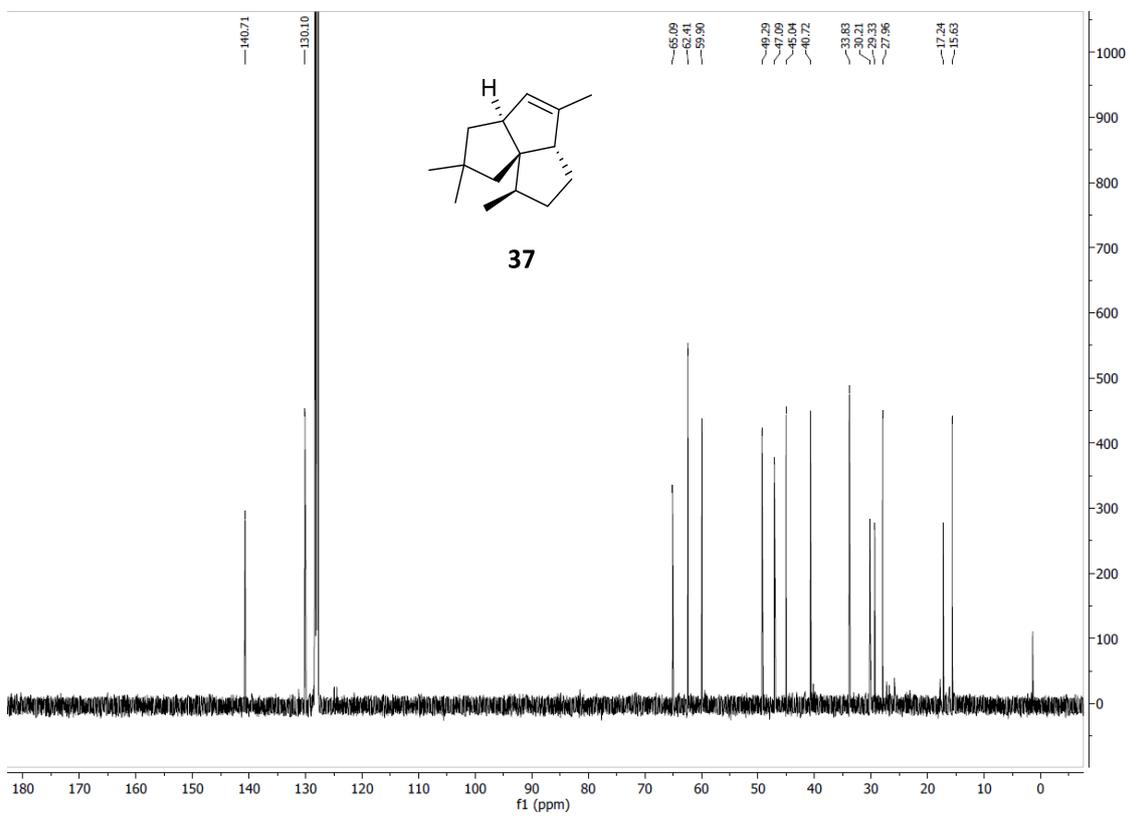
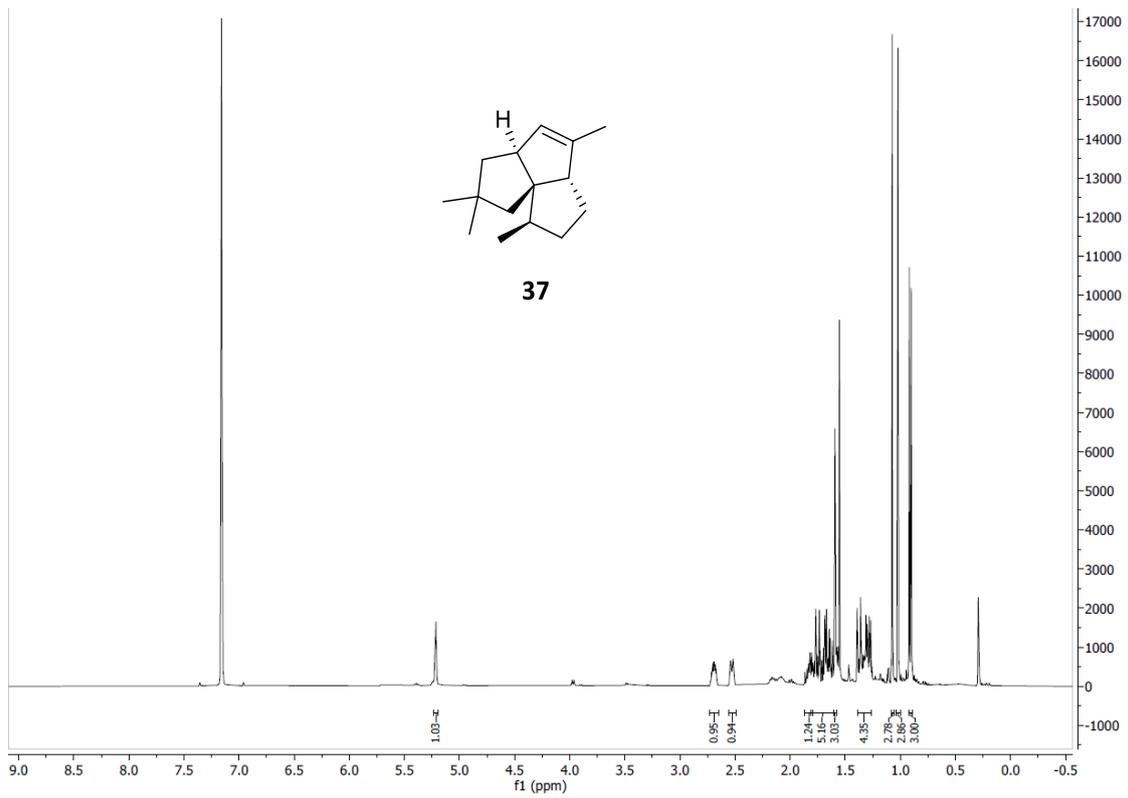
Biotransformationsprodukt 120



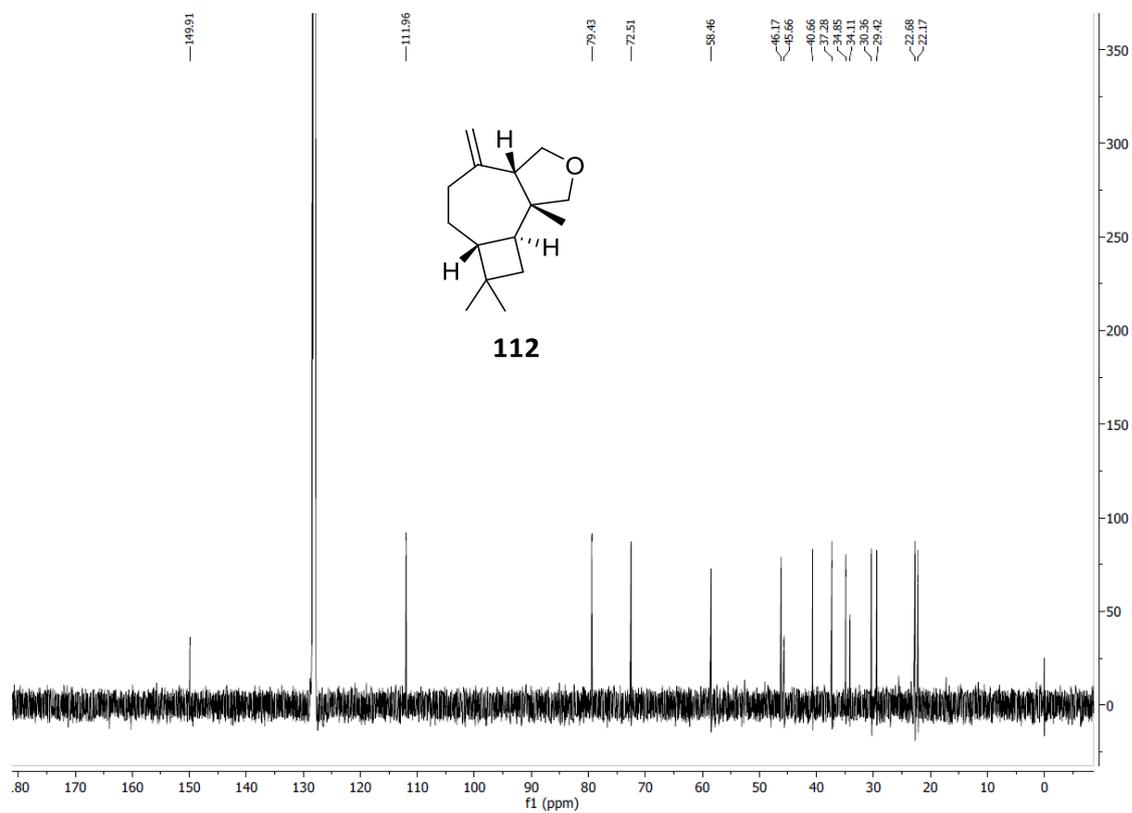
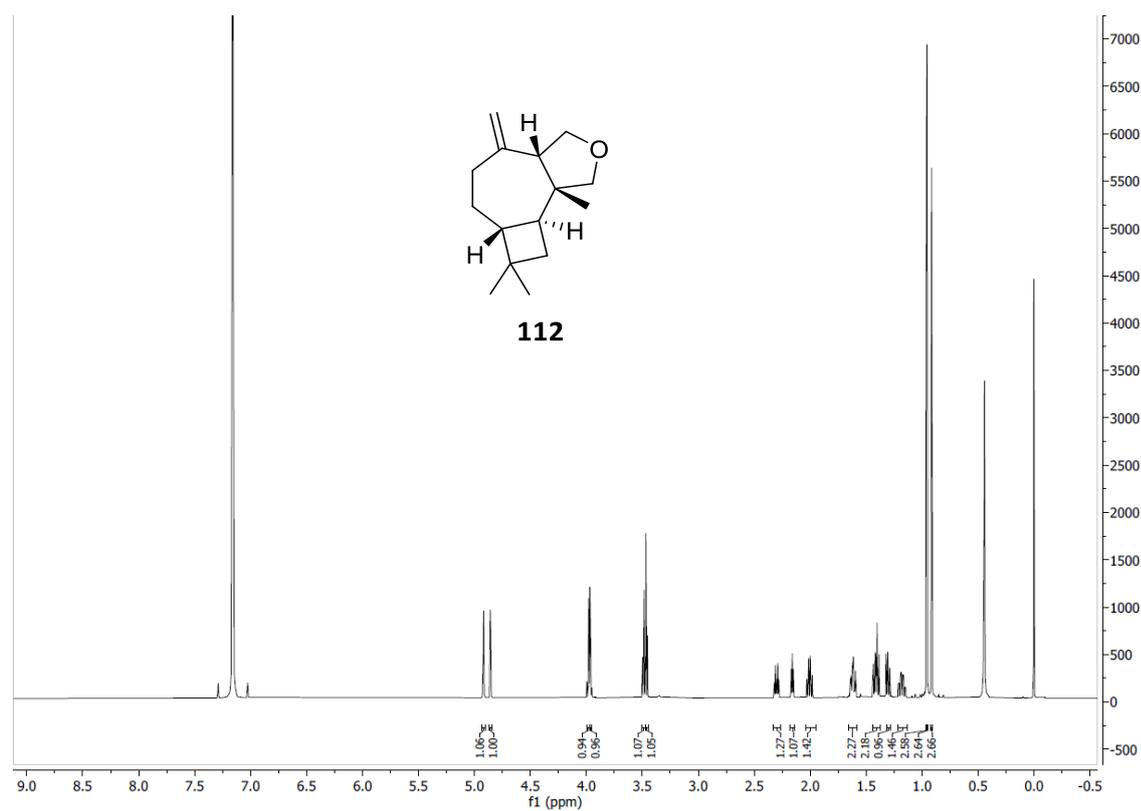
13.5 NMR-Spektren

Presilphiperfolan-8 β -ol (29)

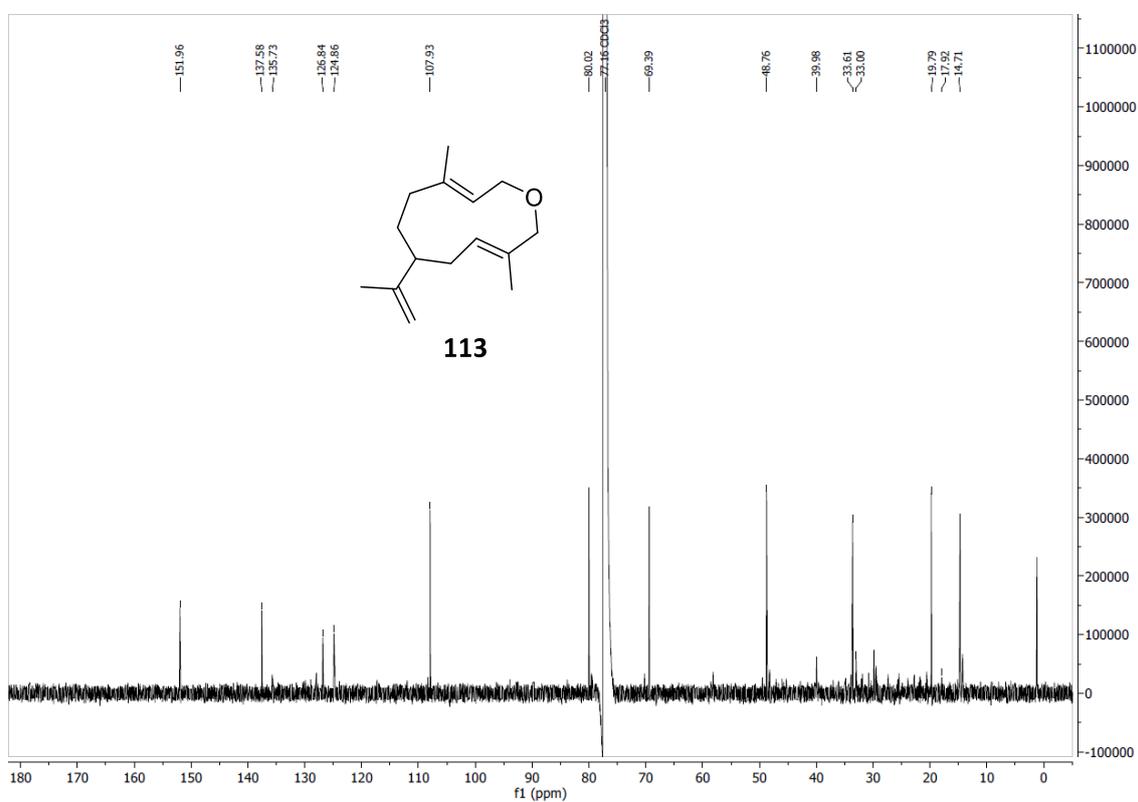
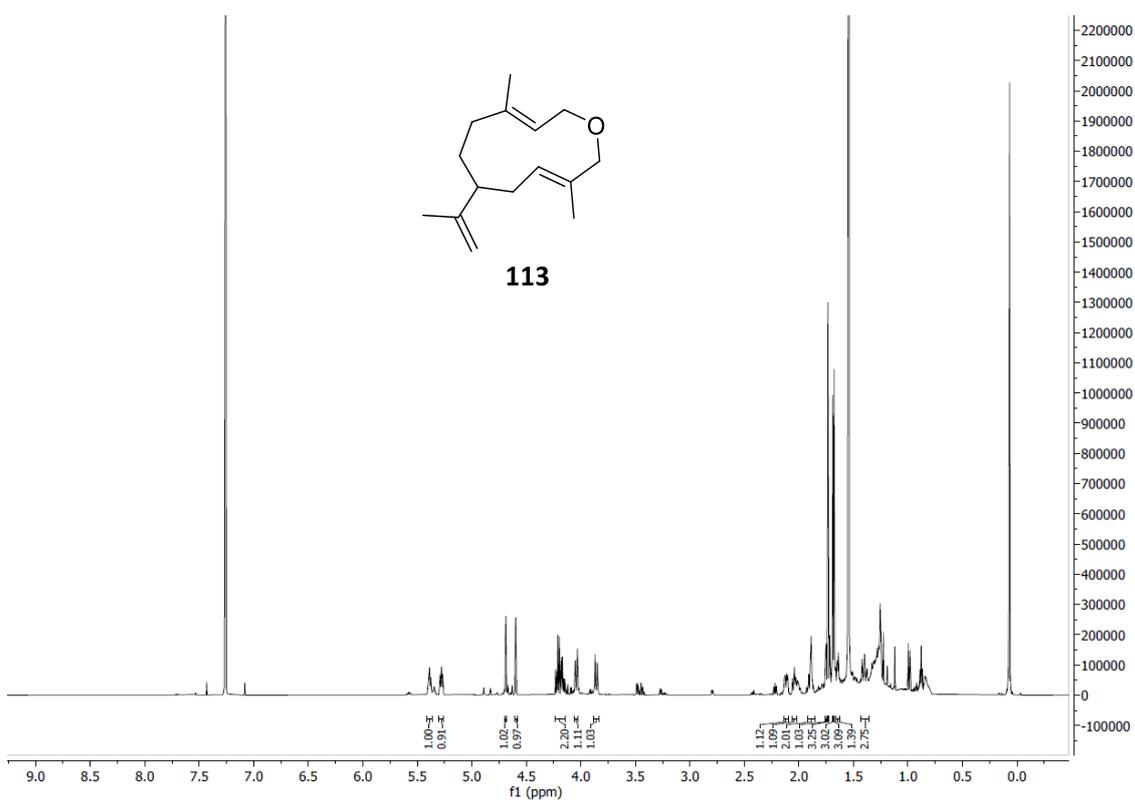
Pentalenen (37)



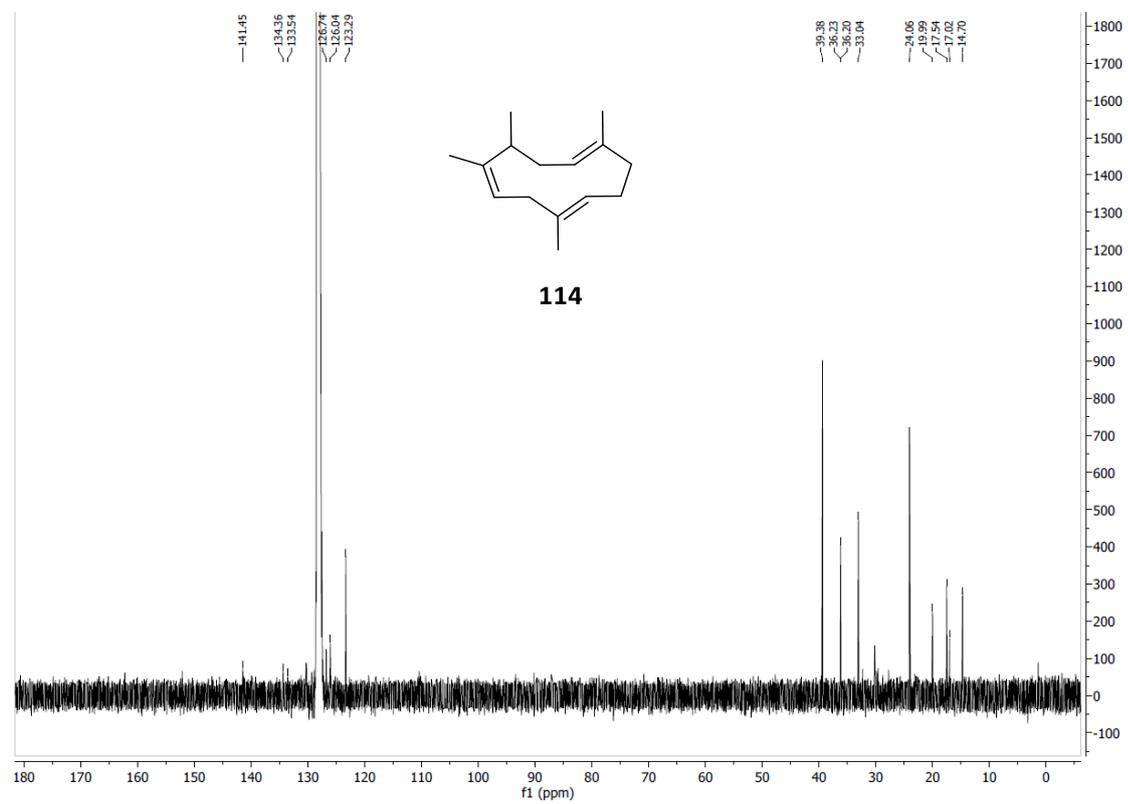
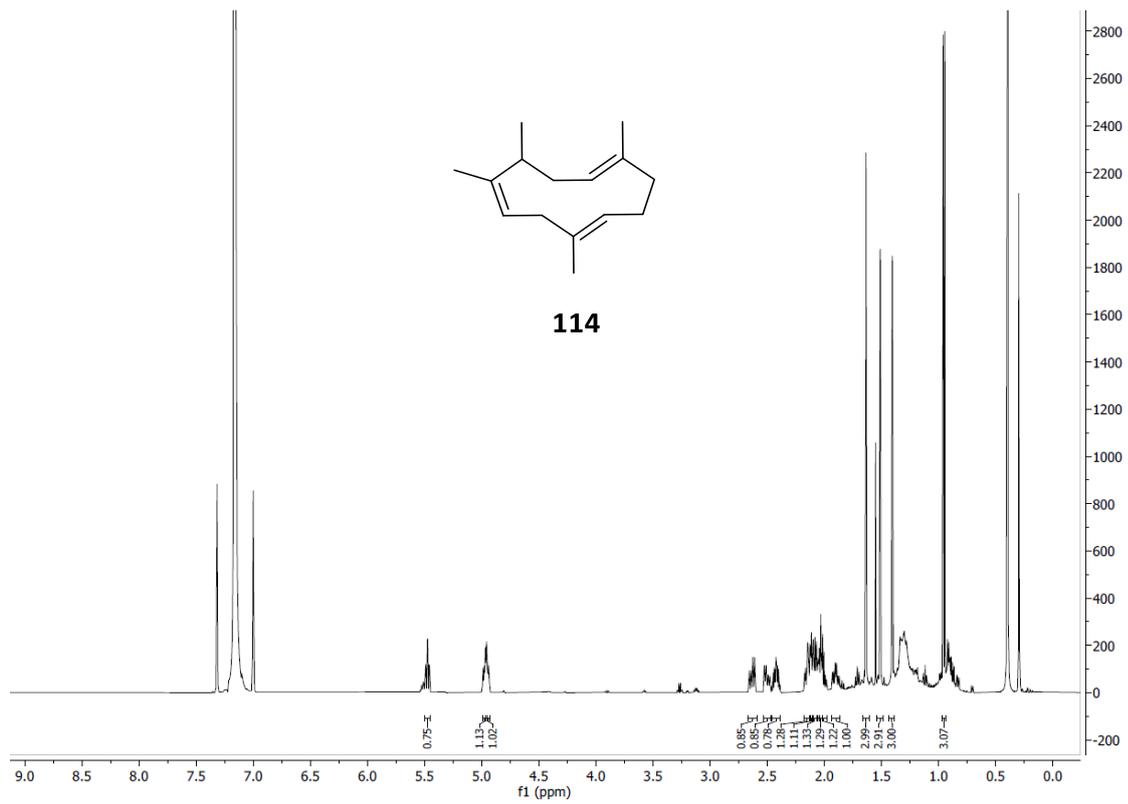
Biotransformationsprodukt 112



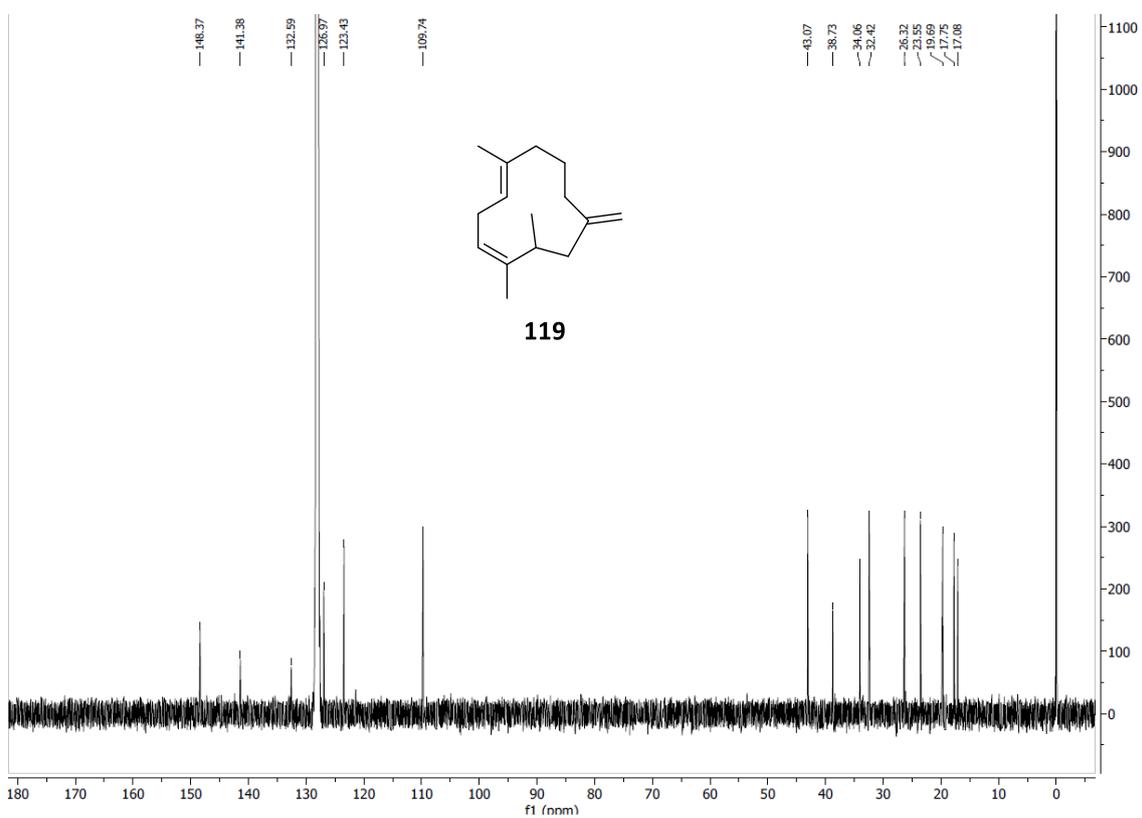
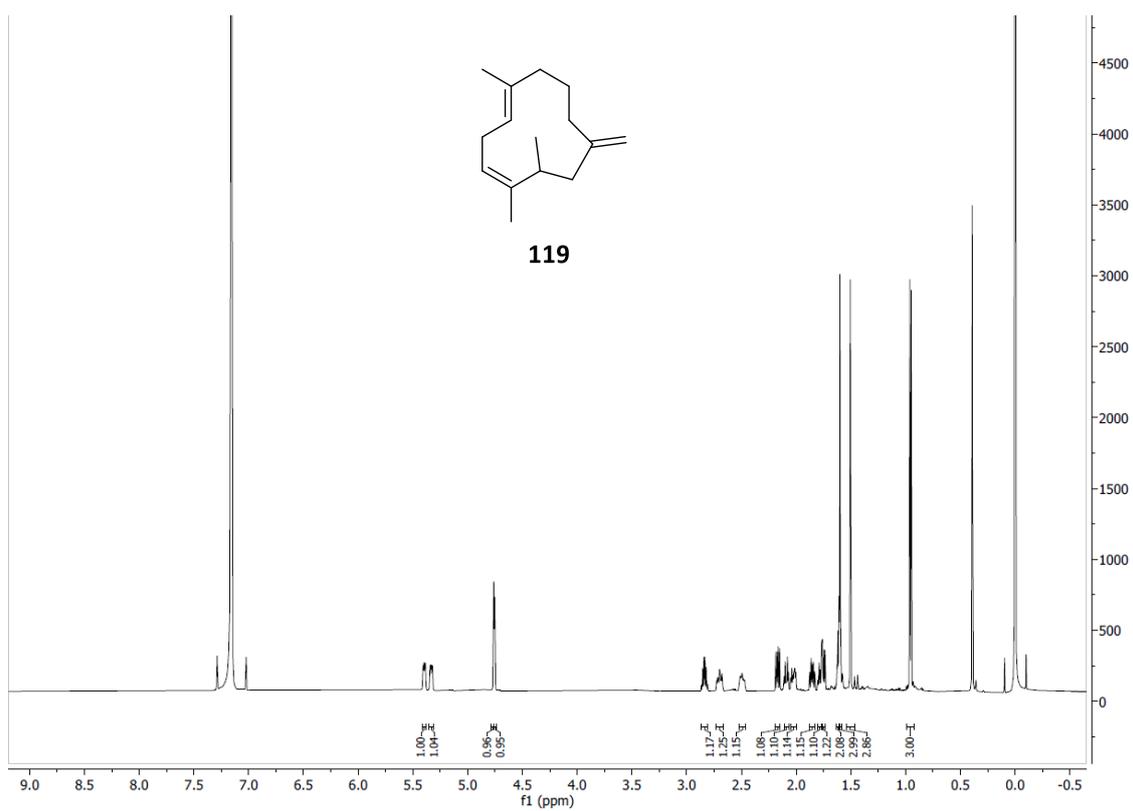
Biotransformationsprodukt 113



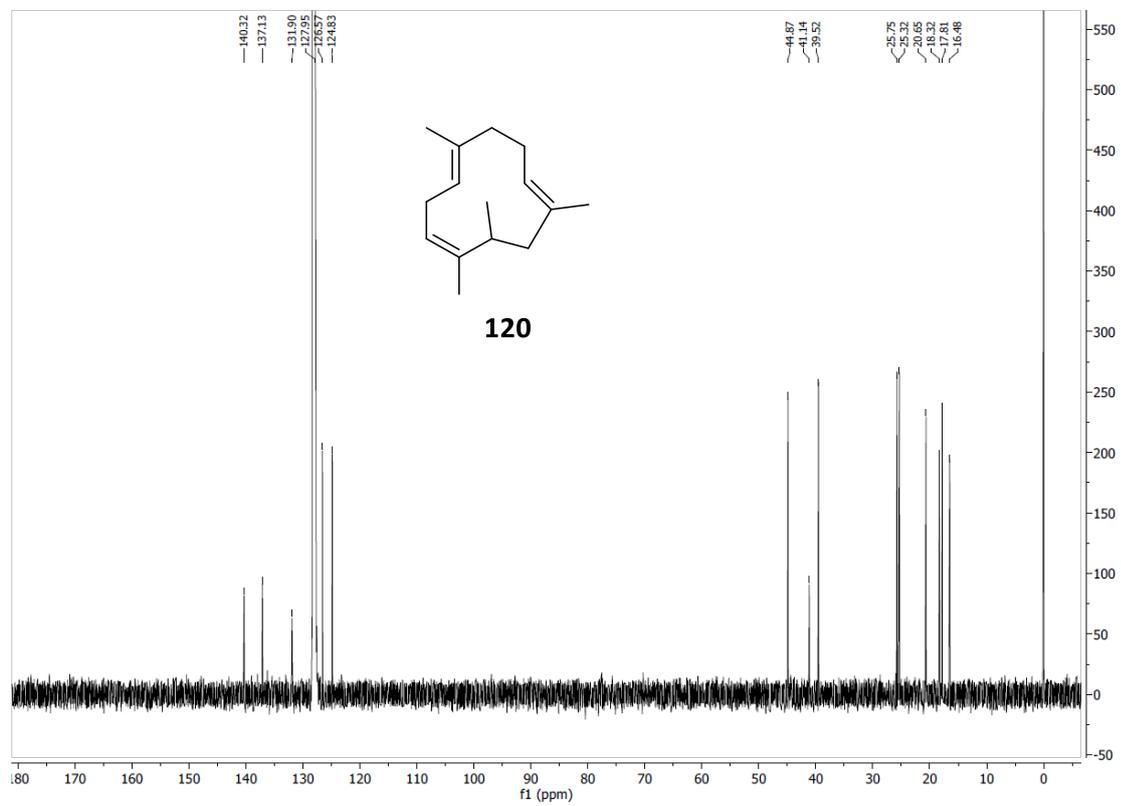
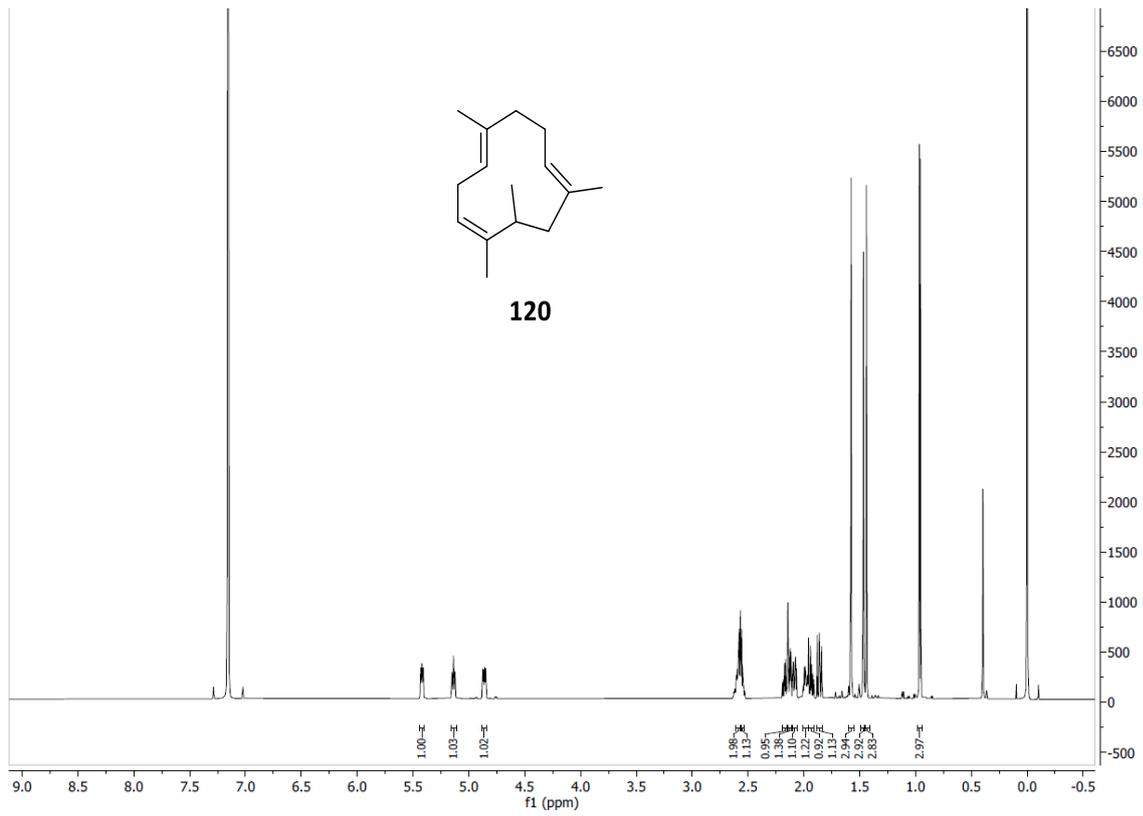
Biotransformationsprodukt 114

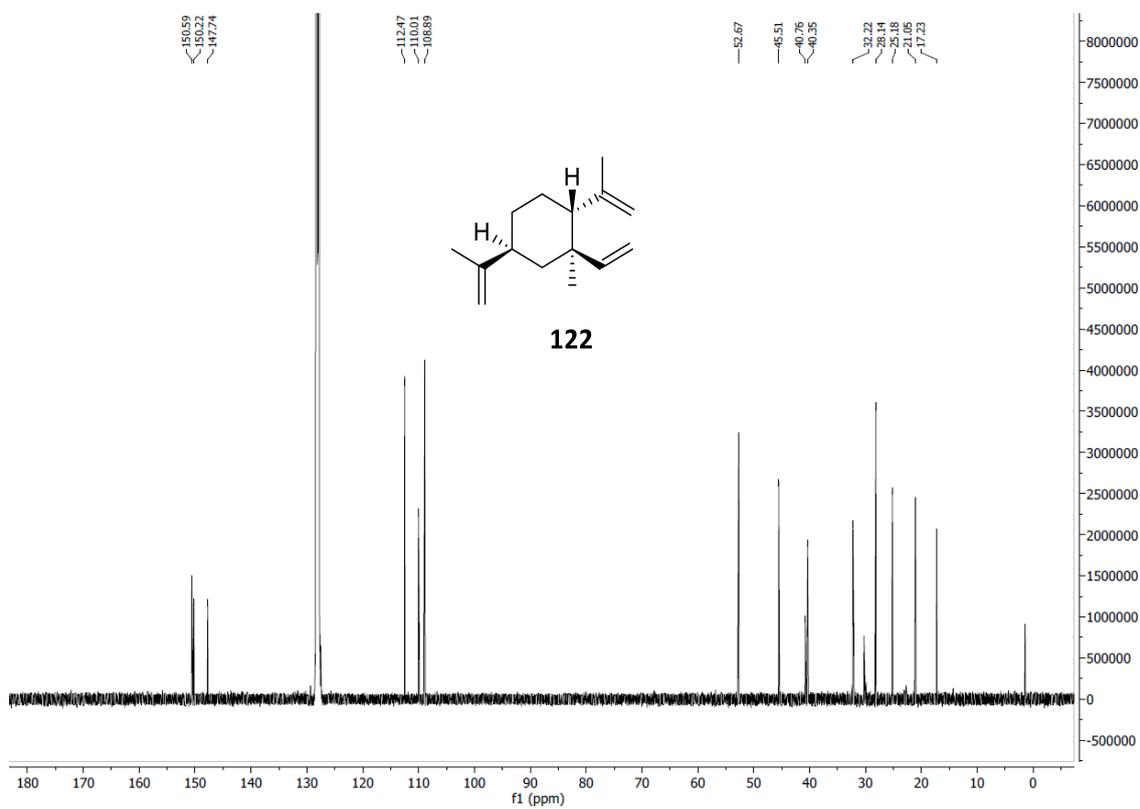
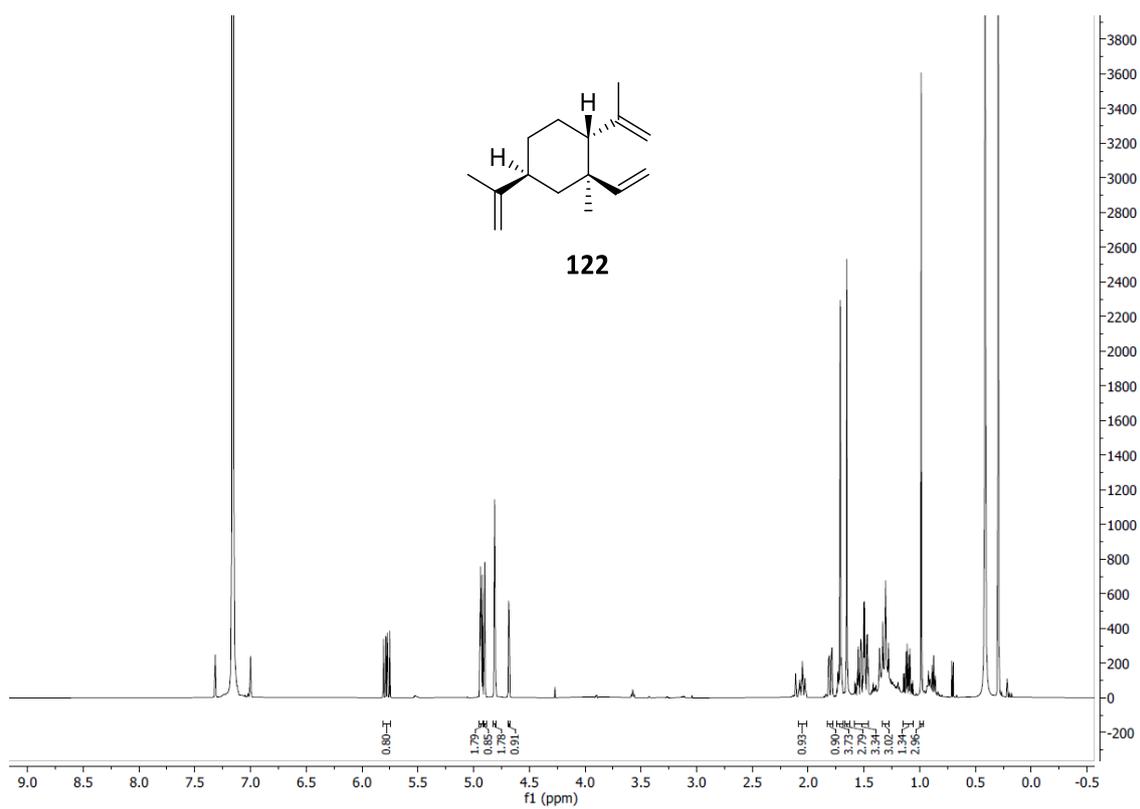


Biotransformationsprodukt 119

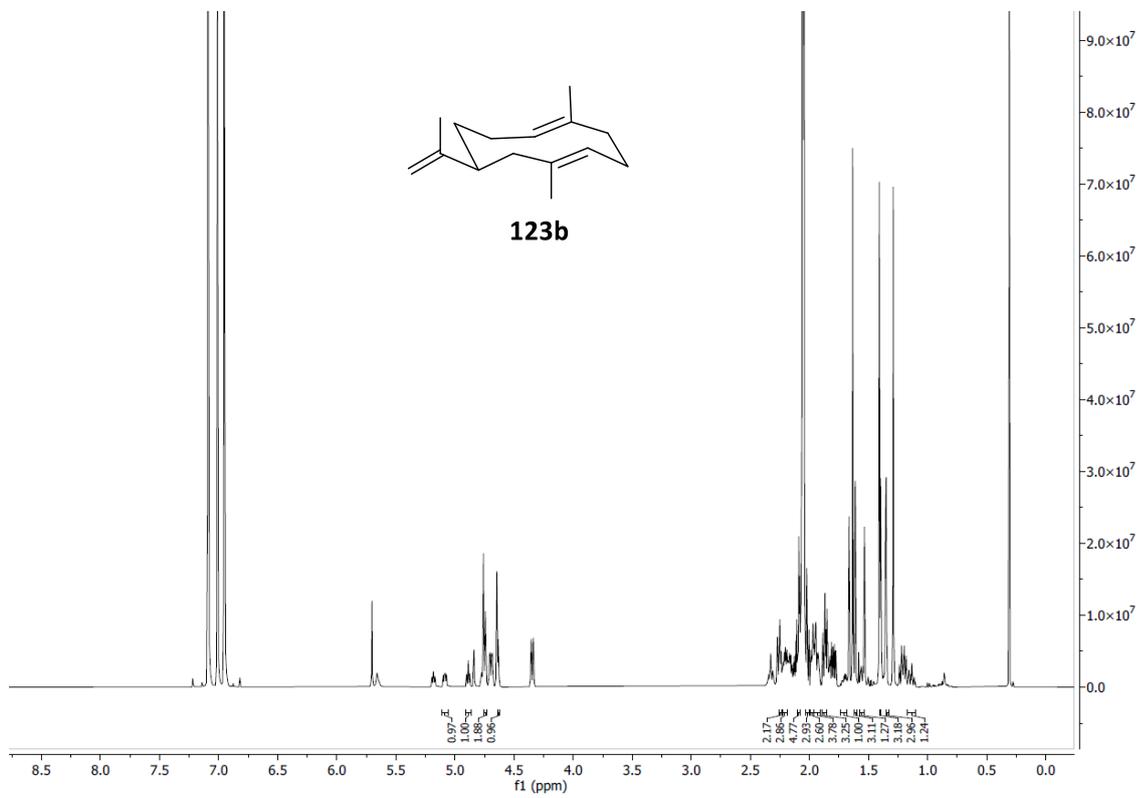
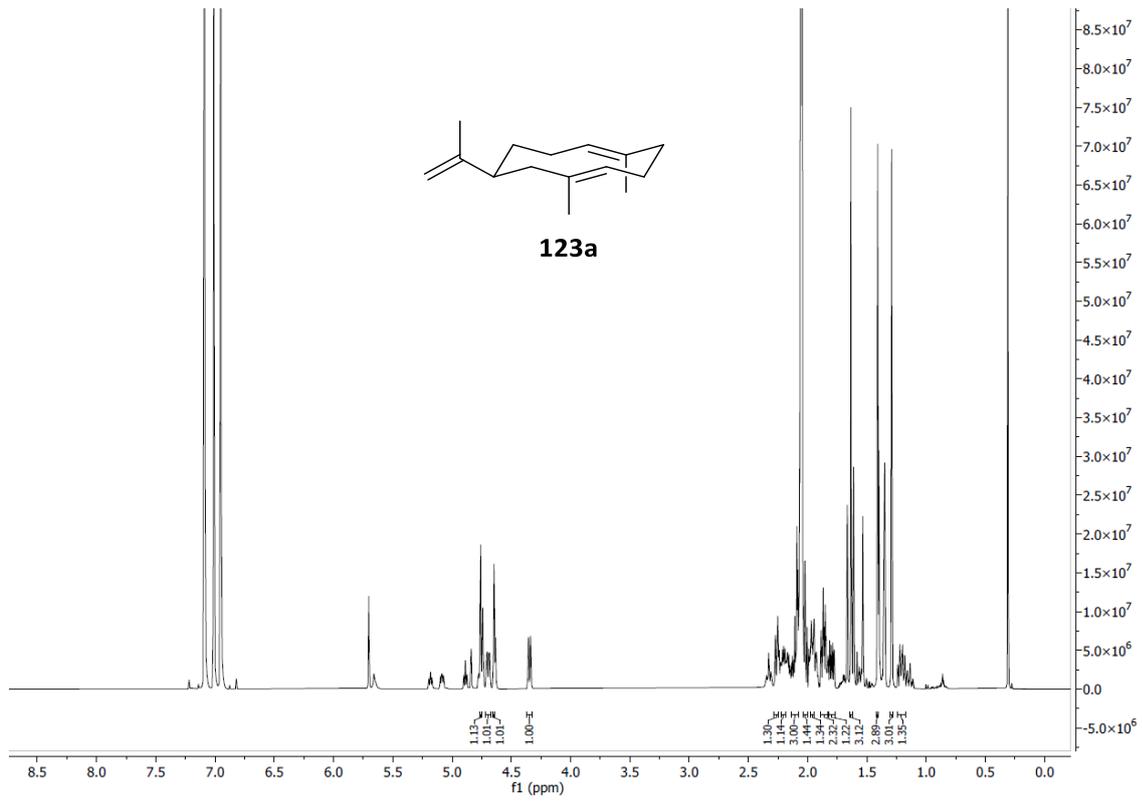


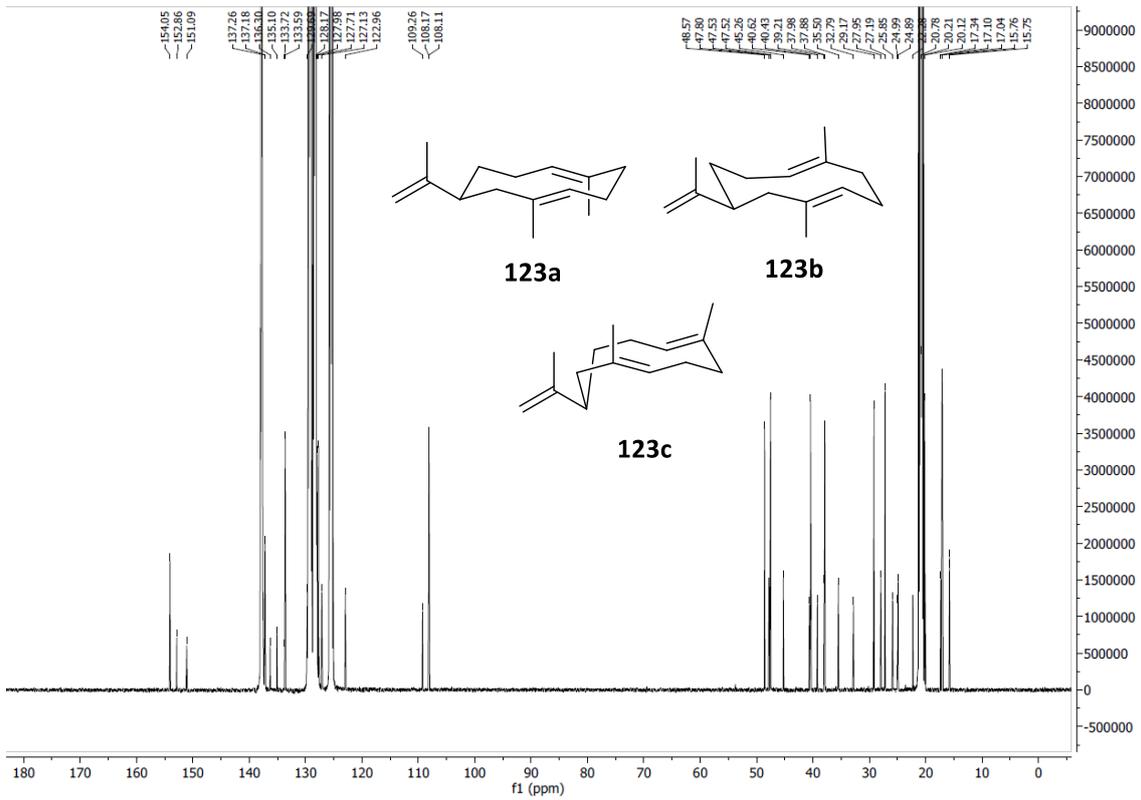
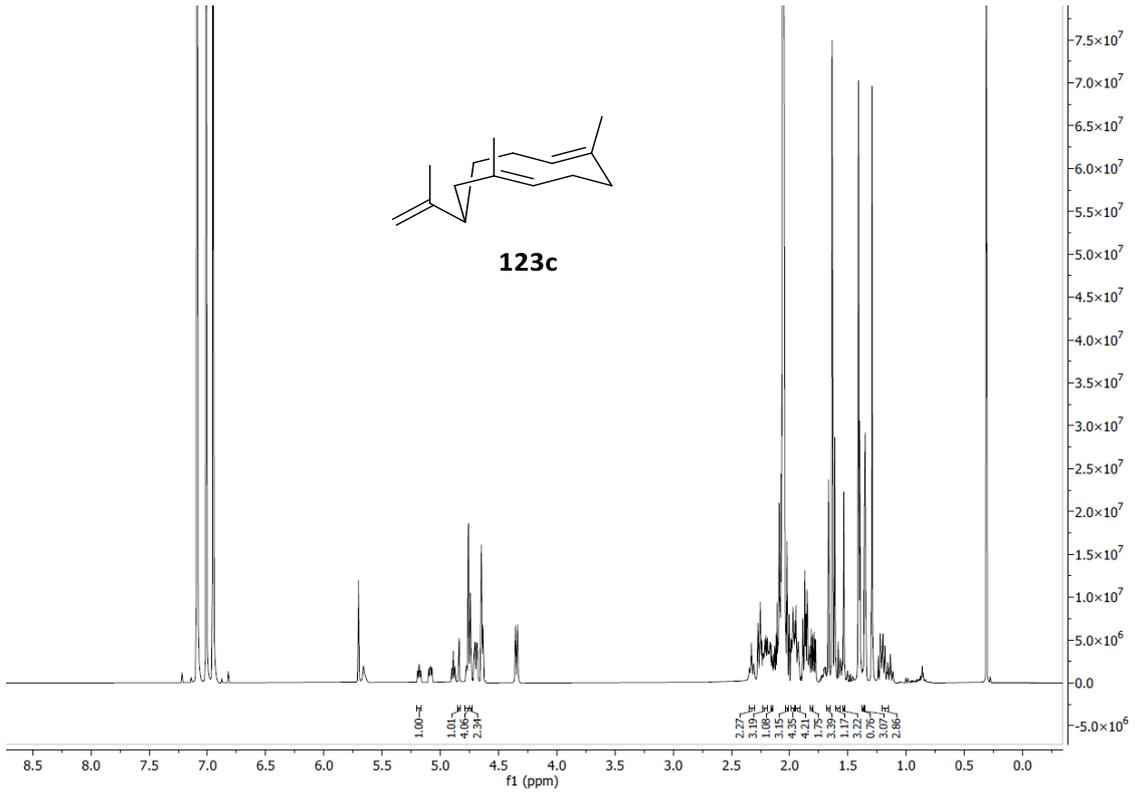
Biotransformationsprodukt 120



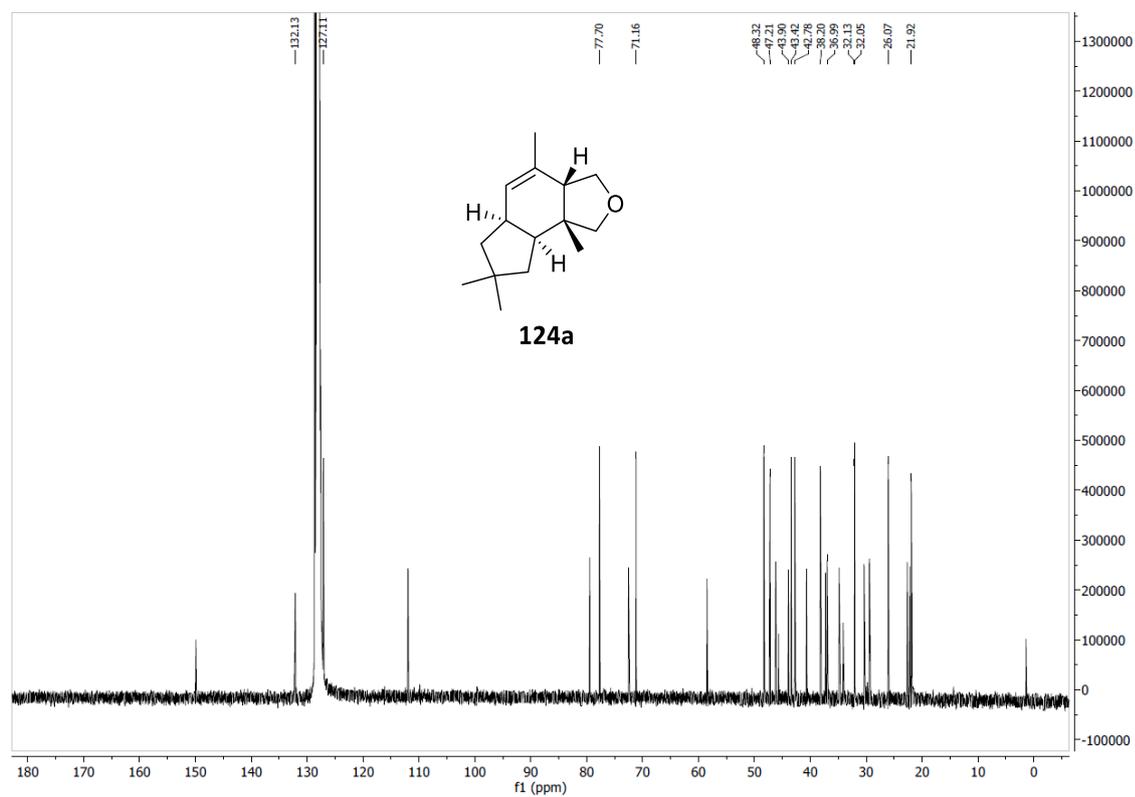
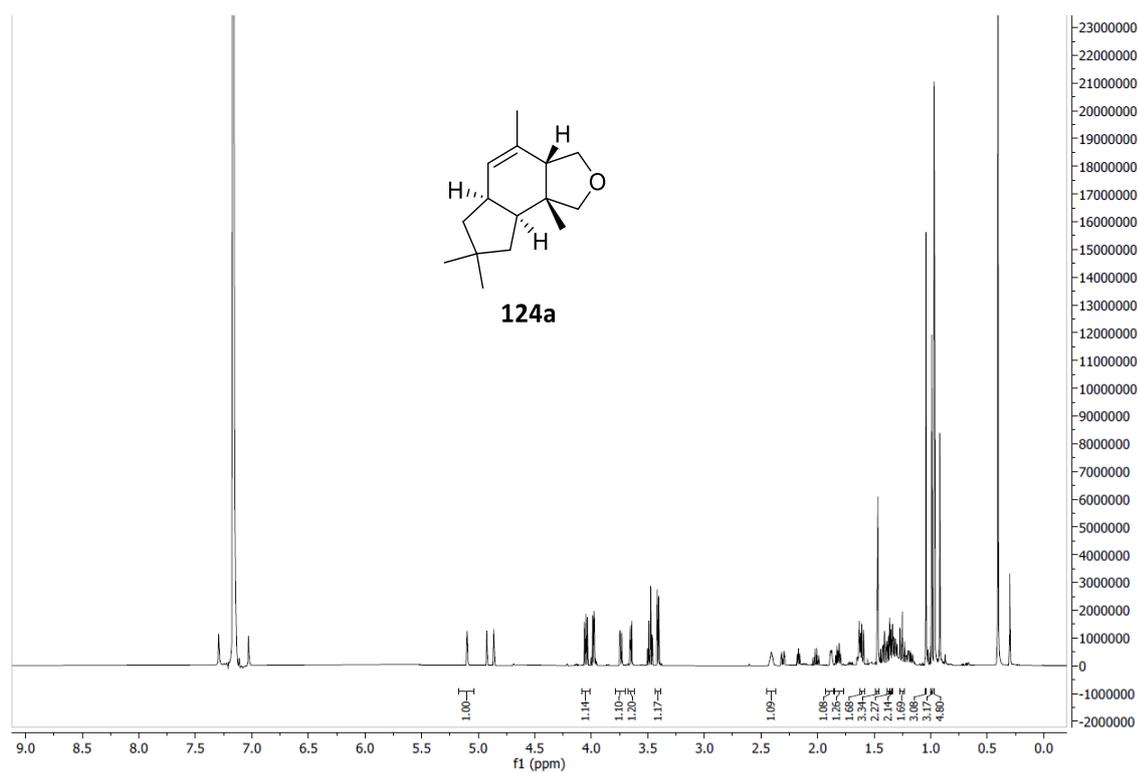
iso- β -Elemen (122)

iso-Germacren A (123)

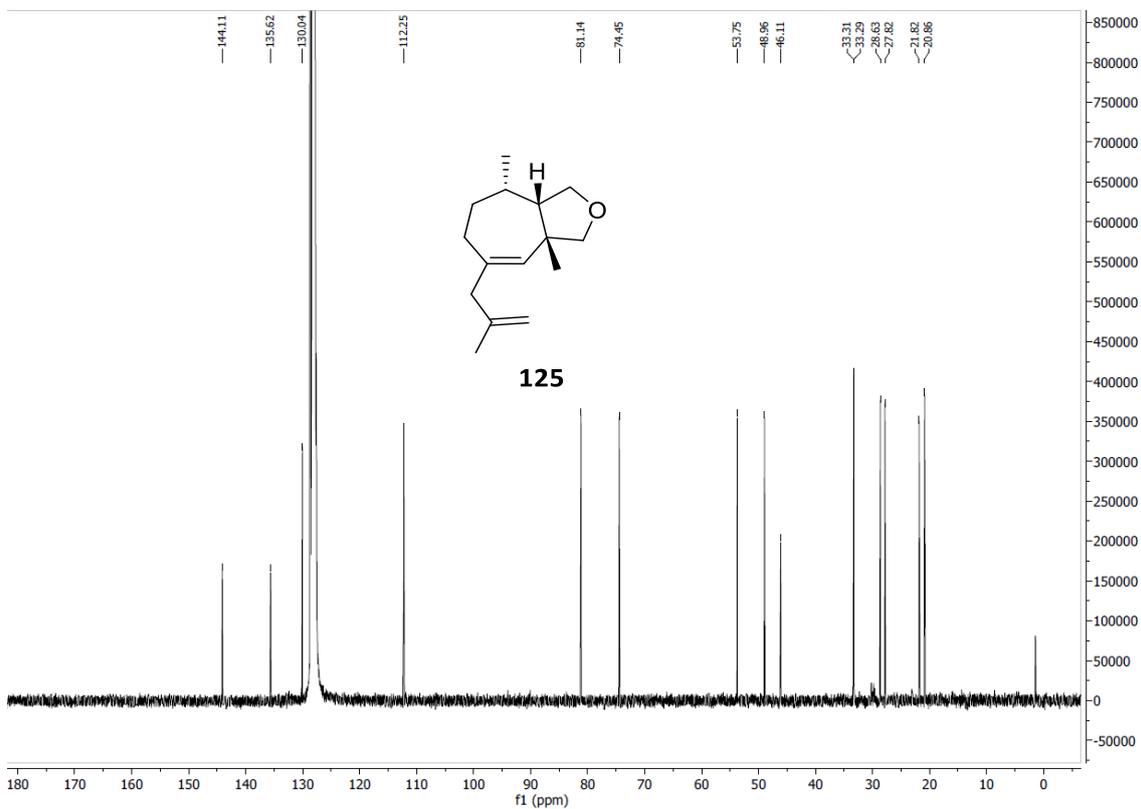
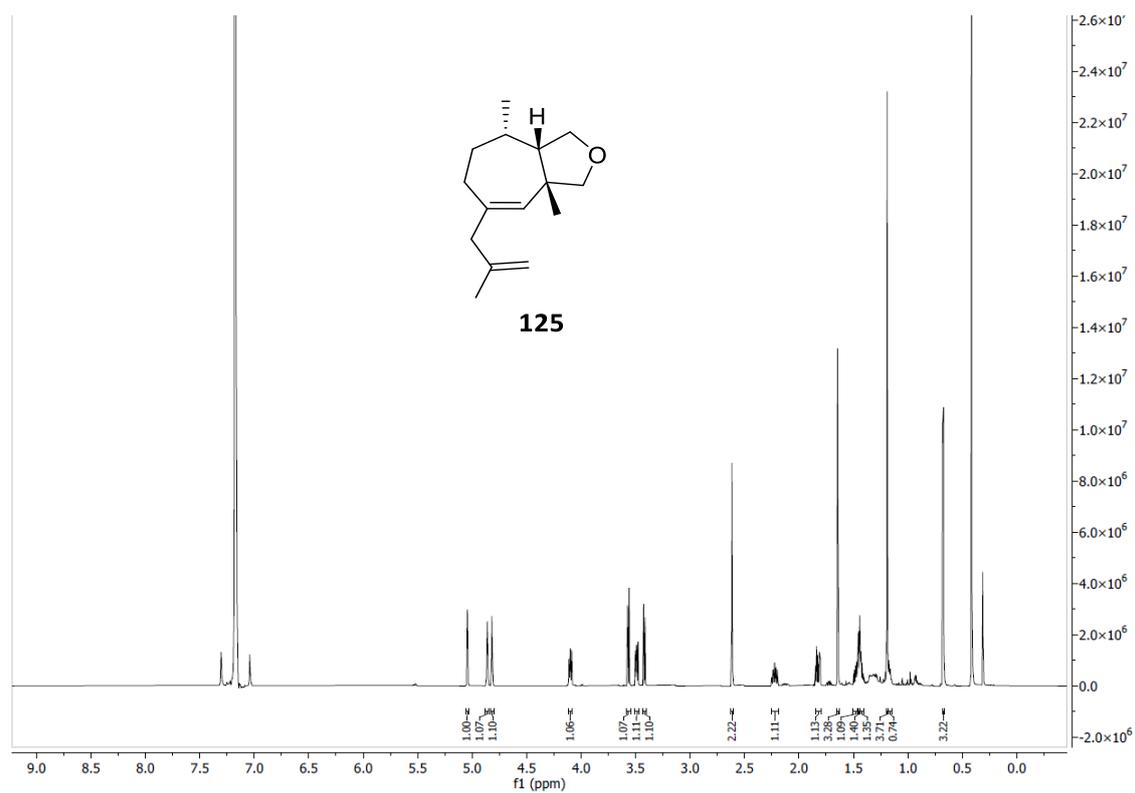




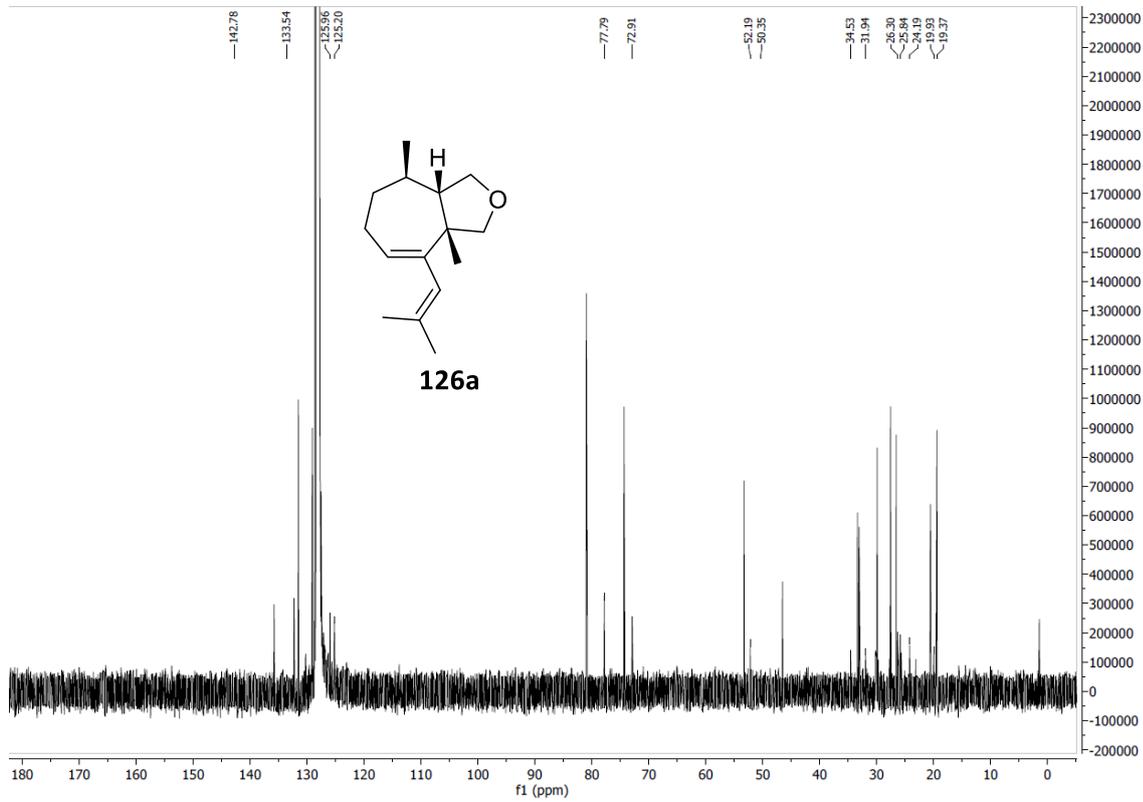
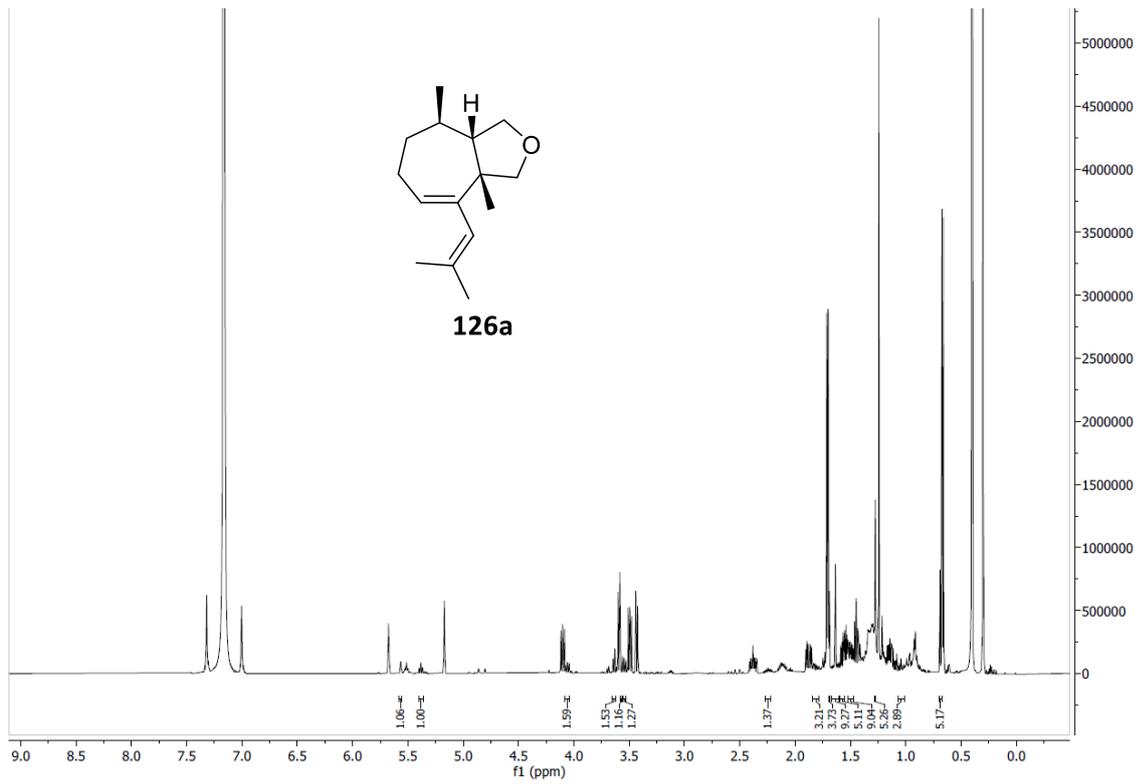
Biotransformationsprodukt 124a



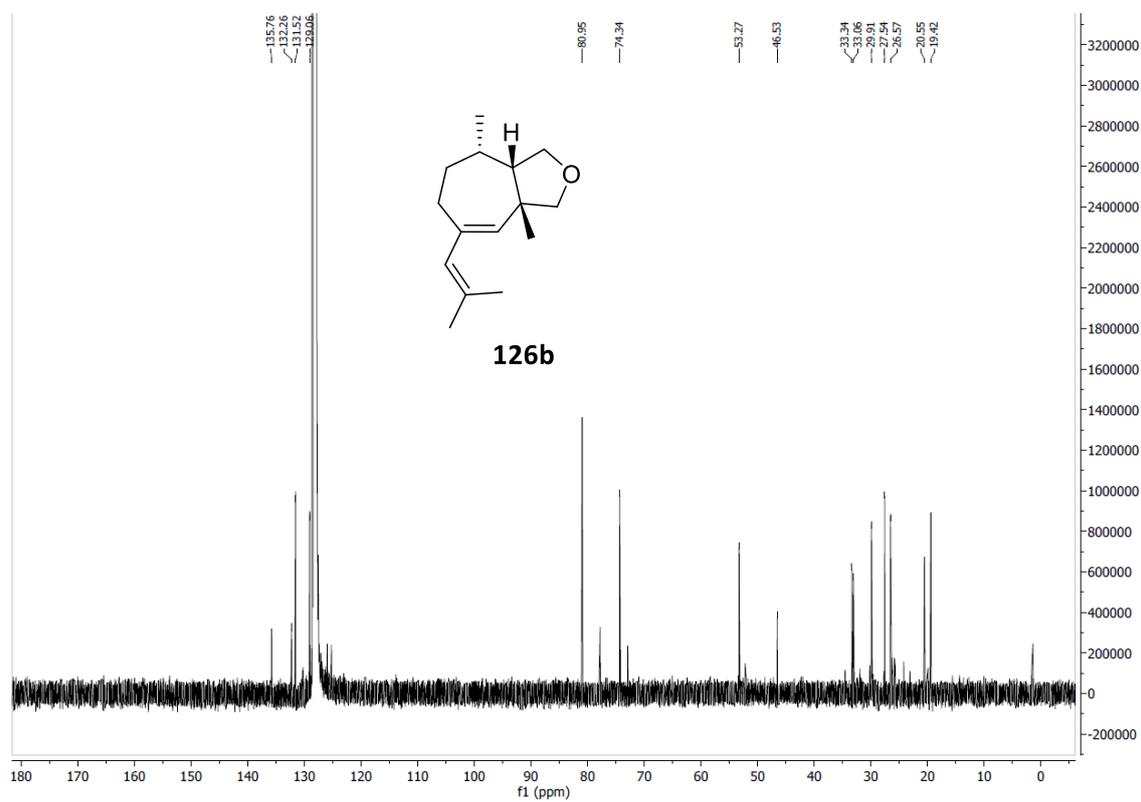
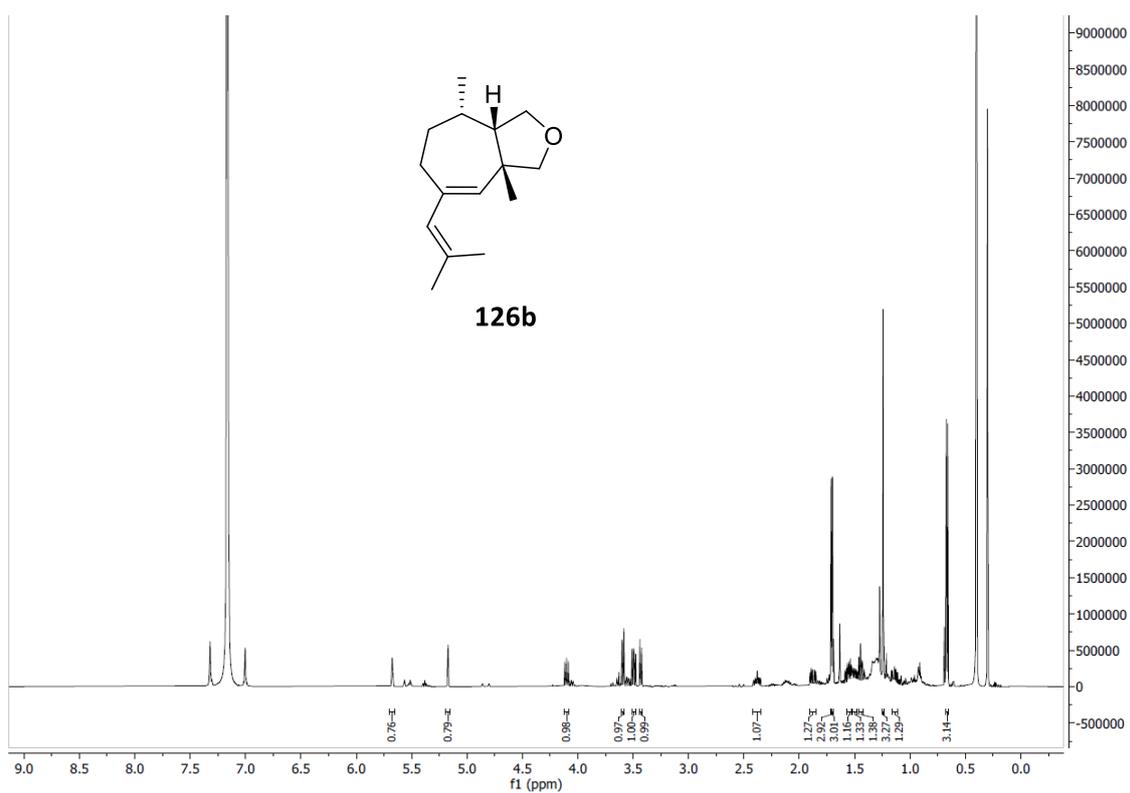
Biotransformationsprodukt 125



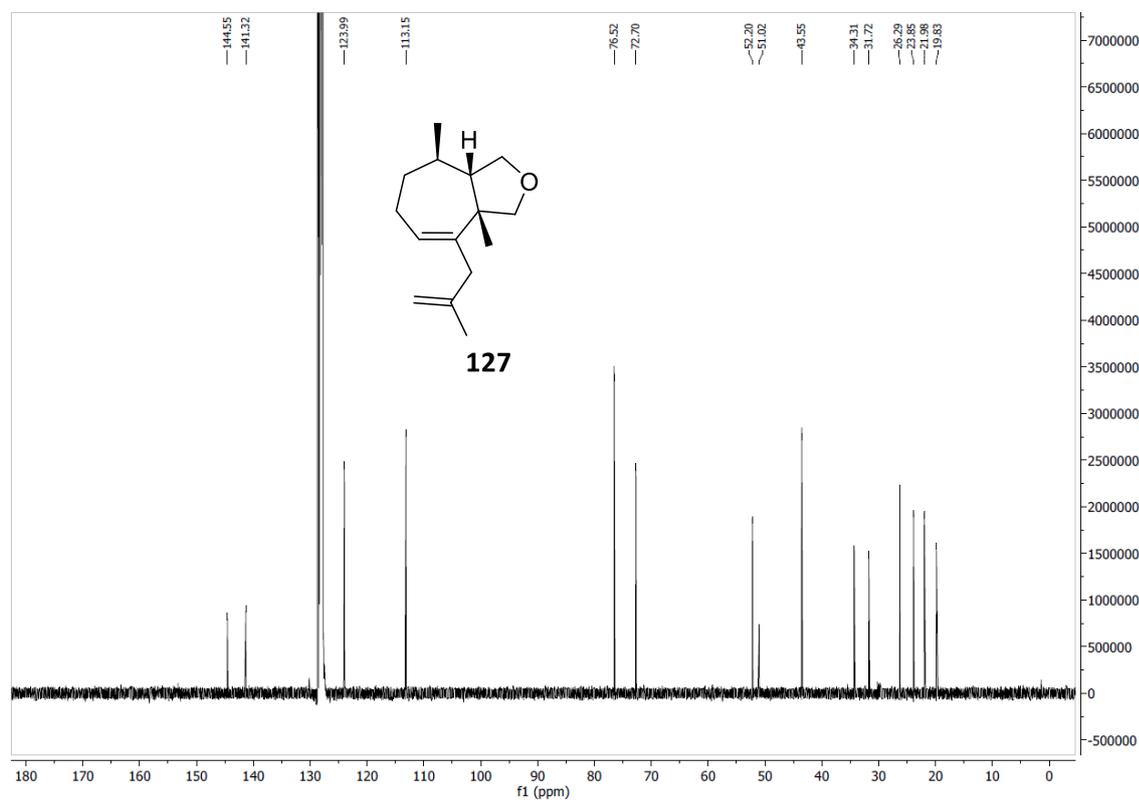
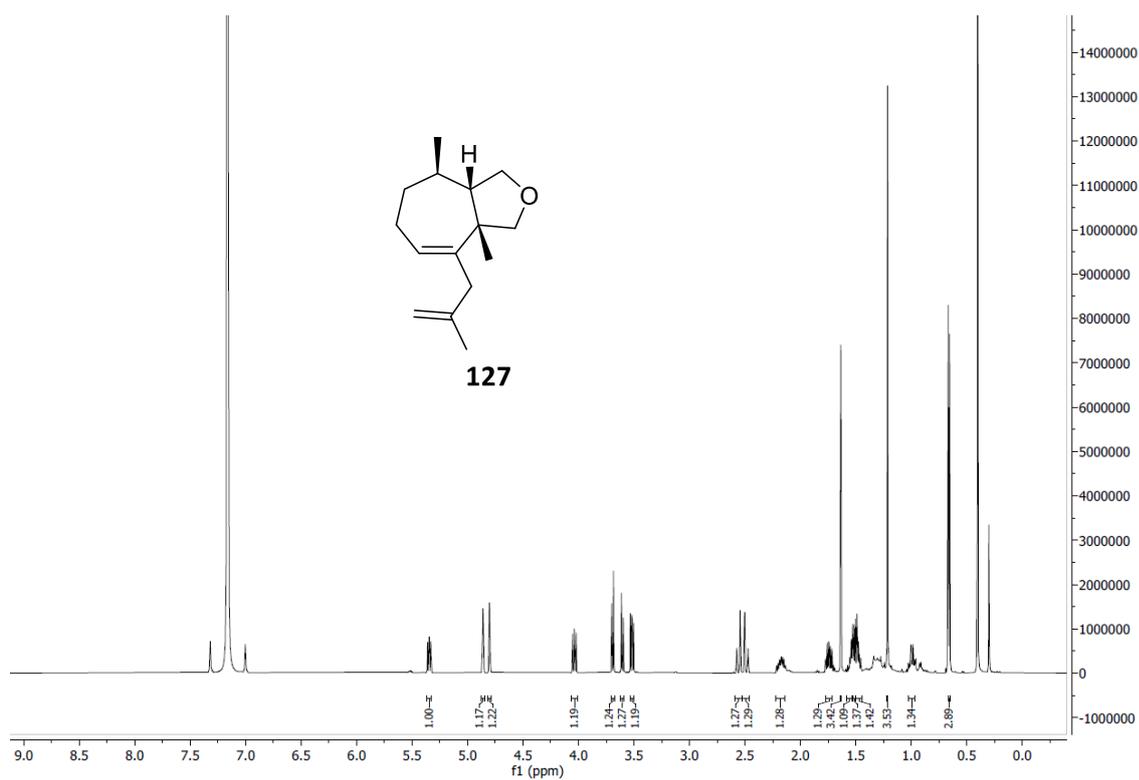
Biotransformationsprodukt 126a

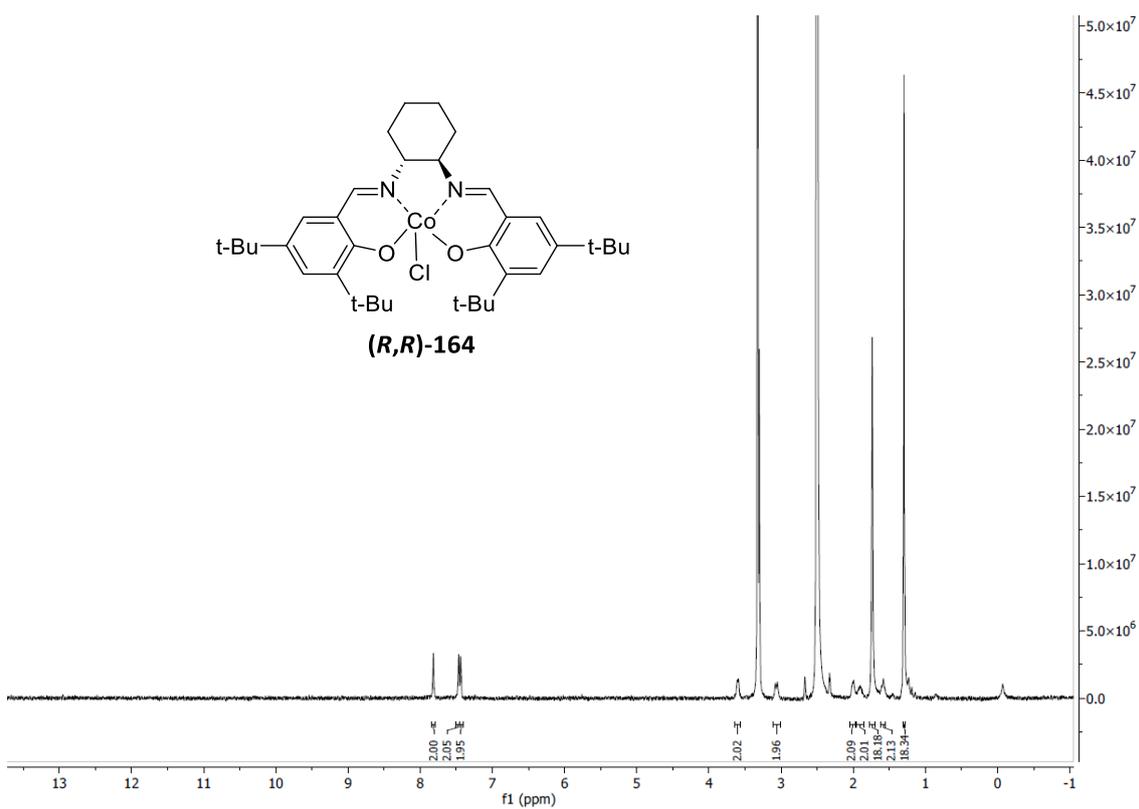
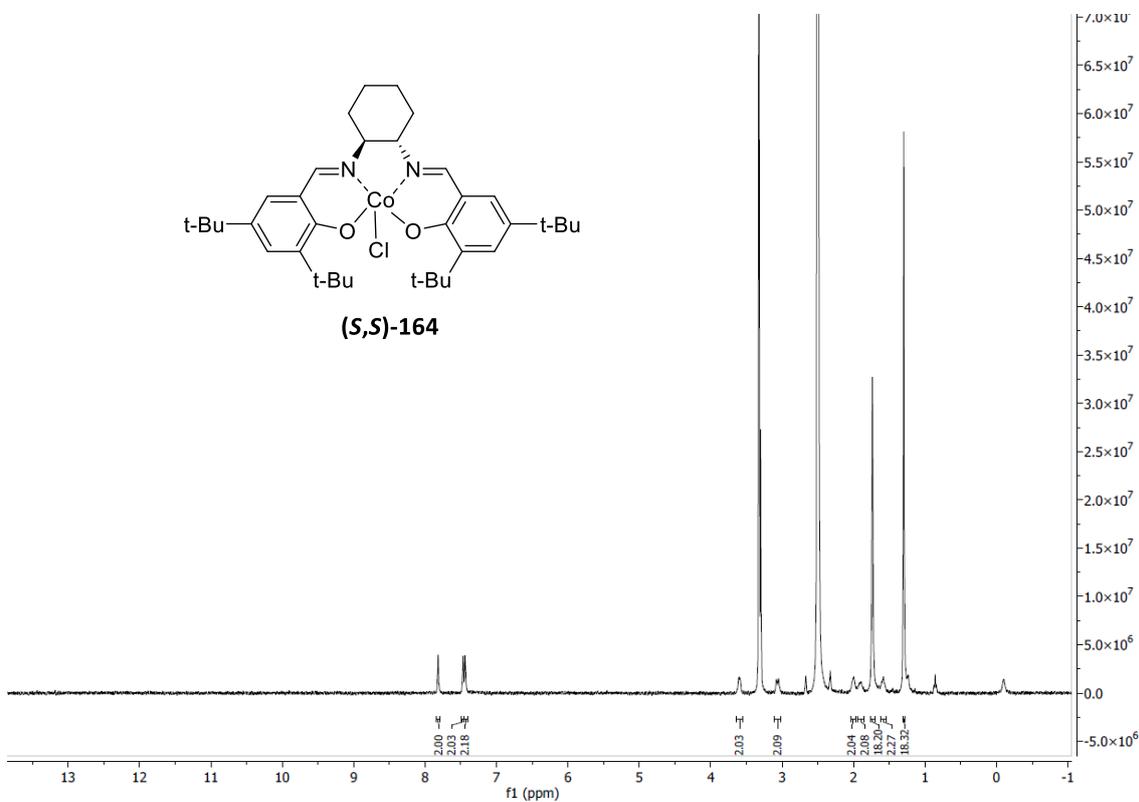


Biotransformationsprodukt 126b

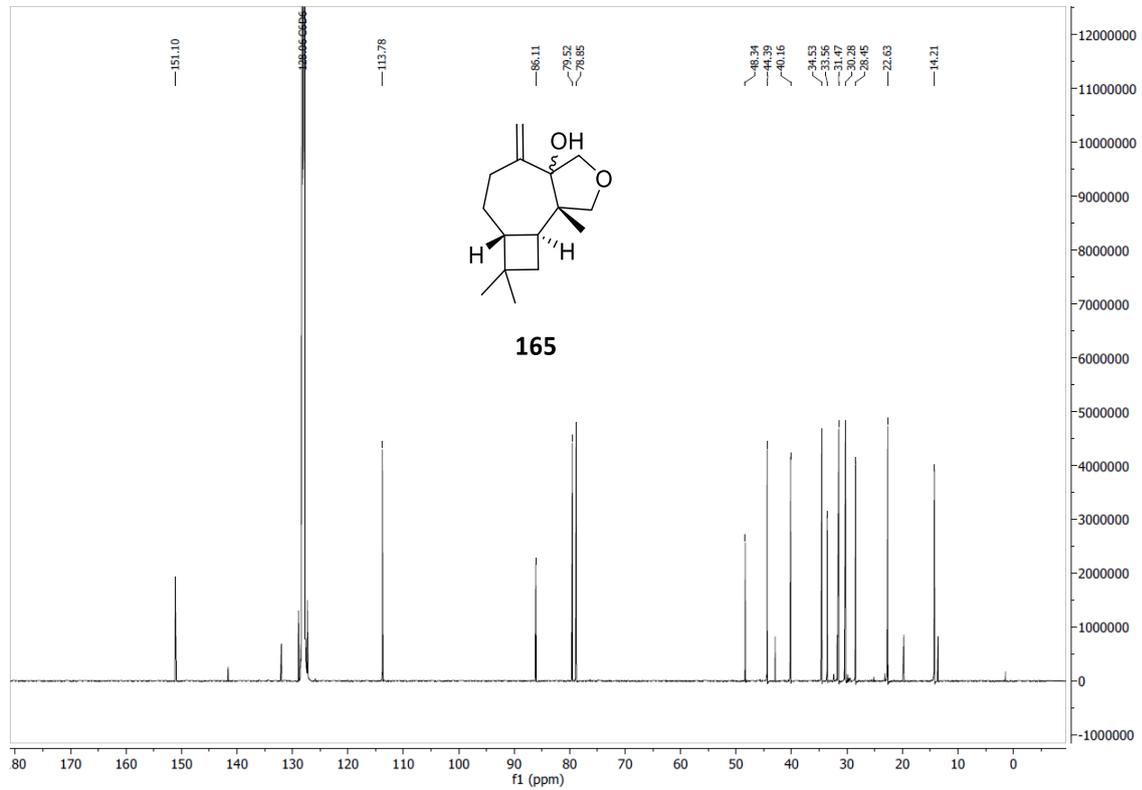
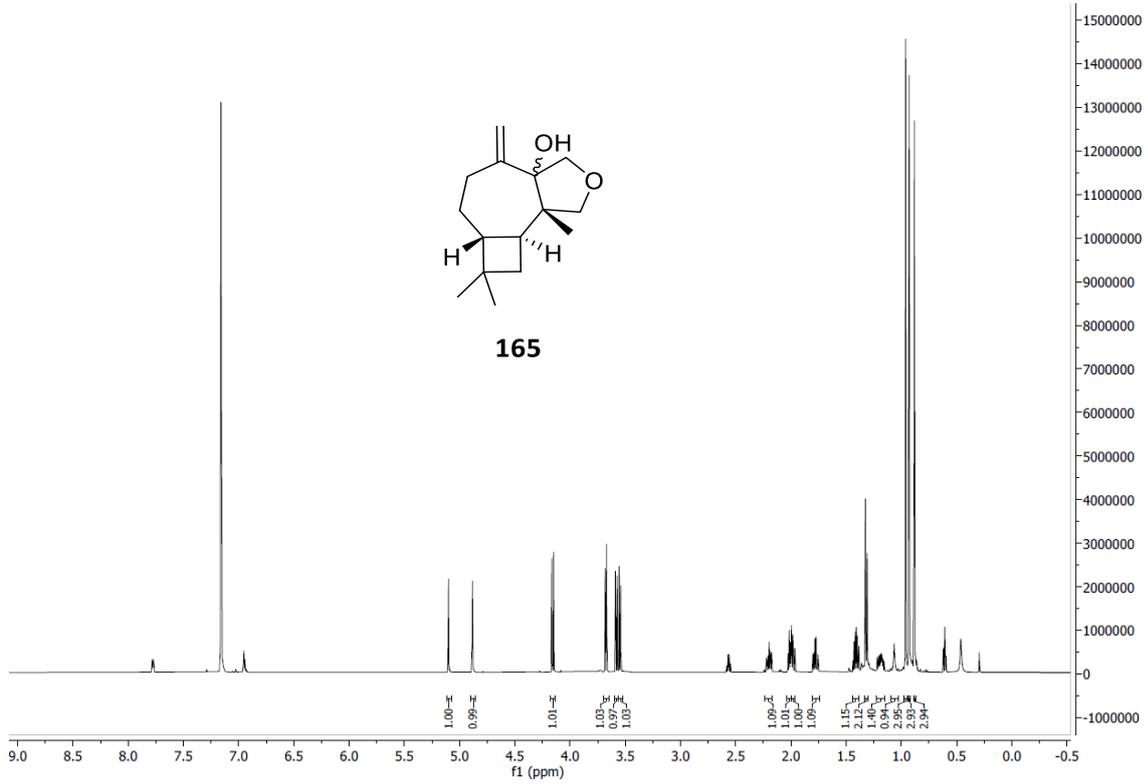


Biotransformationsprodukt 127

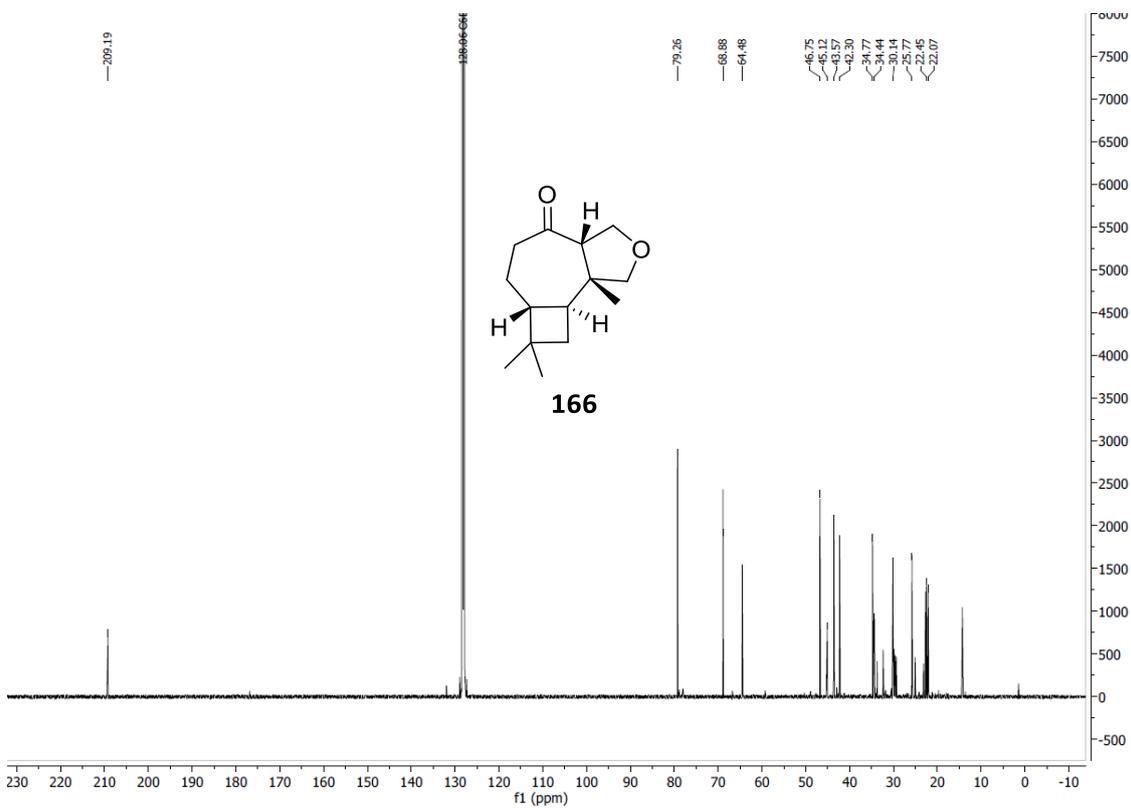
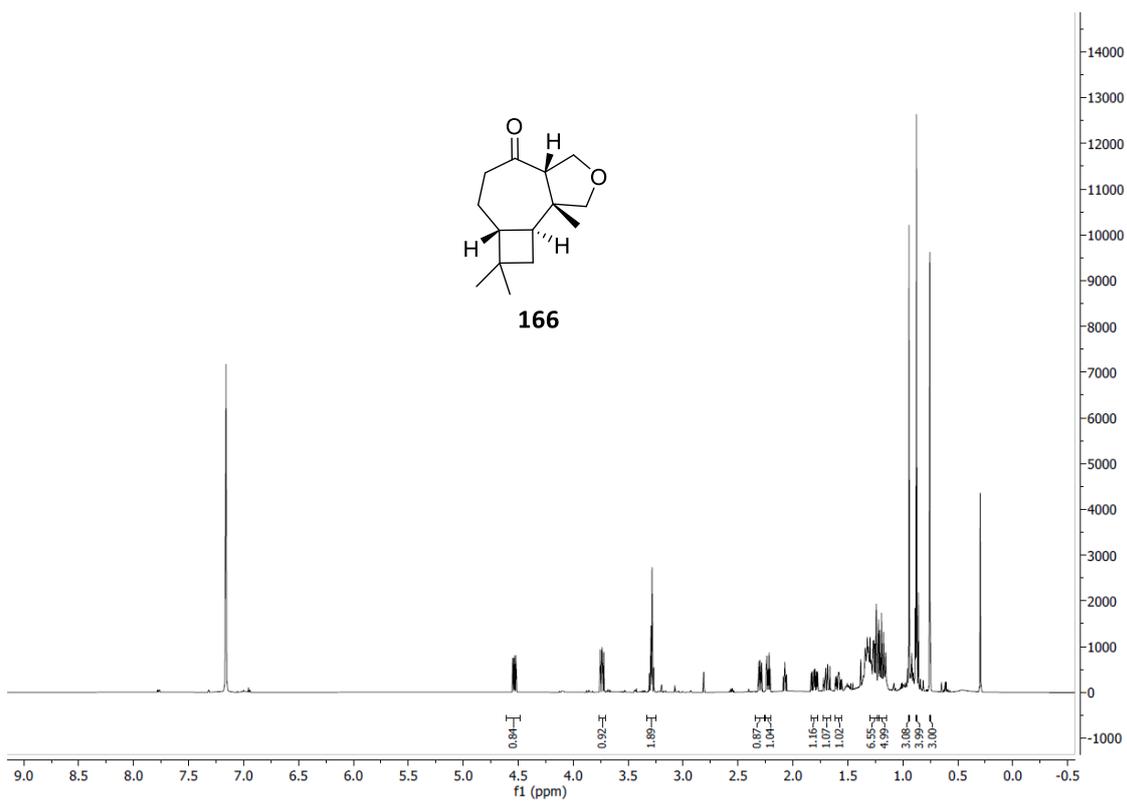


(*R,R*)-Co(salen ^tBu ^tBu)Cl (164)**(*S,S*)-Co(salen ^tBu ^tBu)Cl (164)**

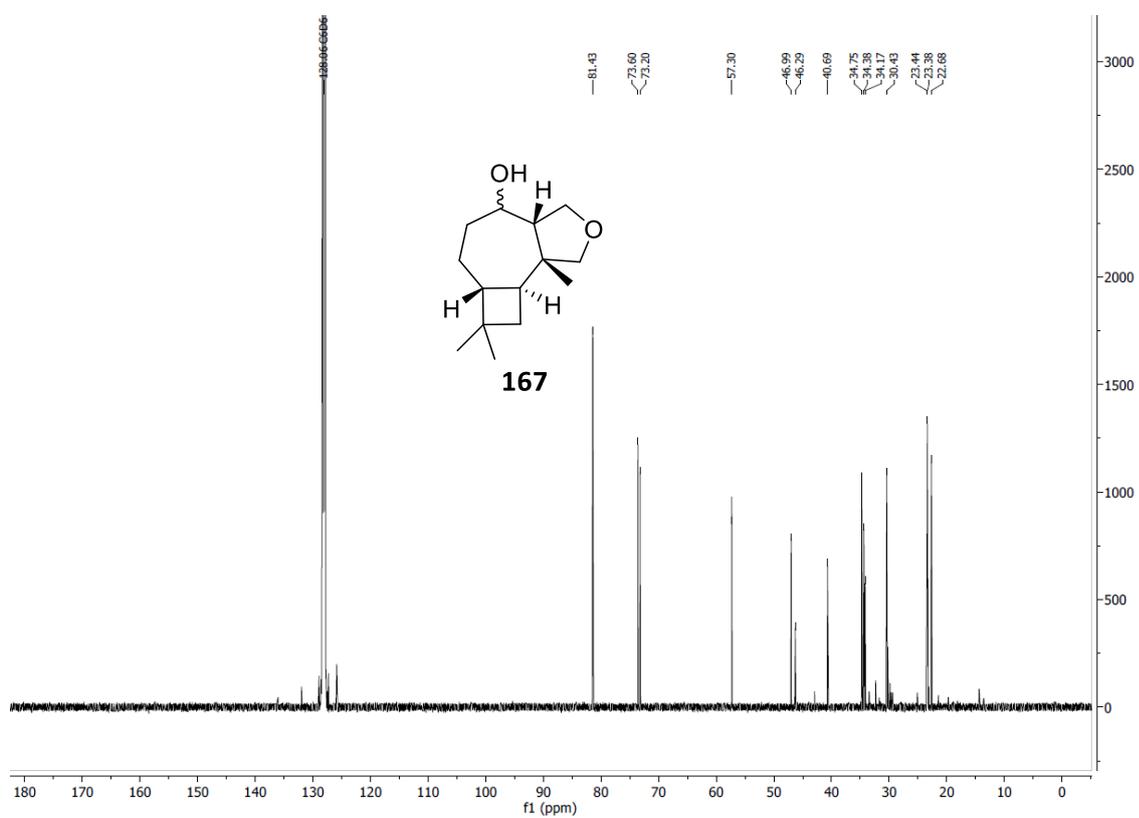
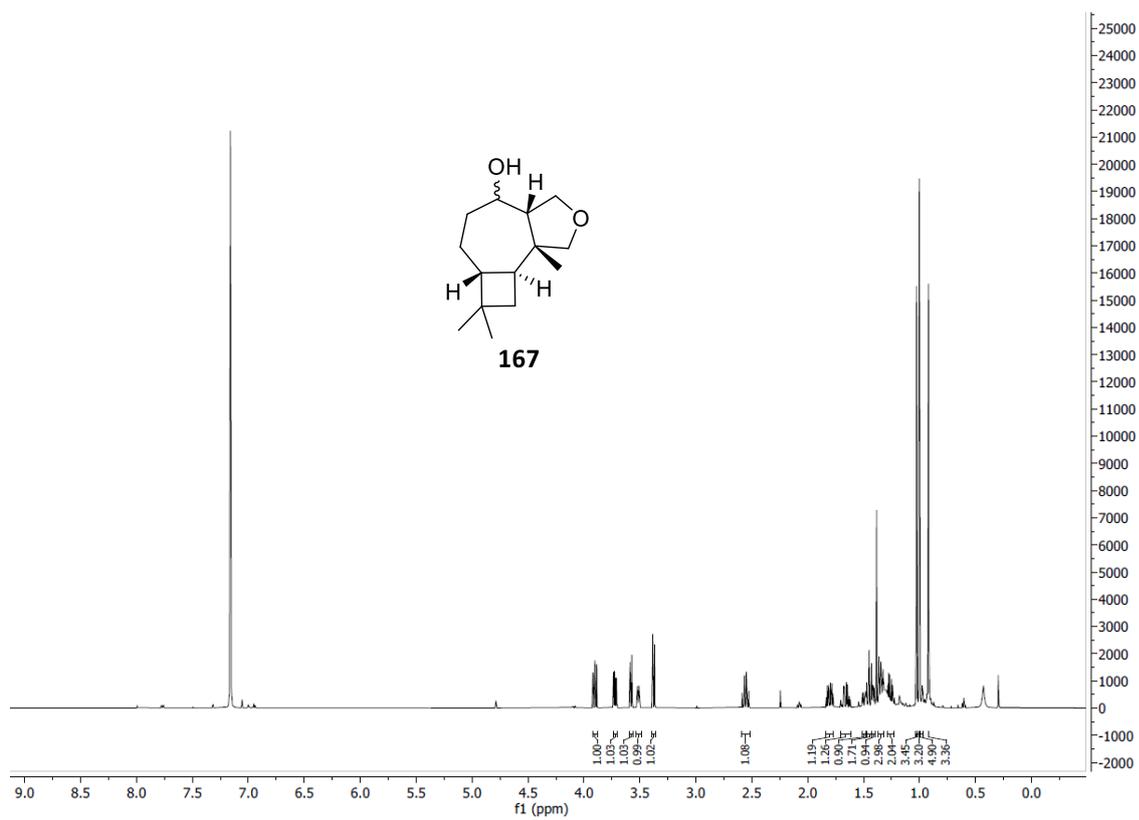
RILEY-Oxidationsprodukt (165)



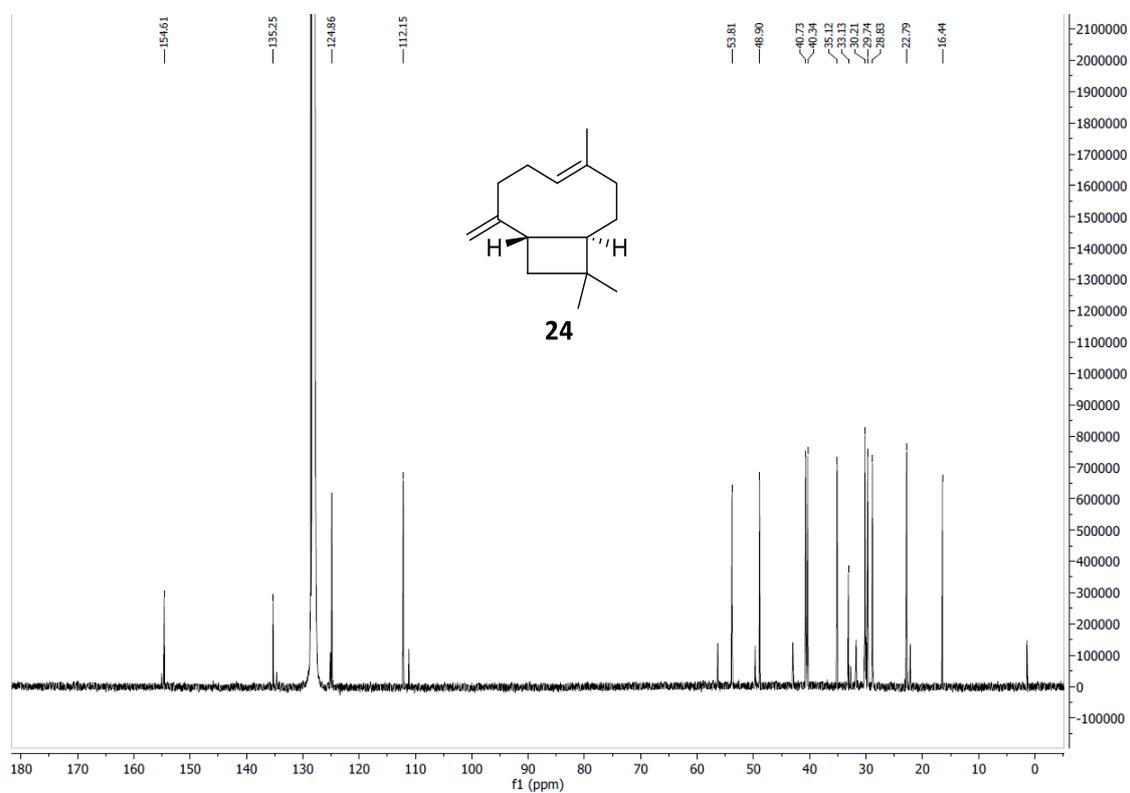
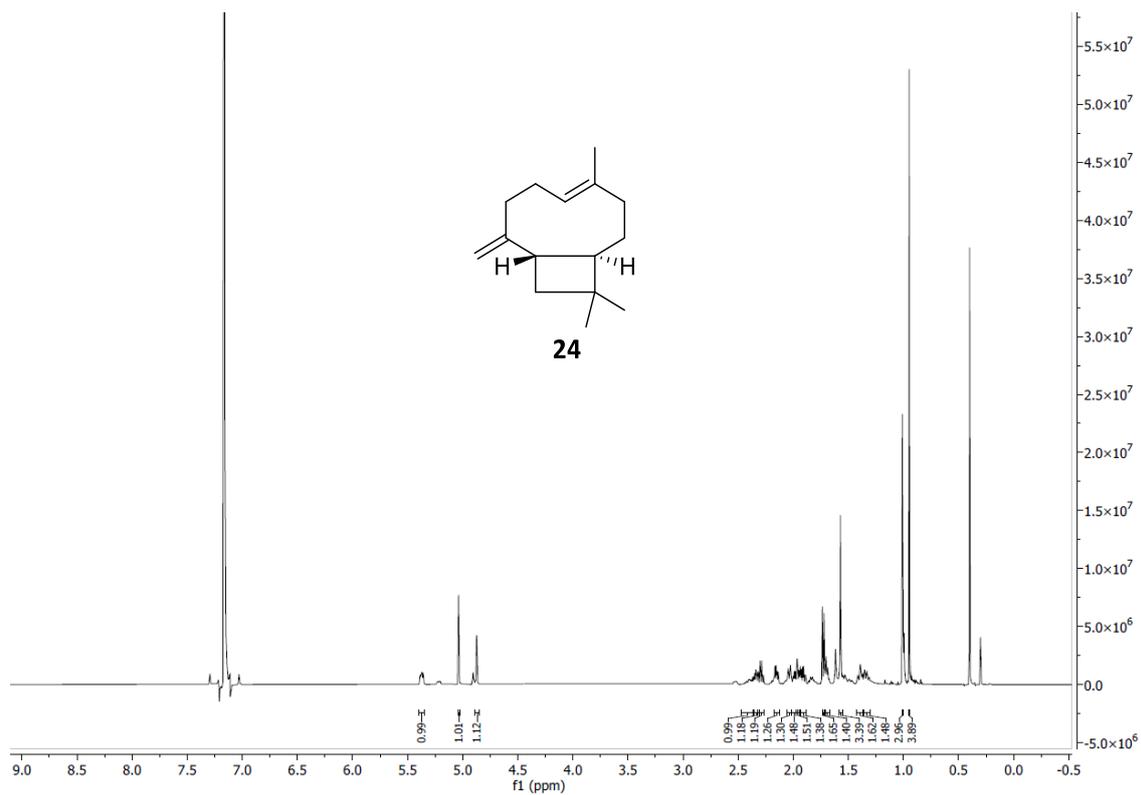
Ozonolyseprodukt (166)



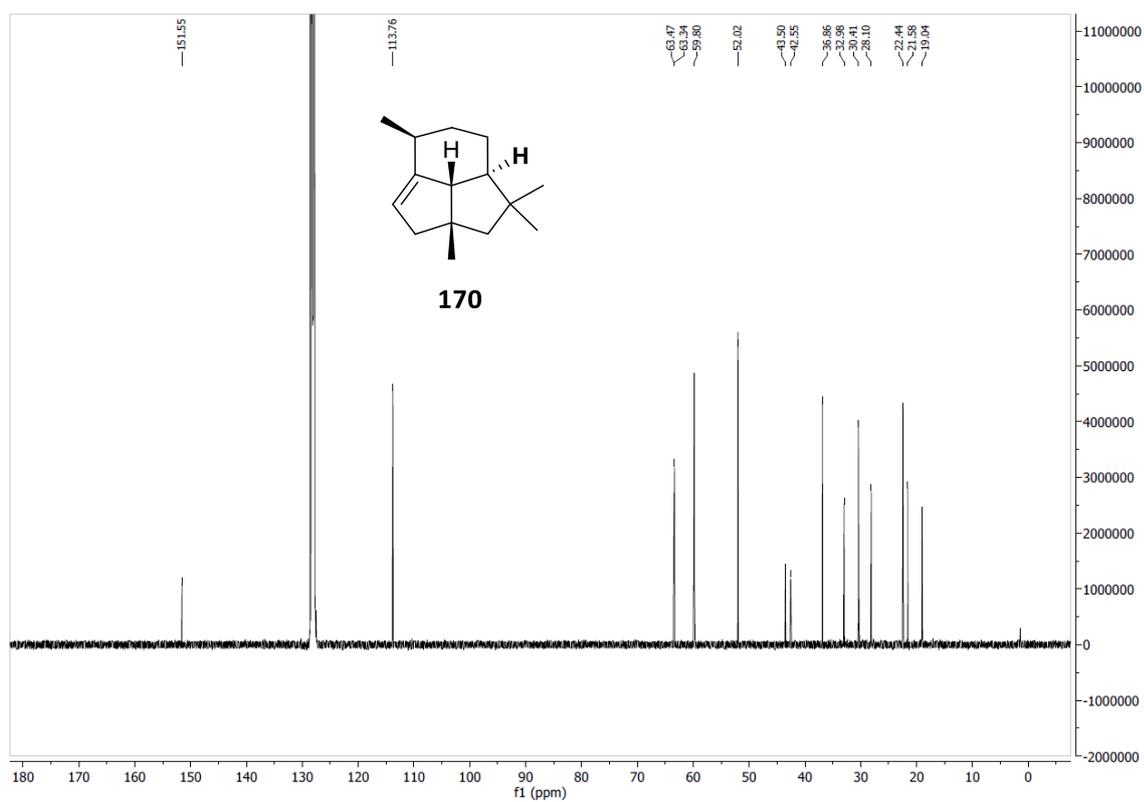
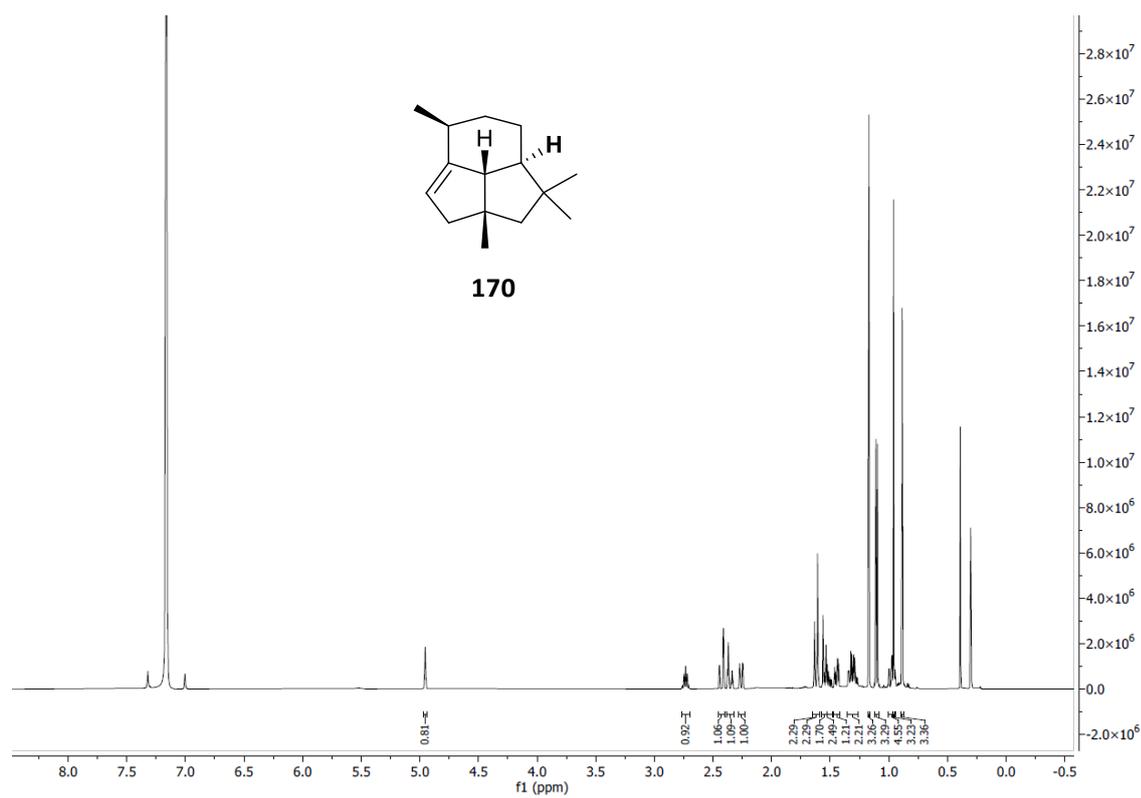
Reduktionsprodukt (167)



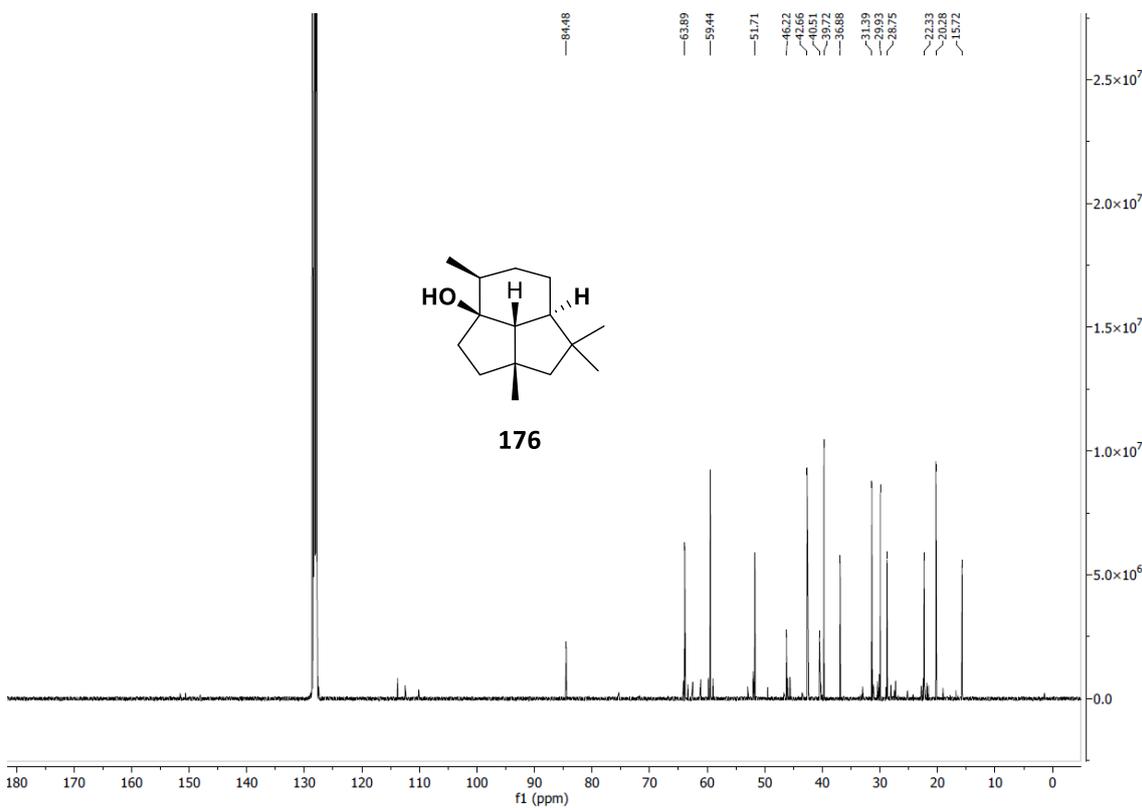
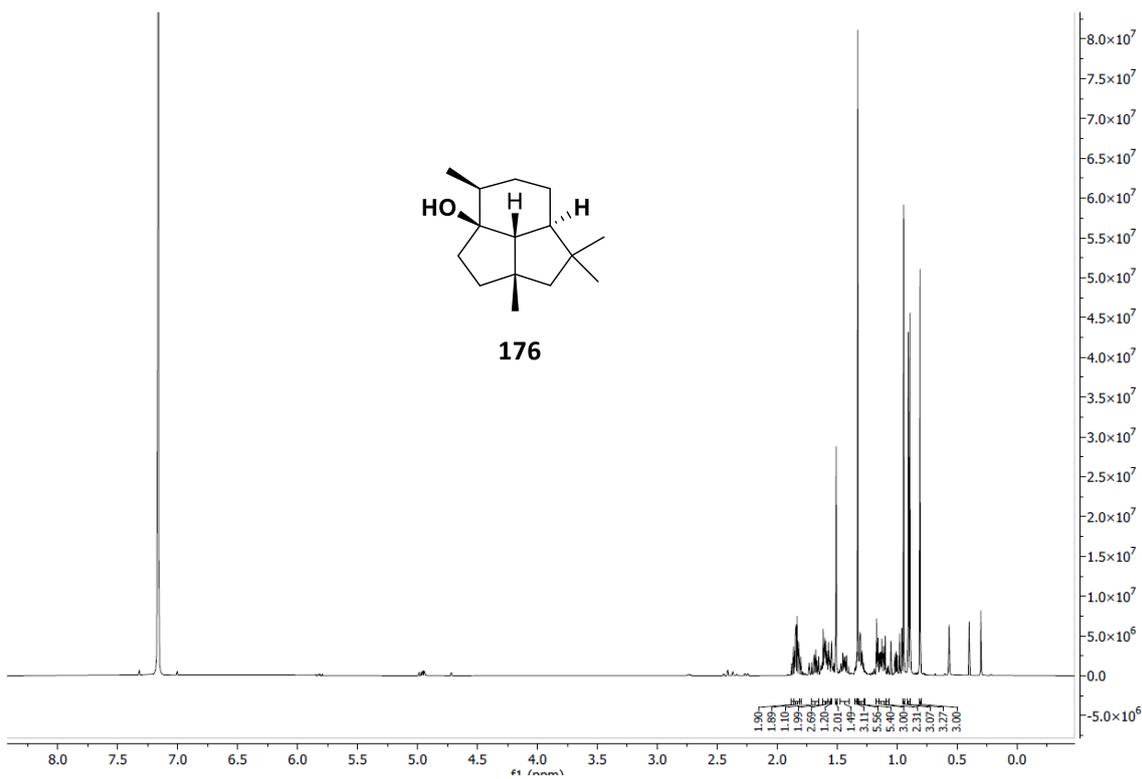
β -Caryophyllen (24)

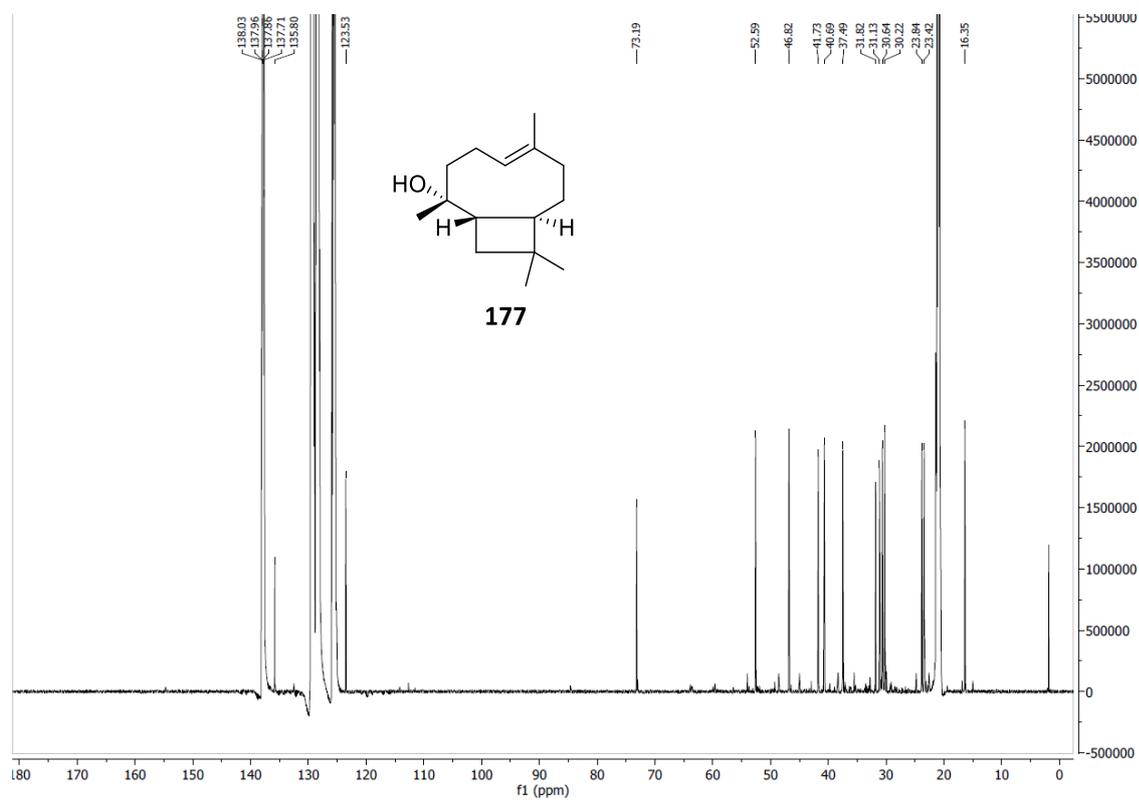
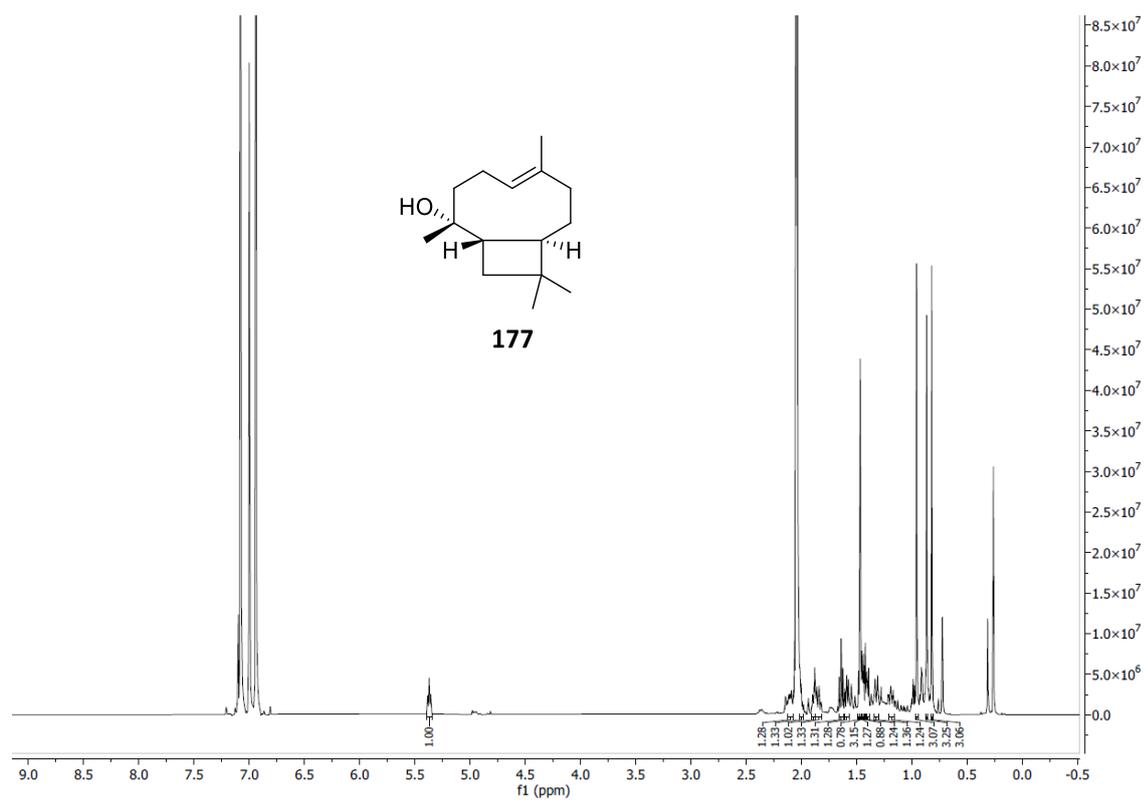


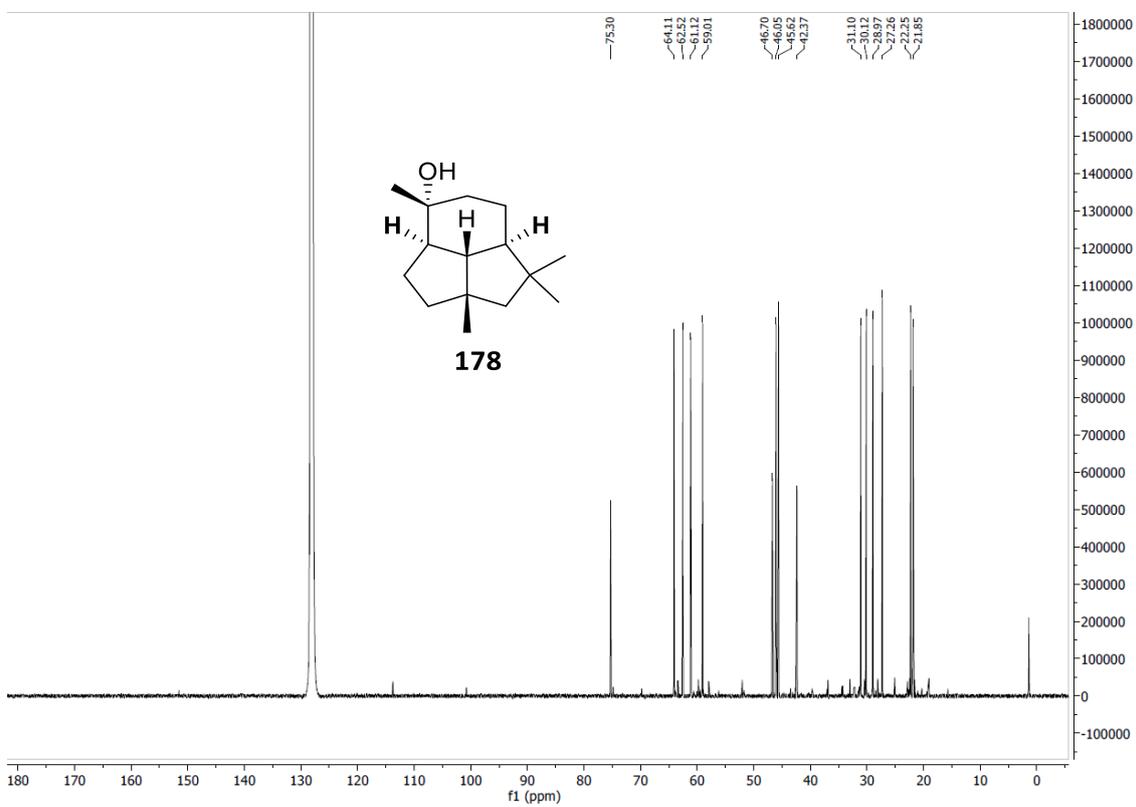
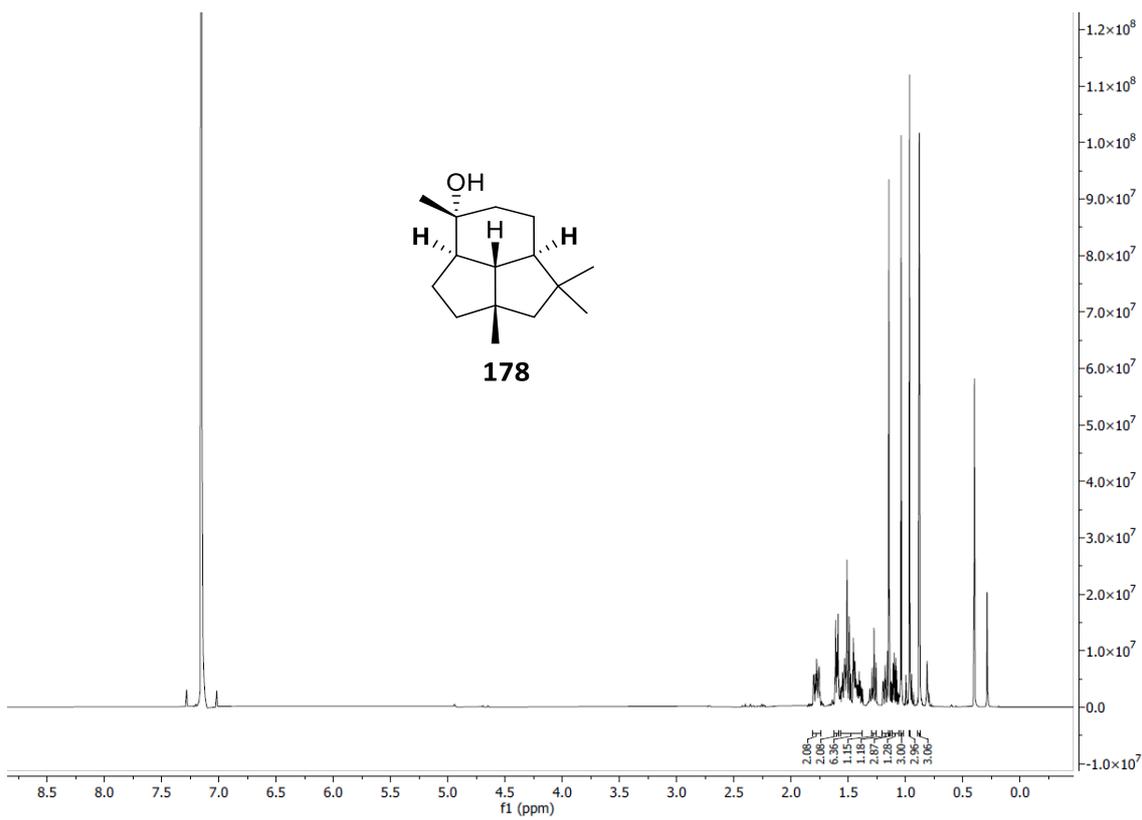
Presilhiperfol-1-en (170)



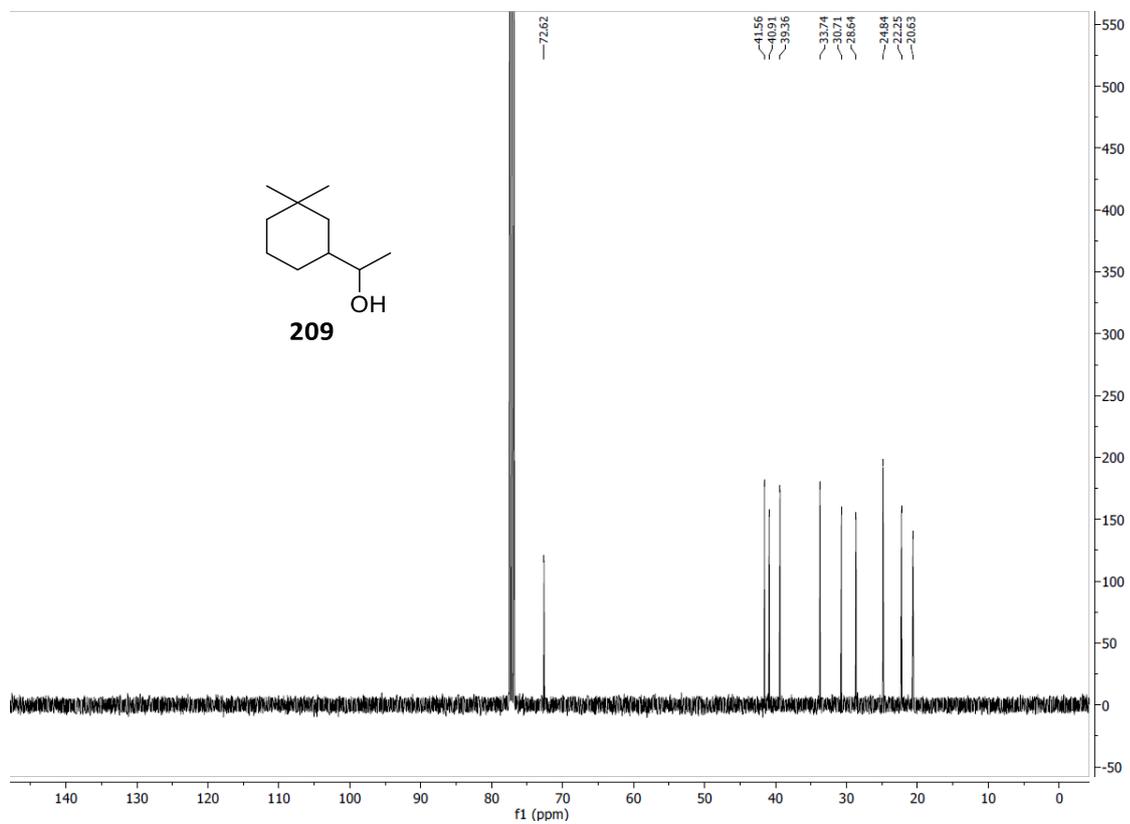
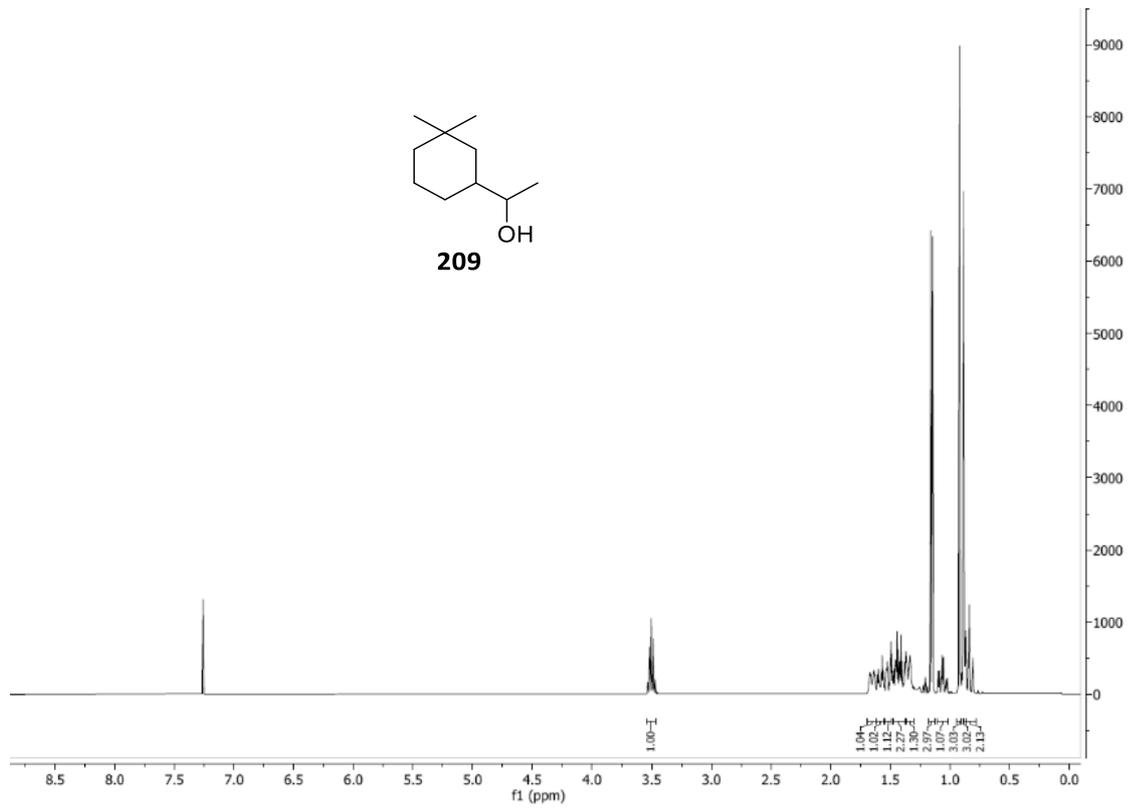
Presilphiperfolan-1 α -ol (176)

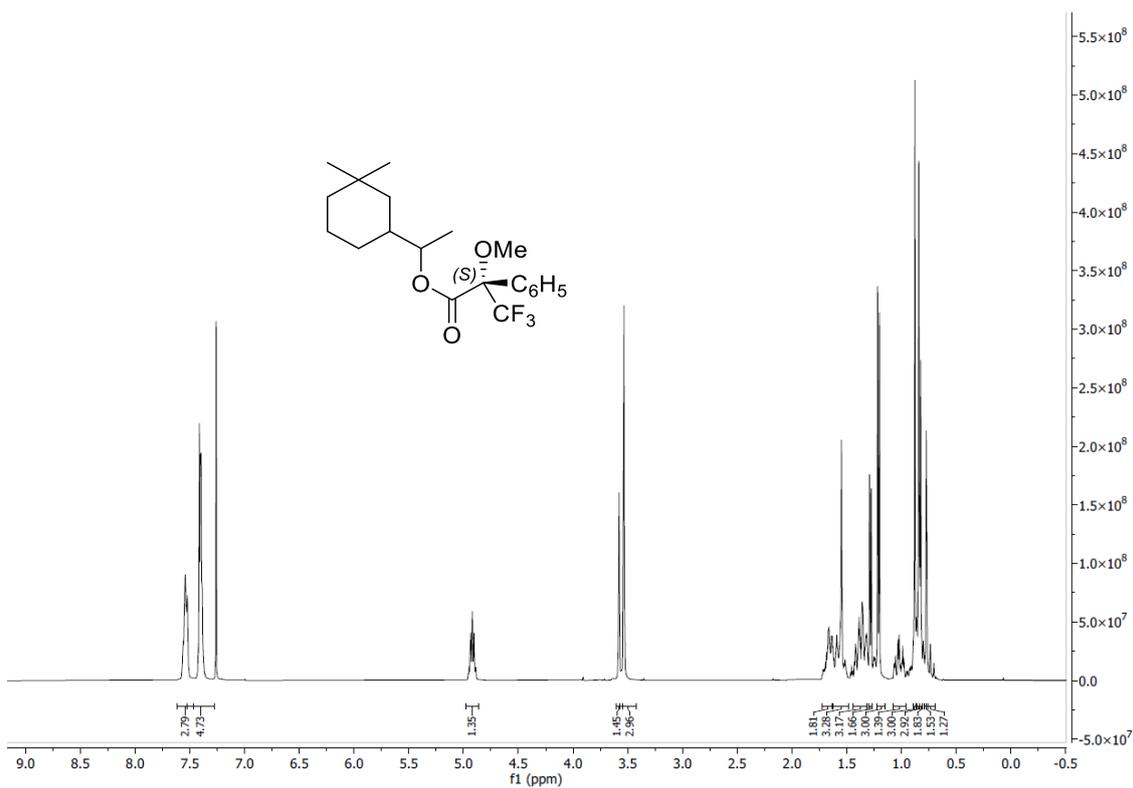
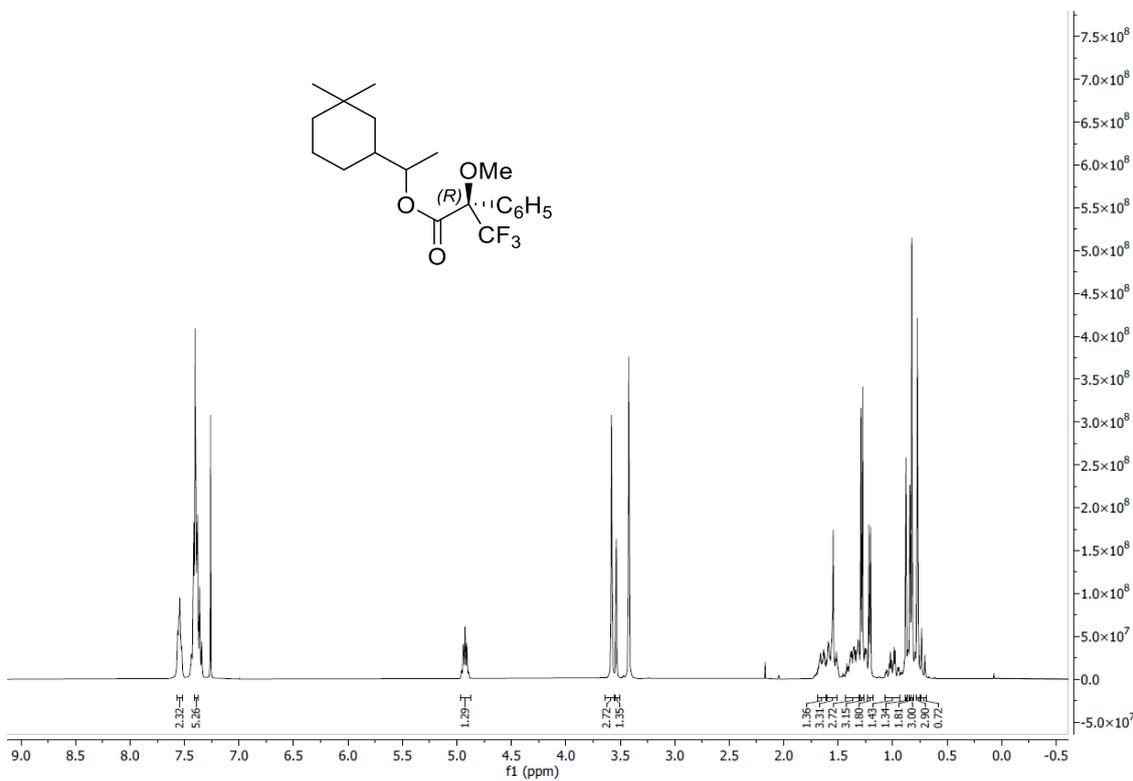


Caryophyllen-8 α -ol (177)

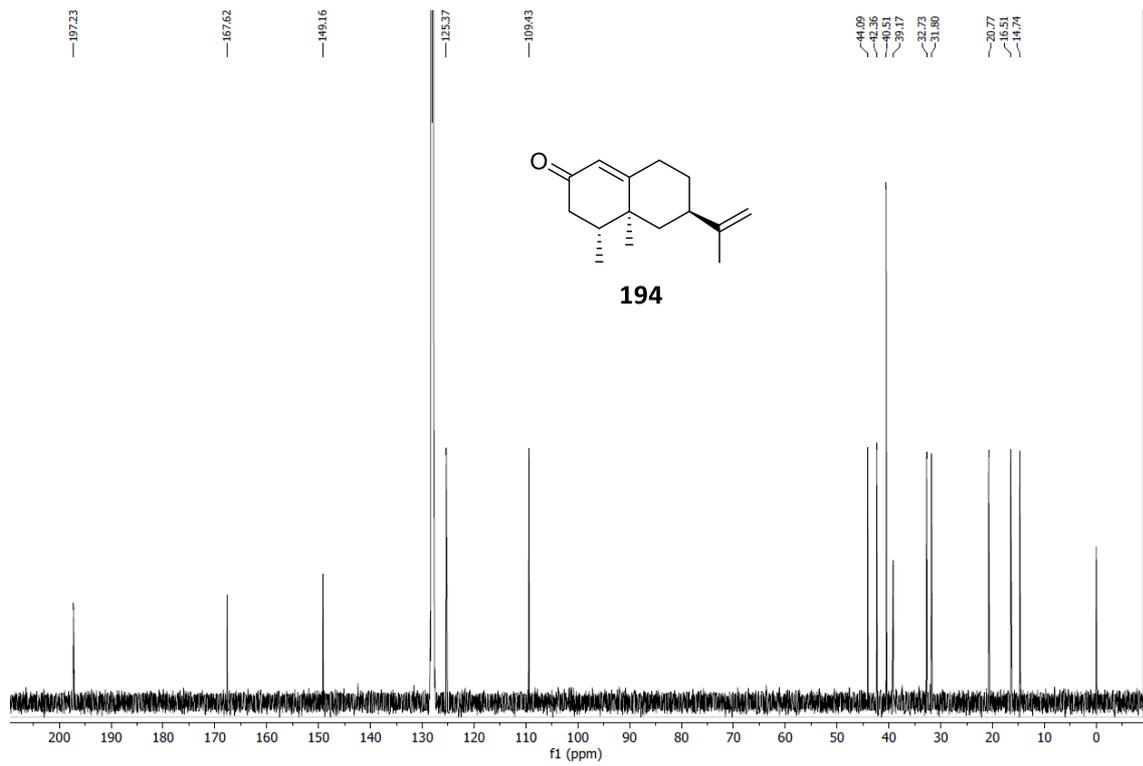
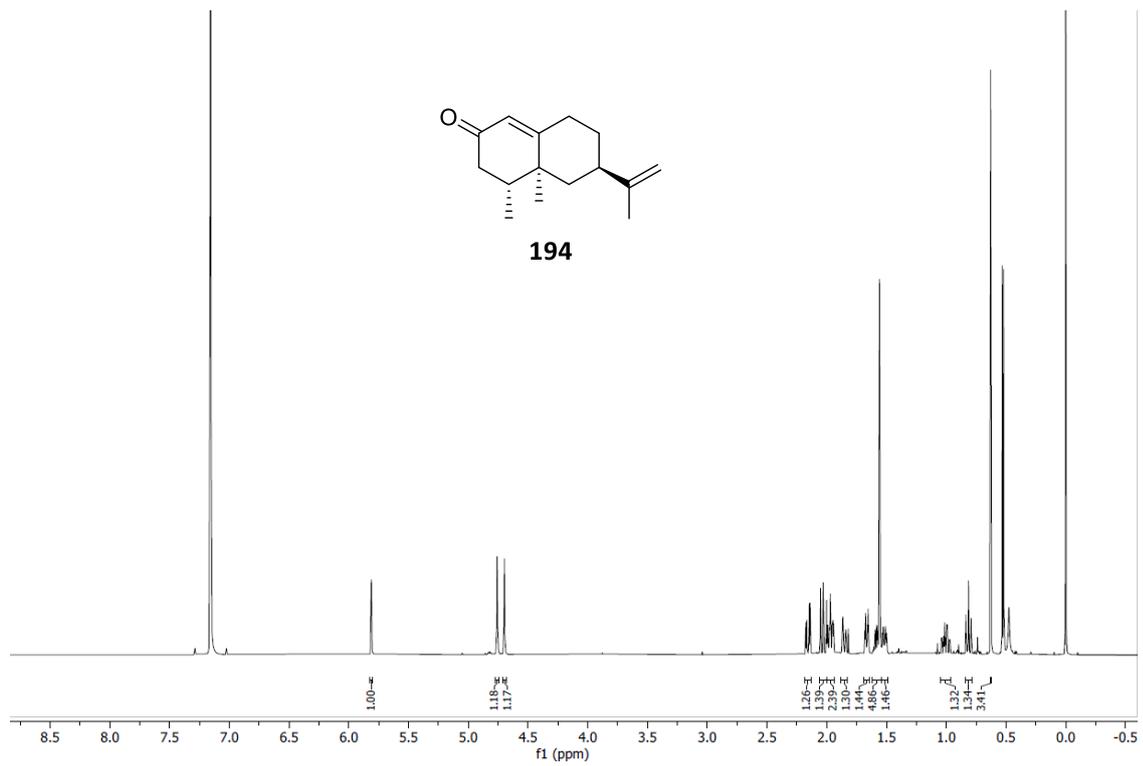
Presilphiperfolan-9 β -ol (178)

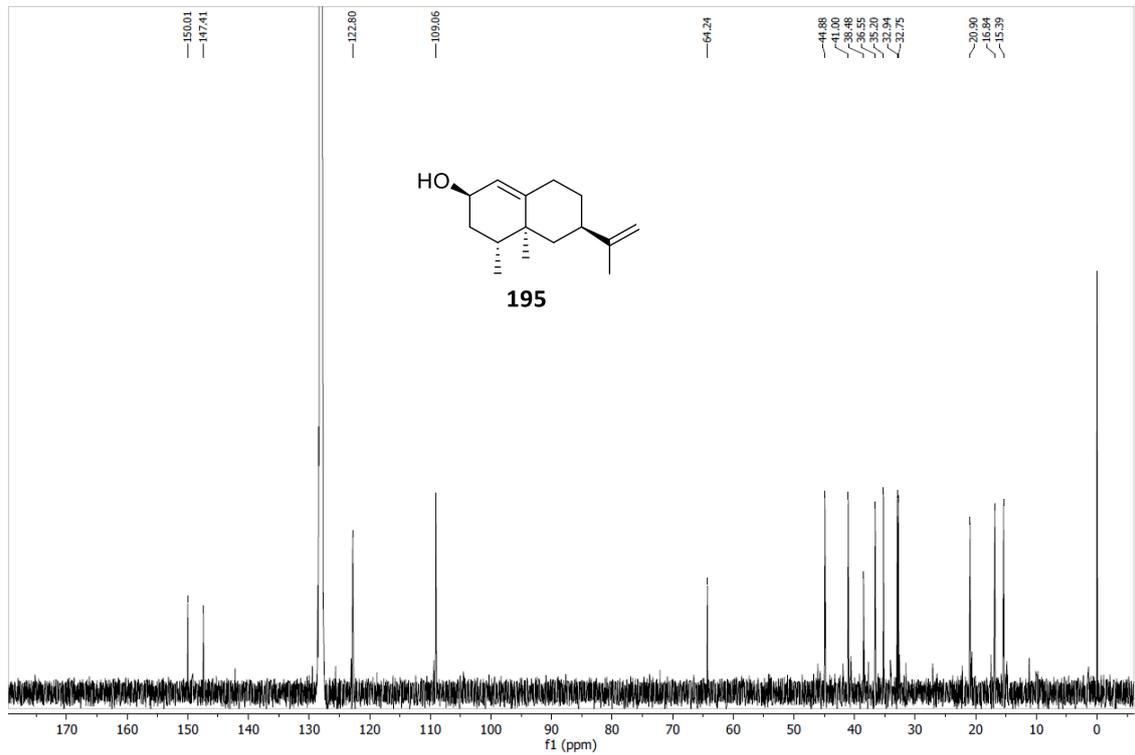
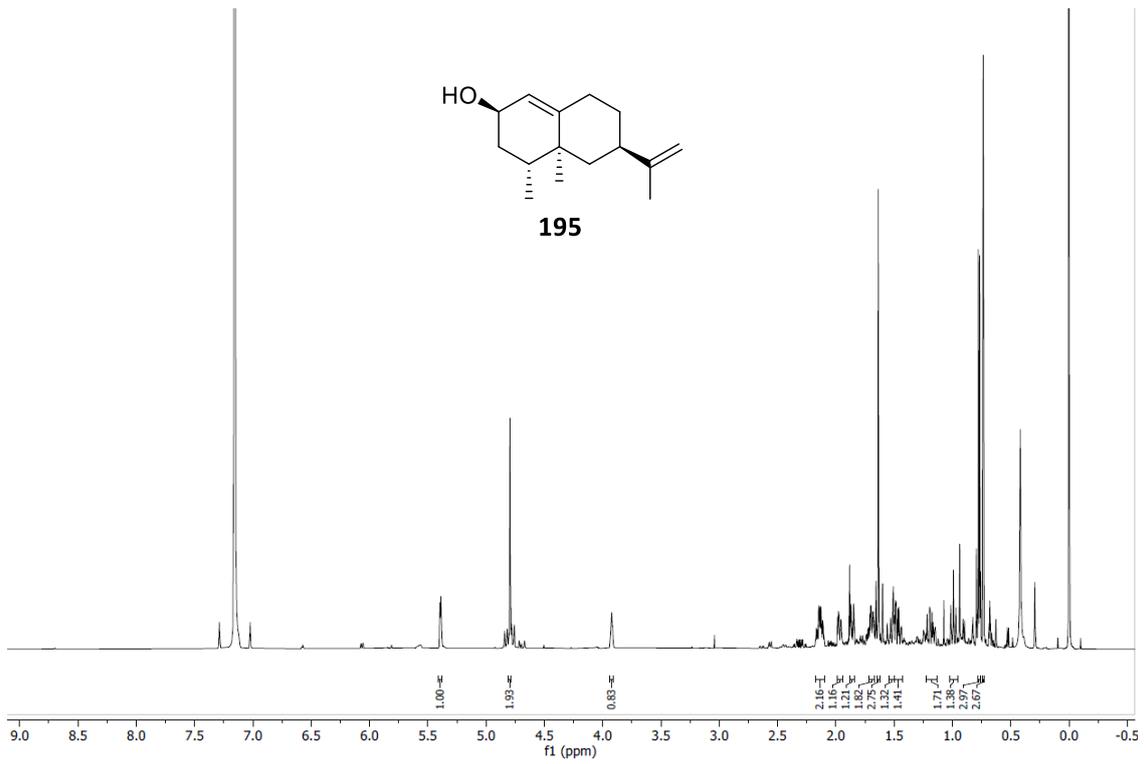
Cyclademol (209)

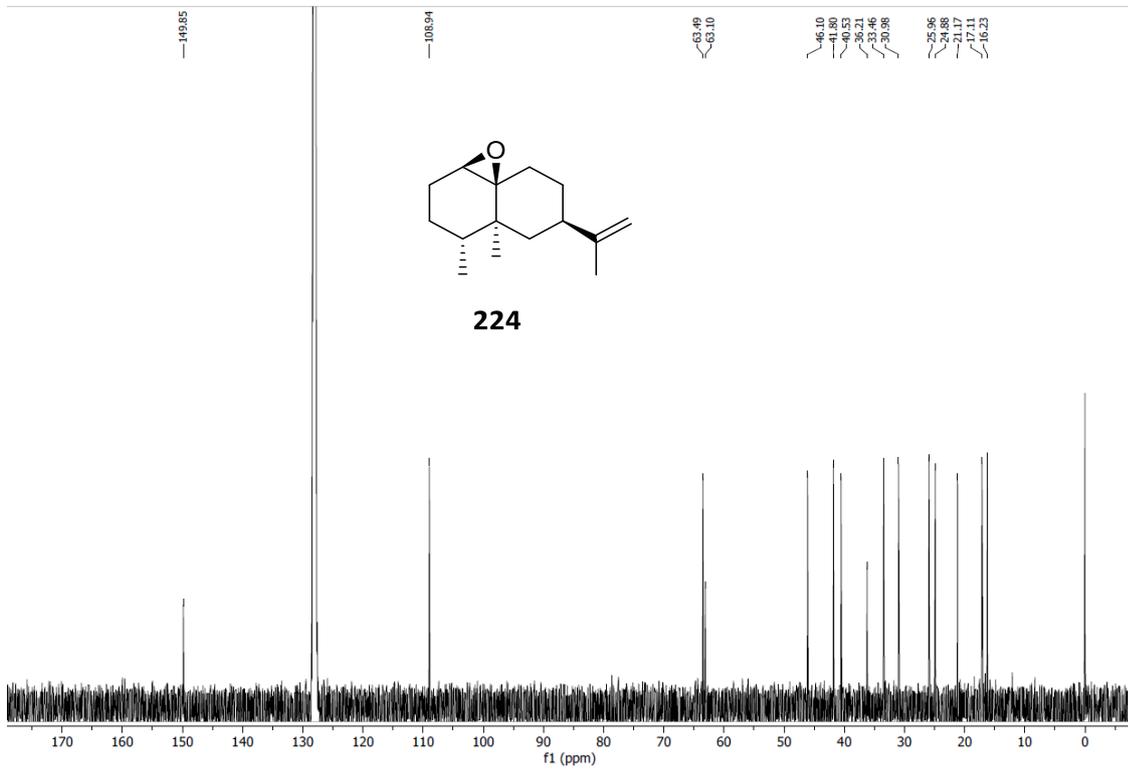
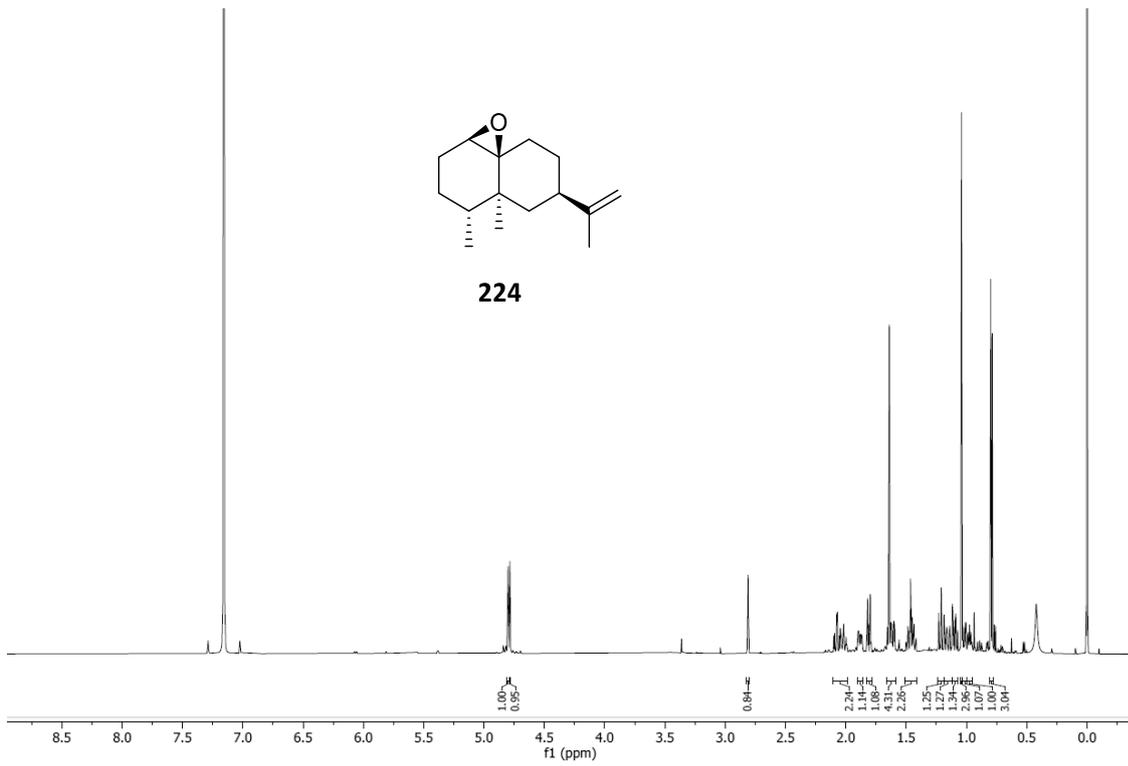


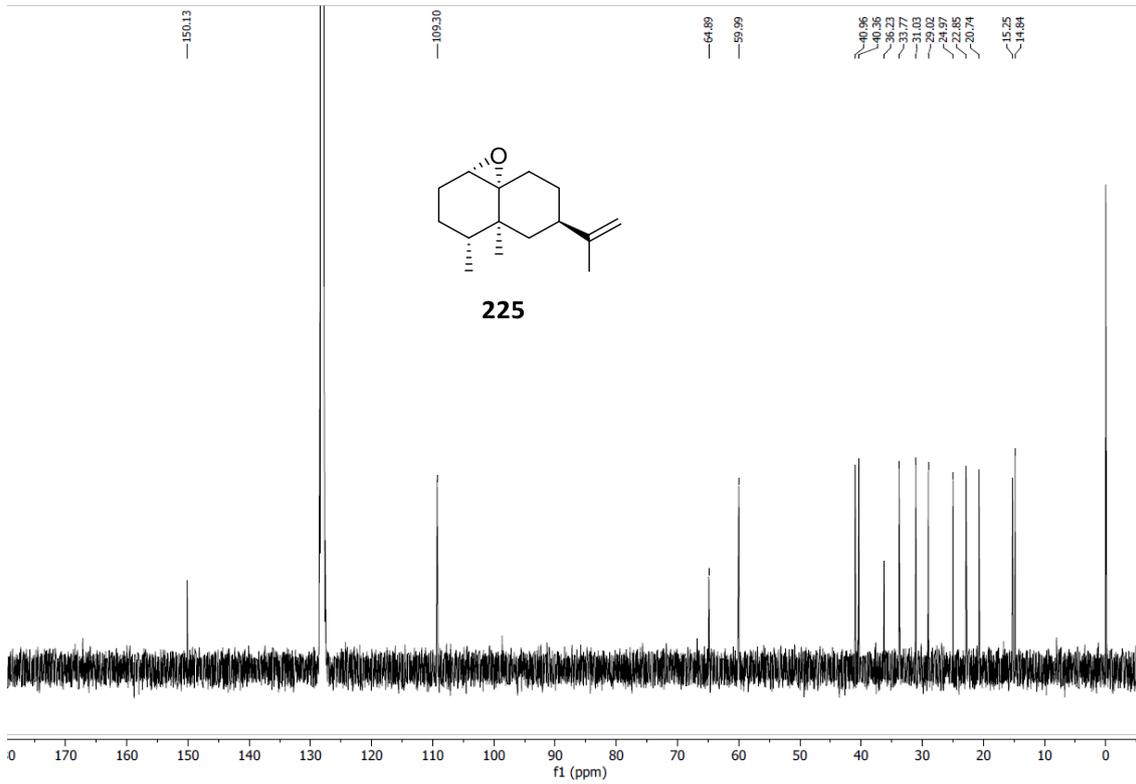
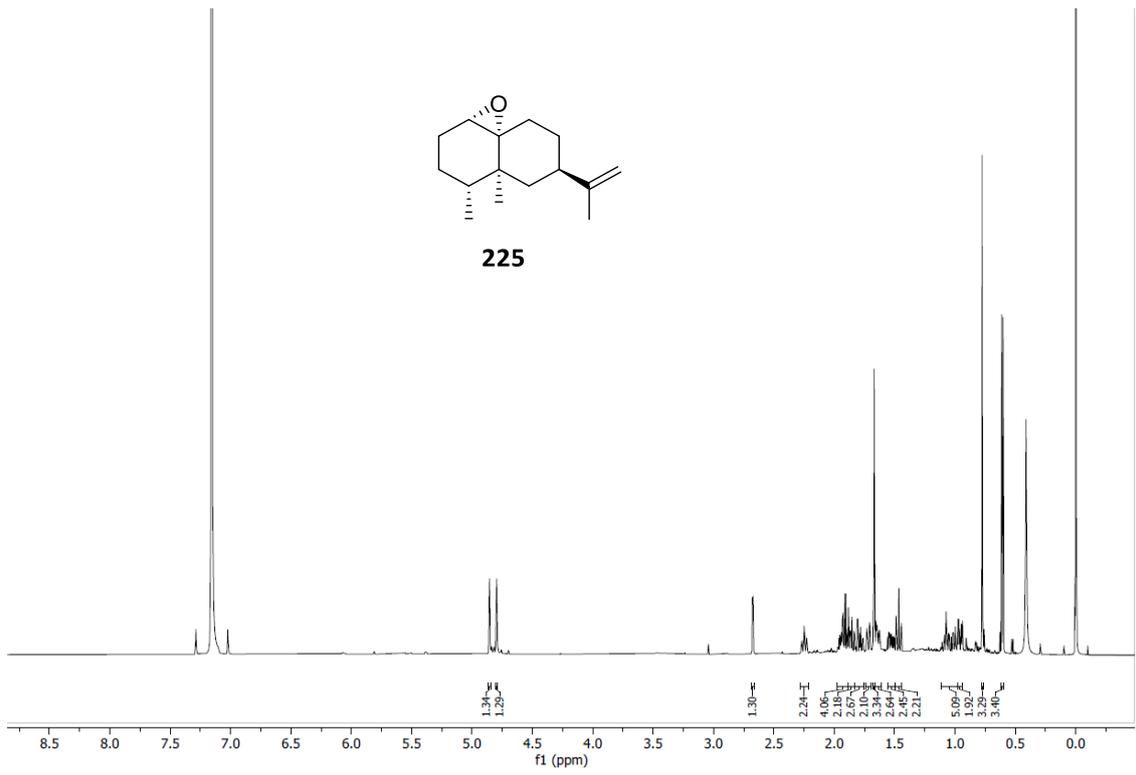
(S)-MTPA-Ester (223)**(R)-MTPA-Ester (223)**

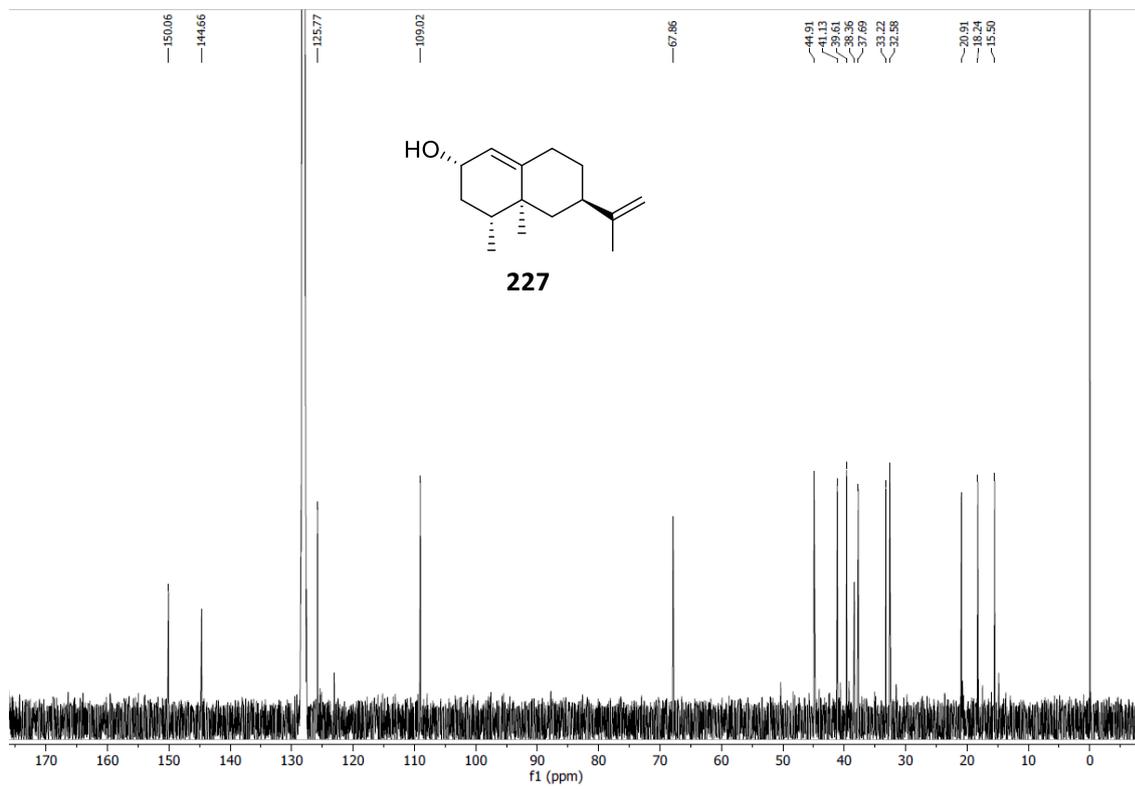
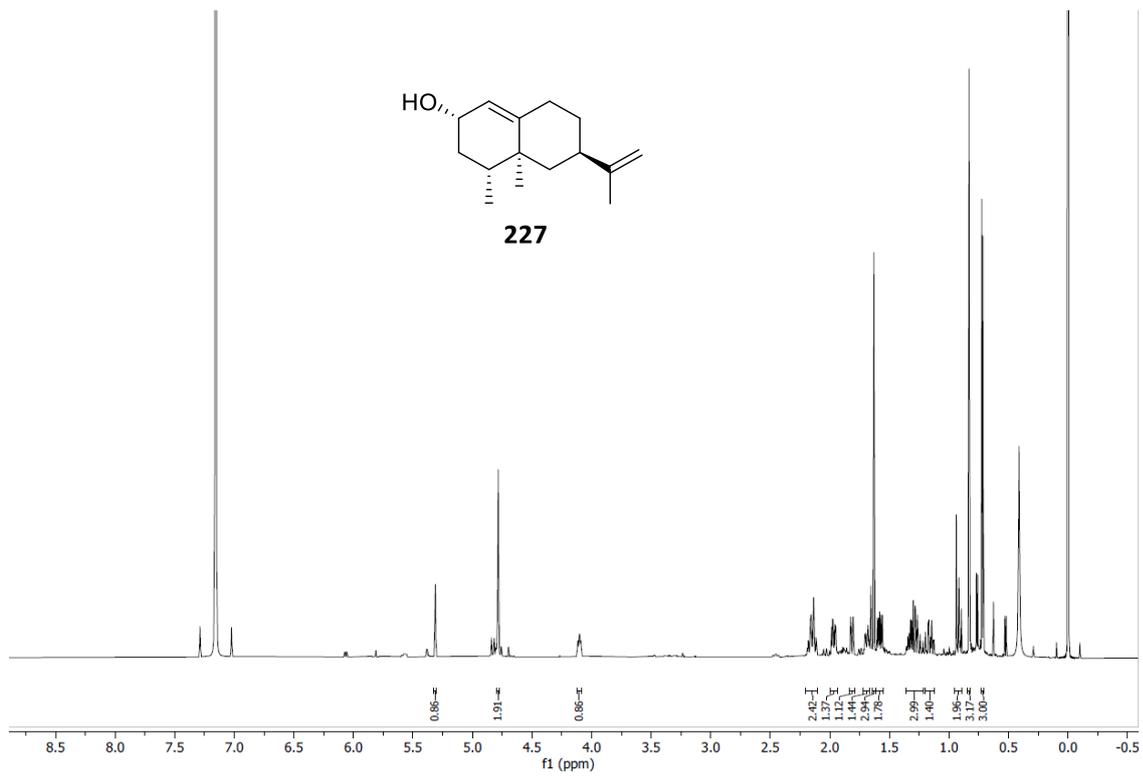
Nootkaton (194)



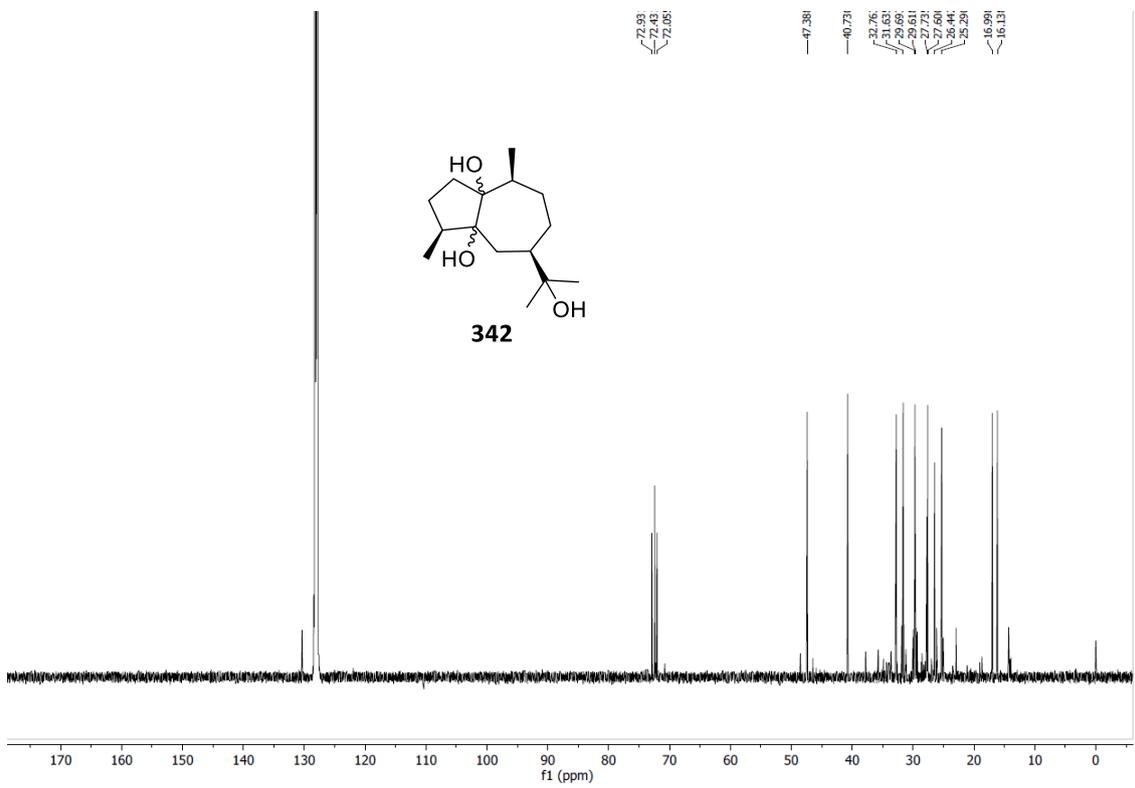
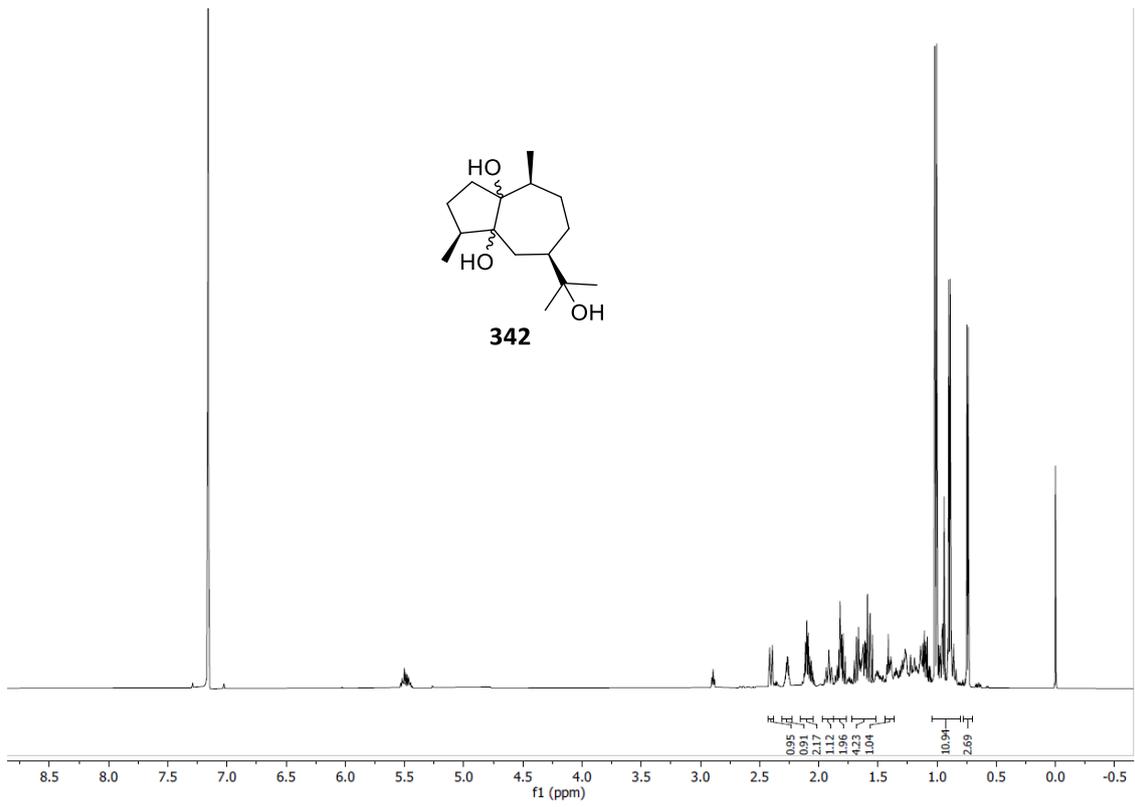
exo-Nootkatol (195)

(+)-cis-Valencenepoxid (224)

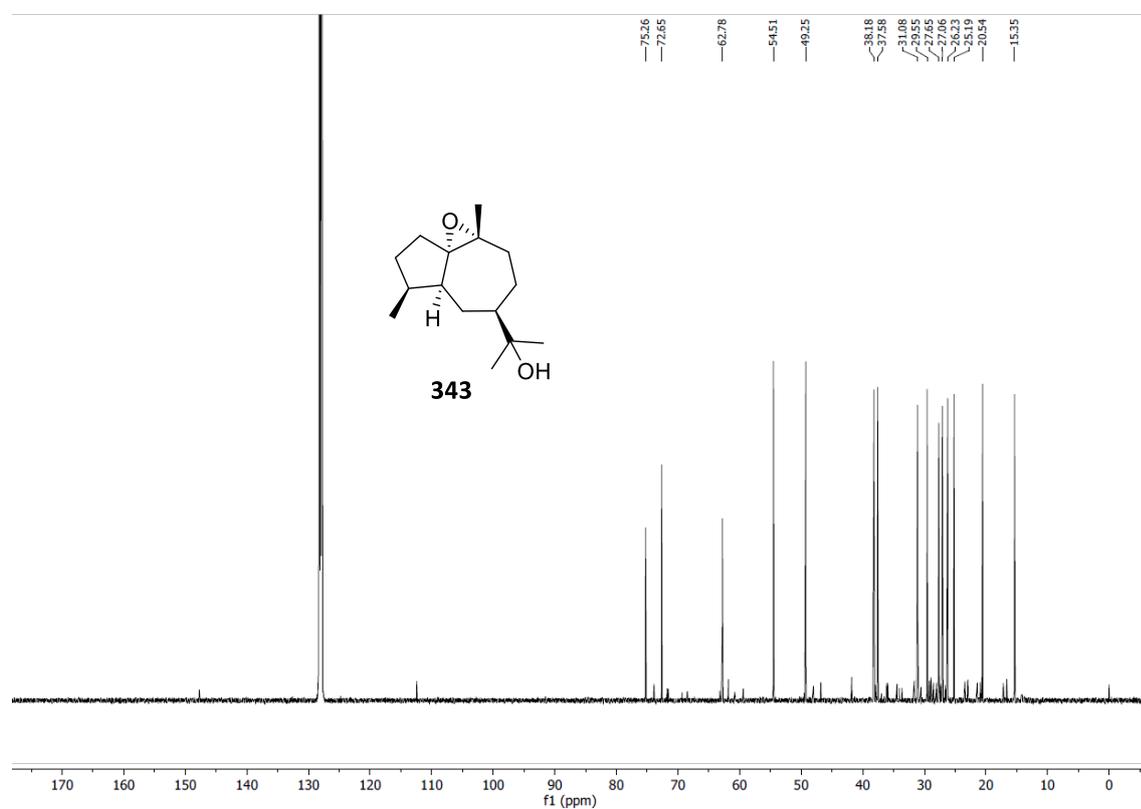
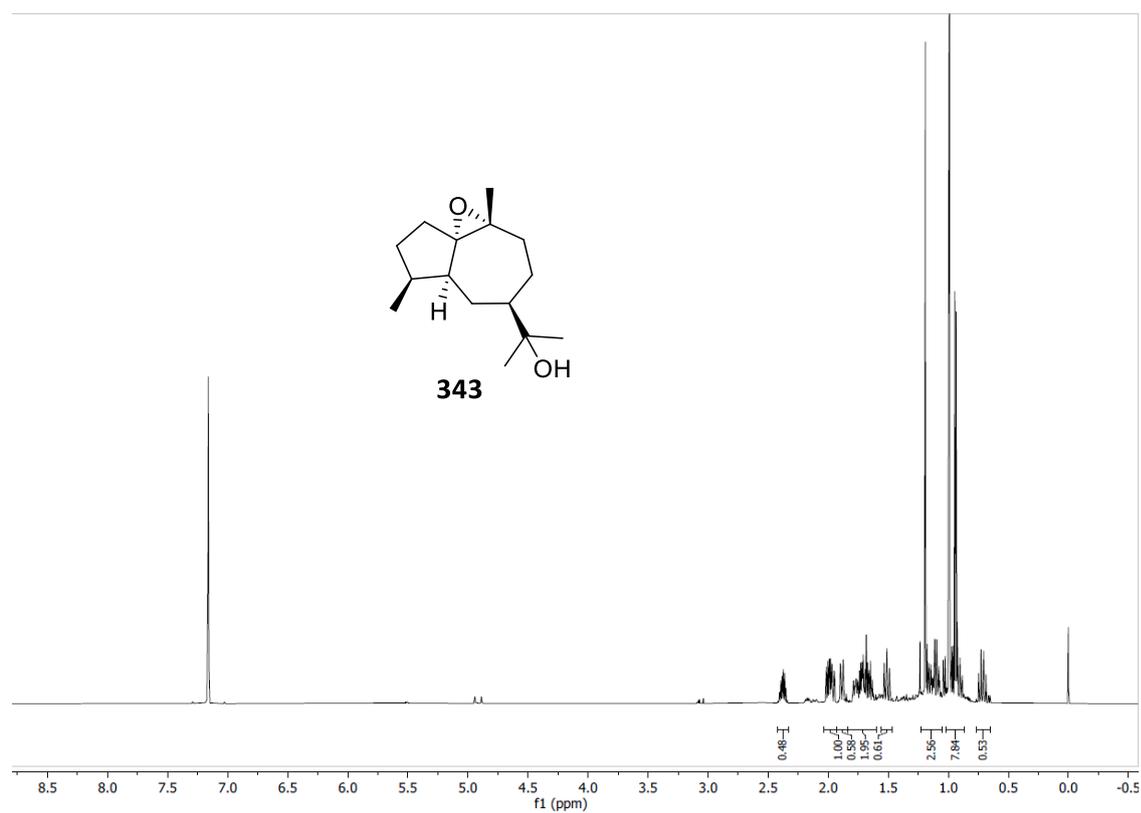
(-)-cis-Valencenepoxid (225)

endo-Nootkatol (227)

Cooxidationsprodukt 342



1,10-Epoxyguaian-11-ol (343)



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kirschning für die Vergabe des interessanten und abwechslungsreichen Themas, für die hilfsbereite und tatkräftige Unterstützung und für die Möglichkeit dieses Projekt nach eigenen Ideen gestalten zu können.

Zudem bedanke ich mich bei apl. Prof. Dr. Sascha Beutel für die freundliche Übernahme des Korreferats. Bei Prof. Dr. Franz Renz möchte ich mich außerdem für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Dr. Edison Díaz, Dr. Isabel Lanfermann und Dr. Johannes Panten danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Dissertation in Kooperation mit der Symrise AG durchführen konnte und für die großartige Betreuung bei allen Fragen rund um mein Promotionsthema. Auch möchte ich mich für das interessante Thema und die Freiheiten bei der Gestaltung der Arbeit bedanken und für die Messungen, die ich jederzeit bei der Symrise AG durchführen durfte.

Bei Dr. Gerald Dräger möchte ich mich herzlich für seine Hilfsbereitschaft bei anfallenden Fragen und Reparaturen rund um die GC-MS Technik sowie bei der Installation der pGC bedanken. Auch für die durchgeführten Kraftfeldberechnungen möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem den Mitarbeiterinnen der analytischen Abteilung Monika Rettstadt, Dagmar Körtje und Anne Schulz für die freundliche Unterstützung bei den Messungen zahlreicher NMR- und Massenproben. Dr. Jörg Fohrer danke ich für die Messungen von Sonderwünschen in kürzester Zeit. Zudem danke ich allen technischen Mitarbeitern des BMWZ, insbesondere Katja Körner, für die Unterstützung bei den Bestellungen und dem Ansetzen und Autoklavieren der Medien. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht so reibungslos verlaufen.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Analytical Research Centers und des Applied Research EAME – Fragrance Analytics der Symrise AG für die großartige Unterstützung bedanken. Besonders möchte ich mich bei Sven Winkler für die olfaktorischen Messungen bedanken und bei Celina Koch für die Bereitstellung der notwendigen Analysengeräte. Beate Hartmann und Stephan Seilwind danke ich für die Unterstützung bei den NMR-Messungen und den anfallenden Auswertungen. Regina Beier möchte ich zudem für die schnelle und zuvorkommende Hilfestellung bei der Isolierung der Verbindungen danken. Auch ein großes Dankeschön an die GC-Abteilung für die chiralen Messungen. Außerdem möchte ich Bodo Schwarze für die quantenmechanischen Berechnungen danken. Rüdiger Wittlake und Stephan Brückner danke ich zudem dafür, dass sie mir den Zugang zu den Analysegeräten ermöglicht haben.

Dr. Clara Oberhauser möchte ich zudem für die ausgezeichnete Vorarbeit auf dem Thema der Sesquiterpensynthesen danken, den fachlichen Austausch und die Übergabe des Projekts. Viktoria Ravkina danke ich für die tolle Einarbeitung auf dem Gebiet der Mutagenese, die anregenden Diskussionen und besonders für die tolle und angenehme Zeit im BMWZ-Labor. Außerdem gilt meiner Laborkollegin Tanja Lau ein besonderer Dank für die tolle Laboratmosphäre, die stetige

Unterstützung und die leckeren Kuchen. Duc Tran und Dr. Janina Meyer gilt mein Dank für ihre Hilfe bei der MOSHER-Ester Analyse. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Katja Seidel, Dr. Benjamin Schröder, Viktoria Ravkina und Duc Tran für die Synthese der unnatürlichen Farnesyldiphosphate.

Für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bei Viktoria Ravkina, Friederike Wesemann, Anica Weller, Julia Schubert, Rebecca Roberg und Alexandra Grupe bedanken. Vielen Dank für die viele Zeit, die ihr investiert habt.

Meinem Bachelorstudenten Marco Albers danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Optimierungen der STC BcBOT2. Mein Dank gilt zudem allen Studenten, die sich im Rahmen ihrer Praktika mit der Synthese der unnatürlichen Derivate beschäftigt haben.

Weiterhin möchte ich dem Sekretariat mit Ines Roloff und Monika Griese für die unkomplizierte Abwicklung bei organisatorischen Fragen danken.

Ich danke außerdem allen ehemaligen und neuen Kollegen des Arbeitskreises Kirschning, die mich die letzten Jahre begleitet haben. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Aktivitäten und unterhaltsamen Pausen. Die Retreats, Doktorfeiern und das gemeinsame Grillen werden mir lange in Erinnerung bleiben.

Zuallerletzt möchte ich mich bei meiner Mutter Martina Eickermann für ihre langjährige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere bedanke ich mich auch bei Andre Nikolaiczkyk, der immer für mich da ist und mir während meiner Promotion mit Verständnis und Rückhalt zur Seite stand.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Nachname Vanessa Harms
 Geburtsdatum/ -ort 17.12.1988, Hameln

BILDUNGSWEG

03.2017 – 05.2021 **Promotion** am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Arbeitskreis Prof. Dr. A. Kirschning
 Titel: „*Biotransformationen natürlicher und unnatürlicher Substrate zur Bildung von Terpenoiden mit olfaktorischen Eigenschaften*“

10.2014 – 11.2016 **Studium M. Sc. Analytik** an der Leibniz Universität Hannover
Masterarbeit bei der Symrise AG, Holzminden

10.2011 – 09.2014 **Studium B. Sc. Chemie** an der Leibniz Universität Hannover

08.2008 – 06.2011 **Ausbildung zur Chemielaborantin** bei der Symrise AG, Holzminden

06.2008 **Abitur** am Otto-Hahn Gymnasium, Springe

PRAKTISCHE ERFAHRUNG

seit 03.2021 **GC/MS-Expertin** Symrise AG – Marktusteranalyse, Holzminden

04.2017 – 12.2020 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** an der Leibniz Universität Hannover

03.2015 – 08.2015 **Wissenschaftliche Hilfskraft** an der Leibniz Universität Hannover

04.2014 – 07.2014 **Wissenschaftliche Hilfskraft** an der Leibniz Universität Hannover

06.2011 – 09.2011 **Chemielaborantin** Symrise AG – Natural Flavor Production, Holzminden

WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

PUBLIKATIONEN

V. Harms, V. Ravkina, A. Kirschning, *Org. Lett.*, **2021**, 23, 3162-3166.

V. Harms, B. Schröder, C. Oberhauser, C. D. Tran, S. Winkler, G. Dräger, A. Kirschning, *Org. Lett.*, **2020**, 22, 4360-4365.

V. Harms, A. Kirschning, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.*, **2020**, 37, 1080-1097.

C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 11802-11806; *Angew. Chem.*, **2018**, 130, 11976-11980.

D. Massai, E. Bolesani, D. R. Diaz, C. Kropp, H. Kempf, C. Halloin, U. Martin, T. Braniste, G. Isu, V. Harms, U. Morbiducci, G. Dräger, R. Zweigerdt, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 3950-3964.

POSTERBEITRÄGE

- 08.2018 **Biocat 2018** - 9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg
- 02.2019 **31. Irseer Naturstofftage**, Irsee
- 08.2019 **Terpnet 2019** – 14th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic
Biology of Isoprenoids, Halle (Saale)
- 02.2020 **19th Leibniz Symposium 2019**, Hannover