

***Biotechnologie lipophiler Substrate in wäßrigen Systemen:  
Terpenttransformationen durch Basidiomyceten als Modell***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

***Lebensmittelchemiker  
Jens Onken***

geboren am 21. Oktober 1968  
in Bremen

**Hannover 1998**

|                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| Referent:                   | Prof. Dr. R. G. Berger     |
| Korreferentin:              | Priv.-Doz. Dr. G. Kretzmer |
| Tag der Promotion:          | 12. Juni 1998              |
| Datum der Veröffentlichung: | Juli 1998                  |

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1995 bis April 1998 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

*Des Menschen Herz erdenkt sich seinen Weg,  
aber der Herr allein lenkt seinen Schritt.*

*(Die Bibel: Sprüche Salomos 16, 9)*

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. G. Berger für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotionsarbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover, für seine stete Gesprächsbereitschaft und Unterstützung, für den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas sowie für die fortwährende Bereitstellung aller zur Durchführung der experimentellen Arbeiten benötigten Mittel und Geräte.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unseres Institutes sage ich ein herzliches „Danke schön!“ für die drei Jahre guter Gemeinschaft.

Dank sage ich außerdem Frau Körtje vom Institut für Organische Chemie der Universität Hannover für die Durchführung der NMR-Messungen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Frau, Iris, daß sie während dieser Arbeit immer fest zu mir gehalten und mich auch in Durststrecken nie alleine gelassen hat.

## Zusammenfassung

Terpententransformationen durch submers kultivierte Basidiomyceten wurden als Modellsystem für die Oxyfunktionalisierung lipophiler Substrate durch Mikroorganismen untersucht. Die Fähigkeit von Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten zur Transformation von Terpenen konnte anhand der  $\alpha$ -Pinen-Transformationen durch 6 und der Citronellol-Transformation durch 19 Basidiomycetenstämme belegt werden. Typisch waren allylische Oxidationsprodukte. Bei der  $\alpha$ -Pinen-Transformation traten trans-Verbenol, Myrtenol und Verbenon als Hauptprodukte auf. Bei den Transformationen von  $\beta$ -Pinen durch *Pleurotus sapidus* waren es trans-Pinocarveol, Myrtenol und 3-Pinanon und bei Limonen cis/trans-Carveol und Carvon. Bei der Citronelloltransformation wurden ebenfalls allylische Hydroxylierungen zu 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol, 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol und 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol beobachtet. Die effektivste Transformation wurde jedoch mit *Cystoderma carcharias* durch Epoxidierung des Citronellols und Hydrolyse zum schwerflüchtigen 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol erreicht. Das Produktspektrum der untersuchten Transformationen (Allylalkohole, Epoxide) und auch die Inhibierung der Citronellol-Transformation bei *C. carcharias* durch Cytochrom-P450-Inhibitoren (Proadifen, SKF 525-A) deuteten auf eine Beteiligung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen an den Terpententransformationen hin.

Die Variation der Umgebungsbedingungen (Medienzusammensetzung, Licht, pH-Wert) führte weder bei den Kohlenwasserstoff-Transformationen durch *P. sapidus* noch bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* zu einer signifikanten Verbesserung der Transformationsleistung.

Die eingesetzten Terpensubstrate hatten eine toxische Wirkung auf die Basidiomyceten, die aufgrund der Membranschädigung zu Trockenmasseverlusten führte. Ein vollständiger Umsatz des Substrates konnte bei Citronellol durch eine Verringerung der zudosierten Substratmenge erreicht werden (Triol: max. 86% Umsatz, bis zu 866 mg L<sup>-1</sup>). Bei Limonen wurde durch eine Substratdosierung über die Gasphase eine deutliche Verbesserung der Transformationsleistung erzielt (Produktkonzentration: ca. 100 mg L<sup>-1</sup>).

Bei der Limonen-Transformation durch *P. sapidus* führte auch der Zusatz geringer Substratmengen zu den Vorkulturen (Adaption) zu einer verbesserten Transformation, wahrscheinlich bedingt durch eine Induktion der beteiligten Enzyme. Bei  $\alpha$ -Pinen zeigten 5 Pilzstämme in ähnlichen Versuchen indifferentes Adaptionsverhalten und beim Citronellol war die Transformation durch *C. carcharias* auch ohne vorherige Adaption sehr effektiv.

Verschiedene Arten der Zugabe des Terpensubstrates wurden untersucht. Ziel war es, die schwer wasserlöslichen Substrate für die in der wässrigen Phase vorliegenden Pilzzellen besser verfügbar zu machen und nach Möglichkeit außerdem die Membrantoxizität zu vermindern. Bei der Untersuchung *organisch-wässriger Zweiphasensysteme* wurde das Substrat ( $\alpha$ -Pinen) den Submerskulturen gelöst in dünnflüssigem Paraffinöl bzw. dem mittelkettigen Triacylglycerol Miglyol<sup>®</sup> 812S zugesetzt. Dies führte zu einer verminderten Substrattoxizität aufgrund der bevorzugten Löslichkeit in der organischen Phase. Toxische Wirkungen der beiden untersuchten organischen Phasen traten nicht auf; allerdings wurden in den Zweiphasensystemen auch deutlich schlechtere Transformationsergebnisse im Vergleich zur direkten Substratdosierung oder zur Gasphasendosierung erzielt.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim Einschluß des  $\alpha$ -Pinens in *Liposomen* aus Ei- bzw. Sojaphosphatidylcholin erhalten: Sowohl durch Metabolisierung der Phospholipide selbst als auch durch eine aufgrund des Substrateinschlusses verminderte Toxizität trat ein verbessertes Wachstum auf, das aber auch hier mit einer geringeren Produktbildung einherging.

Die Emulgierung des  $\alpha$ -Pinens mit verschiedenen *nichtionischen Tensiden* (Tween 65, Tween 80, Span 20, Brij 35, Triton X-100) führte aufgrund der besseren Verfügbarkeit in den meisten Fällen zu einer Erhöhung der Terpentoxizität und zu einer Abnahme der Transformationsleistung.

Die Durchführung der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* im Bioreaktor führte bei der Belüftung mit einem hydrophoben, mikroporösen Membranschlauch zu einer guten Produktbildung. Eine direkte Belüftung ergab dagegen eine unzureichende Sauerstoffversorgung der Kultur.

Schlagworte: *Pilze, Terpene, Biotransformation*

## **Abstract**

Terpene biotransformations by submerged cultured basidiomycetes were investigated as model systems for the oxyfunctionalization of lipophilic substrates by microorganisms. The ability of fungi of the class of basidiomycetes to transform terpenes was shown with 6 strains for  $\alpha$ -pinene and with 19 strains for citronellol. Allylic oxidation products were typically identified. The  $\alpha$ -pinene transformation led to the main products trans-verbenol, myrtenol and verbenone. *Pleurotus sapidus* transformed  $\beta$ -pinene to trans-pinocarveol, myrtenol and 3-pinane and limonene to cis/trans-carveol and carvone.

Using citronellol as a substrate allylic hydroxylations yielded 3,7-dimethyl-5-octene-1,7-diol, 3,7-dimethyl-7-octene-1,6-diol and 2,6-dimethyl-2-octene-1,8-diol. The most effective transformation was achieved with *Cystoderma carcharias* by epoxidation of citronellol and subsequent hydrolysis to 3,7-dimethyl-1,6,7-octanetriol. The product spectrum of the transformations (allylic alcohols, epoxides) and the inhibition by two cytochrome-P450-inhibitors (Proadifen, SKF 525-A) pointed to the participation of cytochrome-P450-monooxygenases in the terpene biotransformations.

Neither the hydrocarbon transformations by *P. sapidus* nor the citronellol transformation by *C. carcharias* were improved by a variation of the environmental conditions (constitution of nutrient media, light, pH)

The terpene substrates showed toxic effects on the basidiomycetes causing membrane damages and a decrease of dry matter. Complete conversion of citronellol was achieved by decreasing the substrate concentration (triol: 86% max. yield, max. conc. 866 mg L<sup>-1</sup>).

For limonene a substrate dosage via the gas phase improved the transformation (product concentration ca. 100 mg L<sup>-1</sup>).

An adaptation of the precultures to small amounts of the substrate improved the performance of *P. sapidus* to transform limonene, possibly due to induction of enzymes. In

---

similar experiments with  $\alpha$ -pinene, 5 fungal strains showed indifferent behaviour, and for citronellol the transformation was very effective even without preliminary adaptation.

Different modes of substrate addition were examined to solve the problem of poor water solubility of the substrates, to improve the availability to the cells, and to minimize membrane toxicity.

In *aqueous-organic two-phase systems* the substrate ( $\alpha$ -pinene) was dissolved in paraffin oil and medium chain triacylglycerol Miglyol<sup>®</sup> 812S, respectively, and added to the cultures. This led to a decreased substrate toxicity due to the better solubility in the organic phase. Toxic effects of the organic solvents used were not observed. Nevertheless, the transformation performance in the two-phase systems was much lower compared to the direct or gas phase addition of the substrate.

Similar results were obtained, when the  $\alpha$ -pinene was included into *liposomes* made of egg- and soy-phosphatidylcholine, respectively: The metabolism of the phospholipids and the decreased toxicity caused by the inclusion of the substrate, improved the growth of the cultures, but product formation was low.

The emulsification of the substrate with several *nonionic detergents* (Tween 65, Tween 80, Span 20, Brij 35, Triton X-100) in most cases increased the terpene toxicity and decreased the product formation.

The biotransformation of citronellol in a bioreactor was successful, when aeration was performed with a hydrophobic microporous membrane tube. Direct aeration led to an insufficient oxygen supply of the culture.

Keywords: *fungi, terpenes, biotransformation*

---

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b> |
| 1.1      | Problemstellung   | 5        |
| <b>2</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>6</b> |
| 2.1      | <b>Biotransformationen von Monoterpenkohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten</b>   | <b>6</b> |
| 2.1.1    | Vergleich der $\alpha$ -Pinen-Transformationsleistungen verschiedener Basidiomyceten  | 6        |
| 2.1.2    | Limonen- und $\beta$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>  | 8        |
| 2.1.3    | Enantiomerenverteilung der Limonen-Transformationsprodukte  | 10       |
| 2.1.4    | Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel bei den $\alpha$ -Pinen- und Limonen-Transformationen durch <i>P. sapidus</i> | 12       |
| 2.1.4.1  | $\alpha$ -Pinen-Verteilung nach direkter Substratdosierung  | 12       |
| 2.1.4.2  | Limonen-Verteilung nach Substratzugabe über die Gasphase  | 15       |
| 2.1.5    | Untersuchung der Kulturen von <i>P. sapidus</i> auf weitere Metabolisierung der primären Transformationsprodukte                  | 18       |
| 2.1.6    | Untersuchung von Terpenblindwerten  | 19       |
| 2.1.6.1  | Substratreinheit  | 19       |
| 2.1.6.2  | pH-Wert-Abhängigkeit der Blindwerte in Standardnährlösung   | 20       |
| 2.1.6.3  | Einfluß des Pilzmyzels auf die Blindwertentwicklung   | 23       |
| 2.1.6.4  | Produktverluste im Verlauf der Inkubation   | 27       |
| 2.1.7    | Substrat- und Produkttoxizität von Terpenkohlenwasserstoffen, -alkoholen und -ketonen   | 29       |
| 2.1.7.1  | Substrattoxizität   | 29       |
| 2.1.7.2  | Toxizität der $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte   | 34       |
| 2.1.7.3  | Produkttoxizität der Limonentransformationsprodukte   | 36       |
| 2.1.8    | Variation der Kulturbedingungen zur Verbesserung der Transformationsleistung  | 38       |
| 2.1.8.1  | Plackett-Burman-Design zur Identifizierung von Medienbestandteilen  |          |

---

|   |           |
|---|-----------|
| mit Einfluß auf die Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>  | 38        |
| 2.1.8.2 Lichteinfluß  | 47        |
| 2.1.8.3 pH-Wert   | 51        |
| 2.1.9 Versuche zur Optimierung der Substratverfügbarkeit zur Erhöhung der Transformationsleistung                                 | 53        |
| 2.1.9.1 Optimierung der Terpen-Zugabe   | 53        |
| 2.1.9.1.1 Variation der zudosierten Substratmengen  | 53        |
| 2.1.9.1.2 Variation des Zeitpunktes der Substratzugabe  | 56        |
| 2.1.9.1.3 Substratzugabe über die Gasphase des Kulturkolbens  | 58        |
| 2.1.9.1.4 Substratzugabe durch organisch-wäßrige Zweiphasensysteme  | 61        |
| 2.1.9.1.5 Verbesserung der Substratverfügbarkeit durch Zusatz nichtionischer Tenside  | 64        |
| 2.1.9.1.6 Substratzugabe in liposomaler Lösung  | 70        |
| 2.1.9.2 Optimierung der Sauerstoffversorgung  | 75        |
| 2.1.10 Langzeitverhalten von Basidiomyceten bei Kultivierung in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen                           | 77        |
| 2.1.10.1 Adaptionsverhalten verschiedener Basidiomyceten in Gegenwart von $\alpha$ -Pinen   | 77        |
| 2.1.10.2 Adaptionsverhalten von <i>P. sapidus</i> in Gegenwart von Limonen  | 86        |
| 2.1.11 Möglichkeiten zur Produktgewinnung und Substratzuführung mit Hohlfasermembranmodulen                                       | 90        |
| <b>2.2 Biotransformation des Monoterpenalkohols Citronellol durch Pilze</b>   | <b>92</b> |
| 2.2.1 Screening der Citronellol-Transformationsleistung von 21 Pilzstämmen  | 92        |
| 2.2.1.1 Auswahl der Stämme und Screening  | 92        |
| 2.2.1.2 Identifizierung der Transformationsprodukte   | 94        |
| 2.2.1.2.1 $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie   | 96        |
| 2.2.1.2.2 GC-MS   | 100       |
| 2.2.1.2.3 Produktmengen der Citronellol-Transformation  | 106       |
| 2.2.1.2.4 Untersuchung der Kulturen von <i>C. carcharias</i> auf saure und nichtflüchtige Citronellol-Transformationsprodukte     | 108       |
| 2.2.2 Untersuchung der nichtenzymatischen Reaktionen von Citronellol und seinen Transformationsprodukten in wäßrigen Kulturmedien | 110       |



---

|  |            |
|--|------------|
| 2.2.3 Zeitlicher Verlauf der Biotransformation bei <i>Cystoderma carcharias</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>                                   | 115        |
| 2.2.3.1 Direkte Citronelloldosierung   | 115        |
| 2.2.3.2 Citronelloldosierung über die Gasphase   | 116        |
| 2.2.4 Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel bei der Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>                        | 119        |
| 2.2.5 Variation der Kulturbedingungen bei der Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>  | 120        |
| 2.2.5.1 Plackett-Burman-Design zur Identifizierung von Medienbestandteilen mit Einfluß auf die Transformationsleistung und das Produktspektrum | 121        |
| 2.2.5.2 Transformation bei verschiedenen Calciumkonzentrationen  | 127        |
| 2.2.5.3 Durchführung der Biotransformation in Transformationsmedien  | 128        |
| 2.2.5.4 Lichteinfluß   | 132        |
| 2.2.5.5 Zusatz von Cytochrom-P 450-Monooxygenase-Inhibitoren   | 133        |
| 2.2.5.6 Zusatz eines Epoxid-Hydrolase-Inhibitors   | 134        |
| 2.2.5.7 Beeinflussung der Transformationsleistung durch Substratadaption der Vorkulturen   | 135        |
| 2.2.5.8 Abhängigkeit der Transformationsleistung von der eingesetzten Substratmenge  | 136        |
| 2.2.5.9 Variation der Zeitpunkte der Substratzugabe  | 139        |
| 2.2.6 Citronellol-Transformationen im Bioreaktor   | 141        |
| 2.2.6.1 Direkte Belüftung des Reaktors   | 141        |
| 2.2.6.2 Belüftung durch einen hydrophoben Kapillarmembranschlauch  | 142        |
| 2.2.7 Vergleich der Citronellol-Transformation durch <i>Cystoderma carcharias</i> mit den Transformationen von $\alpha$ -Pinen und Limonen     | 147        |
| <b>3 DISKUSSION</b>  | <b>150</b> |
| <b>3.1 Terpenoide: Aromastoffe und Aromastoffvorstufen</b>   | <b>150</b> |
| 3.1.1 Bedeutung von Terpenoiden als Duft- und Aromastoffe  | 150        |
| 3.1.2 Bedeutung von Terpenoiden bei höheren Pilzen   | 155        |
| 3.1.2.1 Biosynthese von Terpenoiden durch höhere Pilzen  | 155        |
| 3.1.2.2 Bedeutung von Basidiomyceten bei der Bildung terpenoider Pheromone   | 160        |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.2 Terpenttransformationen durch Mikroorganismen</b>   | <b>161</b> |
| 3.2.1 Terpene als Substrate für Biotransformationen  | 161        |
| 3.2.2 Systematik mikrobieller Terpenttransformationen  | 162        |
| 3.2.2.1 Allylische Hydroxylierungen  | 162        |
| 3.2.2.1.1 Allylische Hydroxylierungen von Monoterpenkohlenwasserstoffen                            | 163        |
| 3.2.2.1.2 Allylische Hydroxylierungen von Monoterpenalkoholen                                      | 169        |
| 3.2.2.2 Hydroxylierung an nicht-aktivierten C-Atomen   | 171        |
| 3.2.2.3 Epoxidierungen von Doppelbindungen und ihre Folgereaktionen                                | 172        |
| 3.2.2.4 Oxidation von primären und sekundären Monoterpenalkoholen zu Aldehyden und Ketonen         | 174        |
| 3.2.2.5 Oxidation von Monoterpenaldehyden und -ketonen zu Carbonsäuren und weitere Mineralisierung | 174        |
| 3.2.2.6 Baeyer-Villiger-Oxidationen  | 175        |
| 3.2.2.7 Hydratisierungen von Doppelbindungen und Ringbrücken                                       | 176        |
| 3.2.2.8 Veretherungen  | 178        |
| 3.2.3 Enantioselektivität von Terpenbiotransformationen  | 178        |
| 3.2.4 Problematik der Terpenbiotransformationen  | 181        |
| 3.2.4.1 Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit   | 181        |
| 3.2.4.2 Reaktionen von Terpenen in wäßrigen Lösungen und Substratblindwerte                        | 183        |
| 3.2.4.3 Terpentoxizität in Mikroorganismen   | 185        |
| 3.2.4.3.1 Die toxische Wirkung von Terpenen  | 185        |
| 3.2.4.3.2 Substrattoxizität  | 188        |
| 3.2.4.3.3 Produkttoxizität   | 191        |
| 3.2.5 Enzyme der oxidativen Metabolisierung von Terpenen   | 191        |
| 3.2.5.1 Beteiligte oxidierende Enzyme  | 191        |
| 3.2.5.2 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen  | 193        |
| 3.2.5.3 Andere Monooxygenasen  | 195        |
| 3.2.5.4 Peroxidasen  | 196        |
| 3.2.5.5 Der oxidative Metabolismus bei Pilzen  | 196        |
| 3.2.5.6 Nichtoxidative fremdstoffmetabolisierende Enzyme in Pilzen                                 | 200        |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.3 Optimierung von Terpentranformationen durch Basidiomyceten</b>      | <b>201</b> |
| 3.3.1 Optimierung der Umgebungsbedingungen                                 | 202        |
| 3.3.1.1 Einfluß der Medienzusammensetzung auf Terpentranformationen        | 202        |
| 3.3.1.1.1 Wachstumsmedien  | 202        |
| 3.3.1.1.2 Transformationsmedien  | 208        |
| 3.3.1.2 Lichteinfluß   | 210        |
| 3.3.1.3 Einfluß der Adaption der verwendeten Vorkulturen                   | 212        |
| 3.3.2 Lösungsansätze zur verbesserten Substratzuführung                    | 215        |
| 3.3.2.1 Terpensubstrate  | 215        |
| 3.3.2.1.1 Wahl der Substratzugabezeitpunkte und der Substratmengen         | 215        |
| 3.3.2.1.2 Dosierung über die Gasphase                                      | 218        |
| 3.3.2.1.3 Einsatz organisch-wäßriger Zweiphasensysteme                     | 220        |
| 3.3.2.1.4 Löslichkeitsverbesserung durch Verwendung nichtionischer Tenside | 224        |
| 3.3.2.1.5 Liposomen als Vehikel für den Substrattransport                  | 227        |
| 3.3.2.2 Sauerstoff als Cosubstrat der Oxyfunktionalisierungen              | 233        |
| 3.3.2.2.1 Sauerstoffversorgung in Kulturen von Mikroorganismen             | 233        |
| 3.3.2.2.2 Möglichkeiten zur Belüftung von Bioreaktoren                     | 234        |
| 3.3.2.2.3 Weitere Anwendungen von Membranen in Bioreaktoren                | 237        |
| <b>3.4 Ausblick</b>  | <b>240</b> |
| <b>4 MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>242</b> |
| <b>4.1 Pilzkulturen</b>  | <b>242</b> |
| <b>4.2 Chemikalien</b>   | <b>243</b> |
| 4.2.1 Bestandteile der Kulturmedien  | 243        |
| 4.2.2 Standardsubstanzen, Substrate und Inhibitoren                        | 244        |
| 4.2.3 Weitere Chemikalien  | 246        |
| 4.2.4 Lösungsmittel  | 246        |
| 4.2.5 Gase für die Gaschromatographie und sonstige Anwendungen             | 247        |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3 Geräte</b>   | <b>247</b> |
| 4.3.1 Steriles Arbeiten   | 247        |
| 4.3.2 Kultivierung  | 248        |
| 4.3.3 Aufarbeitung  | 248        |
| 4.3.4 Bioreaktor  | 249        |
| 4.3.4.1 Reaktorordnung 1: Direkte Belüftung   | 249        |
| 4.3.4.2 Reaktorordnung 2: Belüftung mittels Kapillarmembran                                   | 249        |
| 4.3.4.3 Hohlfasermembran-Extraktion mit Limonen aus dem Bioreaktor                            | 250        |
| 4.3.5 Sonstige Laborgeräte  | 252        |
| <b>4.4 Kulturmedien</b>   | <b>252</b> |
| 4.4.1 Herstellung steriler Kulturmedien   | 252        |
| 4.4.2 Standardkulturmedien  | 253        |
| 4.4.2.1 Standardnährlösung-B <sub>1</sub> (=SNLB)   | 253        |
| 4.4.2.2 Standardnährlösung-Hefeextrakt (=SNLH)  | 253        |
| 4.4.2.3 SNLH-Agar   | 253        |
| 4.4.3 Faktorieller Versuchsplan (Plackett-Burman-Design) zur Abschätzung<br>von Haupteffekten | 254        |
| 4.4.4 Zusatz verschiedener Konzentrationen von Medienbestandteilen                            | 254        |
| 4.4.5 Transformationsmedien   | 255        |
| <b>4.5 Kultivierung</b>   | <b>255</b> |
| 4.5.1 Stammkulturen (Agarkulturen)  | 255        |
| 4.5.2 Standardbedingungen für Submerskulturen   | 256        |
| 4.5.3 Vorkulturen   | 256        |
| 4.5.3.1 Vorkulturen 1 (SNLB)  | 256        |
| 4.5.3.2 Vorkulturen 2 (SNLH)  | 256        |
| 4.5.4 Experimentelle Kulturen   | 256        |
| 4.5.5 Kultivierung unter UV-A-Belichtung  | 257        |
| 4.5.6 Kultivierung für Adaptionsversuche  | 257        |
| -Pinen-Adaption   | 257        |
| 4.5.6.2 Limonen-Adaption  | 258        |
| 4.5.6.3 Citronellol-Adaption  | 259        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 4.5.7 Kultivierung mit Einstellung des pH-Wertes vor Transformationsbeginn   | 259        |
| 4.5.8 Durchführung von Transformationsversuchen in Transformationsmedien   | 259        |
| 4.5.9 Kultivierungen im Bioreaktor   | 260        |
| <b>4.6 Dosierung von Substraten und Inhibitoren</b>  | <b>260</b> |
| 4.6.1 Normale Substratdosierung  | 260        |
| 4.6.2 Dosierung mittels organisch-wäßriger Zweiphasensysteme   | 260        |
| 4.6.3 Substratdosierung mit Tensidzusatz   | 261        |
| 4.6.4 Substratdosierung in liposomalen Lösungen  | 261        |
| 4.6.5 Substratdosierung über die Gasphase  | 262        |
| 4.6.6 Durchführung der Sauerstoffbegasung im Kulturkolben  | 263        |
| 4.6.7 Dosierung von Terpenalkoholen, -ketonen zur Untersuchung der<br>Produkttoxizität   | 263        |
| 4.6.8 Zugabe von Cyclohexenoxid und Monooxygenase-Inhibitoren  | 264        |
| <b>4.7 Blindwerte</b>  | <b>264</b> |
| 4.7.1 Allgemeine Durchführung  | 264        |
| 4.7.2 pH-Wert-Abhängigkeit   | 264        |
| 4.7.3 Blindwerte in Gegenwart von autoklaviertem Pilzmyzel   | 265        |
| <b>4.8 Synthesen</b>   | <b>265</b> |
| 4.8.1 Photooxidation von Citronellol zur Herstellung von 3,7-Dimethyl-5-octen-<br>1,7-diol (6) und 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7) [38, 196] | 265        |
| 4.8.2 Aufreinigung der Dirole  | 265        |
| 4.8.3 Synthese von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4) und 3,7-Dimethyl-1,6,7-<br>octantriol (9)  | 266        |
| <b>4.9 Analytik</b>  | <b>267</b> |
| 4.9.1 Probenahmeverfahren  | 267        |
| 4.9.1.1 Standard-Probenahme  | 267        |
| 4.9.1.2 Probenahme für die Schnellmethoden (LPME, SPME, Trockenmasse)  | 267        |
| 4.9.1.3 Probenahme für Sammelproben  | 267        |
| 4.9.1.4 Probenahme aus dem Bioreaktor  | 268        |
| 4.9.2 Kulturparameter  | 268        |
| 4.9.2.1 Trockenmasse   | 268        |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| 4.9.2.1.1 | Filtrationsmethode   | 268 |
| 4.9.2.1.2 | Schnellmethode (Anwendung zur Untersuchung von Kulturverläufen)  | 269 |
| 4.9.2.2   | Glucosegehalt  | 269 |
| 4.9.2.2.1 | Photometrische Methode (Enzymatik)   | 269 |
| 4.9.2.2.2 | Schnellmethode (Teststäbchen)  | 269 |
| 4.9.2.3   | pH-Wert  | 269 |
| 4.9.2.4   | Prüfung auf Kontaminationen  | 269 |
| 4.9.3     | Probenvorbereitung für die Gaschromatographie  | 270 |
| 4.9.3.1   | Flüssig/Flüssig-Extraktion (Isolierung neutraler und saurer Metabolite)  | 270 |
| 4.9.3.1.1 | Pentan/Ether-Extraktion  | 270 |
| 4.9.3.1.2 | Dichlormethan-Extraktion   | 270 |
| 4.9.3.2   | Aufarbeitung von Pilzmyzel aus Submerskulturen   | 271 |
| 4.9.3.3   | Festphasenmikroextraktion (SPME)   | 271 |
| 4.9.3.4   | Flüssigphasenmikroextraktion (LPME)  | 273 |
| 4.9.3.5   | Wasserdampfdestillation zur Gewinnung der Transformationsprodukte<br>aus nicht-wassermischbaren organischen Phasen         | 273 |
| 4.9.3.6   | Reinheitsbestimmung von Terpensubstraten   | 274 |
| 4.9.4     | Derivatisierungsreaktionen für die Gaschromatographie  | 274 |
| 4.9.4.1   | Methylierung   | 274 |
| 4.9.4.2   | Silylierung  | 274 |
| 4.9.5     | Probenvorbereitung für die hochleistungsflüssigchromatographische<br>Untersuchung schwerflüchtiger Transformationsprodukte | 275 |
| 4.9.6     | Säulenaufarbeitung mit Lewatit OC 1064 (nach [198])  | 275 |
| 4.9.7     | Gaschromatographie   | 276 |
| 4.9.7.1   | GC-FID   | 276 |
| 4.9.7.2   | GC-MS  | 277 |
| 4.9.7.2.1 | Für silylierte Proben:   | 277 |
| 4.9.7.2.2 | Für underivatisierte Proben  | 278 |
| 4.9.7.3   | Präparative Gaschromatographie   | 278 |
| 4.9.7.4   | Gaschromatographie zur Enantiomerentrennung  | 279 |
| 4.9.7.5   | Berechnung von Kovats-Indices  | 280 |
| 4.9.8     | Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)   | 280 |
| 4.9.8.1   | HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)  | 280 |
| 4.9.8.2   | HPLC-MS  | 281 |

---

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| 4.9.9 NMR-Spektroskopie              | 281        |
| <b>4.10 Entsorgungshinweise</b>      | <b>282</b> |
| 4.10.1 Biologisches Material         | 282        |
| 4.10.2 Lösungsmittel und Chemikalien | 282        |
| <b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b>        | <b>283</b> |
| <b>6 ANHANG</b>                      | <b>297</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Abb. 2-1:</b>  | $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten   | 7  |
| <b>Abb. 2-2:</b>  | R-(+)-Limonen- Transformation durch <i>P. sapidus</i>   | 9  |
| <b>Abb. 2-3:</b>  | $\beta$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>   | 10 |
| <b>Abb. 2-4:</b>  | Enantiomerenverteilung der Transformationsprodukte bei der Transformation von R-(+)-Limonen durch <i>P. sapidus</i>       | 11 |
| <b>Abb. 2-5:</b>  | Enantiomerenverteilung der Transformationsprodukte bei der Transformation von R-(-)-Limonen durch <i>P. sapidus</i>       | 11 |
| <b>Abb. 2-6:</b>  | Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel im Verlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> | 14 |
| <b>Abb. 2-7</b>   | Differenzierung der Substrat-/Produktverteilung in verschiedenen Myzelfraktionen  | 15 |
| <b>Abb. 2-8:</b>  | Verteilung des Substrates und der Produkte bei der Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>                         | 16 |
| <b>Abb. 2-9:</b>  | Verteilung von Substrat (Limonen) und Produkten (Carveol+Carvon) sowie Gasphasenverluste                                  | 17 |
| <b>Abb. 2-10:</b> | Zeitverlauf des $\alpha$ -Terpineol-Gehaltes im $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert                     | 21 |
| <b>Abb. 2-11:</b> | Zeitverlauf des trans-Verbenol-Gehaltes im $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert                          | 21 |
| <b>Abb. 2-12</b>  | Zeitverlauf des Verbenon-Gehaltes im $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert                                | 22 |
| <b>Abb. 2-13:</b> | Zeitverlauf des Myrtenol-Gehaltes im $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert                                | 22 |
| <b>Abb. 2-14:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Gehalte in myzelfreiem sowie myzelhaltigem SNLH-Medium ( <i>P. sapidus</i> )              | 24 |
| <b>Abb. 2-15:</b> | $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von <i>P. sapidus</i>  | 24 |
| <b>Abb. 2-16:</b> | $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von <i>G. applanatum</i>                                       | 25 |
| <b>Abb. 2-17:</b> | $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von <i>M. giganteus</i>  | 25 |
| <b>Abb. 2-18:</b> | $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von <i>T. hirsuta</i>  | 26 |
| <b>Abb. 2-19:</b> | $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von <i>G. frondosa</i>   | 26 |



---

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Abb. 2-20:</b> | Zeitverlauf der Gehalte an Verbenol, Verbenon, Myrtenol und Myrtenal, gelöst in SNLH-Medium   | 28 |
| <b>Abb. 2-21</b>  | Zeitverlauf der Gehalte an Carveol und Carvon, gelöst in SNLH-Medium, unter Kulturbedingungen   | 28 |
| <b>Abb. 2-22:</b> | Zeitverlauf der Pilztrockenmasse in Submerskulturen von <i>P. sapidus</i> bei Zusatz verschiedener Terpenkohlenwasserstoffe                                     | 29 |
| <b>Abb. 2-23:</b> | Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität von $\alpha$ -Pinen bei <i>P. sapidus</i>  | 30 |
| <b>Abb. 2-24:</b> | Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität von $\alpha$ -Pinen bei <i>G. applanatum</i>   | 31 |
| <b>Abb. 2-25:</b> | Einfluß der $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei <i>P. sapidus</i>   | 32 |
| <b>Abb. 2-26:</b> | Einfluß der $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei <i>G. applanatum</i>                                      | 32 |
| <b>Abb. 2-27:</b> | Einfluß der $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei <i>M. giganteus</i>                                       | 33 |
| <b>Abb. 2-28:</b> | Einfluß der $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei <i>T. hirsuta</i>   | 33 |
| <b>Abb. 2-29:</b> | Einfluß der $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei <i>G. frondosa</i>  | 34 |
| <b>Abb. 2-30:</b> | Wachstum von <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen Verbenol- bzw. Verbenonkonzentrationen   | 35 |
| <b>Abb. 2-31:</b> | Wachstum von <i>G. applanatum</i> bei verschiedenen Verbenol- bzw. Verbenonkonzentrationen  | 35 |
| <b>Abb. 2-32:</b> | Wachstum von <i>P. sapidus</i> in Submerskulturen bei Zusatz verschiedener Carveolmengen  | 36 |
| <b>Abb. 2-33:</b> | Wachstum von <i>P. sapidus</i> in Submerskulturen bei Zusatz verschiedener Carvonmengen   | 37 |
| <b>Abb. 2-34:</b> | Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse von <i>P. sapidus</i> nach 2,5 Kulturtagen  | 42 |
| <b>Abb. 2-35:</b> | Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse bei <i>P. sapidus</i> nach 24 h Limonentransformation   | 42 |
| <b>Abb. 2-36:</b> | Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Transformation von Limonen durch <i>P. sapidus</i> (Carveol+Carvon, 24 h Transformation)                       | 43 |
| <b>Abb. 2-37:</b> | Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Transformation von Limonen durch <i>P. sapidus</i> (Carveol+Carvon, trockenmassenormiert, 24 h Transformation) | 43 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Abb. 2-38:</b> | Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen Glucosegehalten im Medium                                      | 45 |
| <b>Abb. 2-39:</b> | Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen Malzextraktgehalten im Medium                                  | 45 |
| <b>Abb. 2-40:</b> | Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen Peptongehalten im Medium                                       | 46 |
| <b>Abb. 2-41:</b> | Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen Kaliumgehalten im Medium                                       | 46 |
| <b>Abb. 2-42:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von <i>P. sapidus</i> in Abhängigkeit von der täglichen UV A-Belichtungszeit     | 47 |
| <b>Abb. 2-43:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von <i>T. hirsuta</i> in Abhängigkeit von der täglichen UV A-Belichtungszeit     | 48 |
| <b>Abb. 2-44:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von <i>G. frondosa</i> in von der täglichen UV A-Belichtungszeit                 | 48 |
| <b>Abb. 2-45:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten                 | 49 |
| <b>Abb. 2-46:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>T. hirsuta</i> bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten                 | 50 |
| <b>Abb. 2-47:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>G. frondosa</i> bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten                | 50 |
| <b>Abb. 2-48:</b> | Abhängigkeit der $\alpha$ -Pinen-Transformation von den eingestellten Anfangs-pH-Werten der Kulturmedien                        | 52 |
| <b>Abb. 2-49:</b> | Stufenzugabe von $\alpha$ -Pinen (Tag 0, 1, 2 und 3) zu Kulturen von <i>P. sapidus</i> : Verbenolgehalte                        | 55 |
| <b>Abb. 2-50:</b> | Stufenzugabe von $\alpha$ -Pinen (Tag 0, 1, 2 und 3) zu Kulturen von <i>P. sapidus</i> : Verbenongehalte                        | 55 |
| <b>Abb. 2-51:</b> | Wachstumsverlauf von <i>P. sapidus</i> in Submerskultur   | 56 |
| <b>Abb. 2-52:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation     | 57 |
| <b>Abb. 2-53:</b> | Trockenmassespezifische Produktbildungsraten (1. Tag nach Substratzugabe) in Abhängigkeit vom Substratzugabezeitpunkt           | 58 |
| <b>Abb. 2-54:</b> | Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> | 59 |
| <b>Abb. 2-55:</b> | Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der $\beta$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>  | 60 |
| <b>Abb. 2-56:</b> | Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der Limonen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>         | 60 |

---

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Abb. 2-57:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte von <i>P. sapidus</i> im Zweiphasensystem mit Miglyol als org. Phase   | 62 |
| <b>Abb. 2-58:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte von <i>G. applanatum</i> im Zweiphasensystem mit Miglyol als org. Phase  | 63 |
| <b>Abb. 2-59:</b> | $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte von <i>G. applanatum</i> im Zweiphasensystem mit Paraffinöl als org. Phase   | 63 |
| <b>Abb. 2-60:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Tween 80  | 65 |
| <b>Abb. 2-61:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Tween 65  | 65 |
| <b>Abb. 2-62:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Span 20   | 66 |
| <b>Abb. 2-63:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Triton X-100  | 66 |
| <b>Abb. 2-64:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Brij 35   | 67 |
| <b>Abb. 2-65:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>G. applanatum</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Tween 80   | 67 |
| <b>Abb. 2-66:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>G. applanatum</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Tween 65   | 68 |
| <b>Abb. 2-67:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>G. applanatum</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Span 20  | 68 |
| <b>Abb. 2-68:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>G. applanatum</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Triton X-100   | 69 |
| <b>Abb. 2-69:</b> | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>G. applanatum</i> bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Brij 35  | 69 |
| <b>Abb. 2-70:</b> | Vergleich der Trockenmassen von <i>P. sapidus</i> , <i>M. giganteus</i> und <i>T. hirsuta</i> nach 2 Tagen Transformationszeit bei Zusatz von liposomalen Lösungen | 71 |
| <b>Abb. 2-71:</b> | Substratzugabe direkt und in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin: $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i>                                | 73 |
| <b>Abb. 2-72:</b> | Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin: $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>M. giganteus</i>   | 73 |
| <b>Abb. 2-73:</b> | Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin: $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>T. hirsuta</i>   | 74 |
| <b>Abb. 2-74:</b> | Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Soja-Phosphatidylcholin: $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>T. hirsuta</i>   | 74 |

---

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Abb. 2-75:</b> | Trockenmasse und Sauerstoffsättigung im Verlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> mit und ohne zusätzliche Sauerstoffbegasung           | 76 |
| <b>Abb. 2-76:</b> | Produktbildung im Verlauf der $\alpha$ -Pinen-Transformation durch <i>P. sapidus</i> mit und ohne zusätzliche Sauerstoffzuführung                                | 76 |
| <b>Abb. 2-77:</b> | Vergleich der Transformationsleistung von $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>P. sapidus</i> bei Langzeit-Submerskultivierung       | 81 |
| <b>Abb. 2-78:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>P. sapidus</i> nach 6 Wochen Adaptionzeit                  | 81 |
| <b>Abb. 2-79:</b> | Vergleich der Biotransformationsleistung von $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>G. applanatum</i> bei Langzeit-Submerskultivierung | 82 |
| <b>Abb. 2-80:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>G. applanatum</i> nach 6 Wochen Adaptionzeit               | 82 |
| <b>Abb. 2-81:</b> | Vergleich der Biotransformationsleistung von $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>T. hirsuta</i> bei Langzeit-Submerskultivierung    | 83 |
| <b>Abb. 2-82:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>T. hirsuta</i> nach 6 Wochen Adaptionzeit                  | 83 |
| <b>Abb. 2-83:</b> | Vergleich der Biotransformationsleistung von $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>M. giganteus</i> bei Langzeit-Submerskultivierung  | 84 |
| <b>Abb. 2-84:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>M. giganteus</i> nach 6 Wochen Adaptionzeit                | 84 |
| <b>Abb. 2-85:</b> | Vergleich der Biotransformationsleistung von $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>G. frondosa</i> bei Langzeit-Submerskultivierung   | 85 |
| <b>Abb. 2-86:</b> | Zeitverlauf der $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von <i>G. frondosa</i> nach 6 Wochen Adaptionzeit                 | 85 |
| <b>Abb. 2-87:</b> | Limonenadaption von <i>P. sapidus</i> : Limonentransformation durch adaptierte und nichtadaptierte Kulturen  | 87 |
| <b>Abb. 2-88:</b> | Limonenadaption von <i>P. sapidus</i> : Vergleich zweier unabhängig geführter Versuchsreihen A und B (1 Woche Adaptionzeit)                                      | 87 |
| <b>Abb. 2-89:</b> | Limonenadaption von <i>P. sapidus</i> : Vergleich von adaptierten und nichtadaptierten Kulturen nach 1, 2, 4 und 6 Wochen Kulturzeit                             | 88 |

---

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Abb. 2-90:</b>  | Zeitverlauf der Carveol/Carvon-Extraktion und Limonensättigung mittels Hohlfasermodule aus einem 2L-Reaktor    | 91  |
| <b>Abb. 2-91:</b>  | Wiederfindung des Substrates und der Produkte im Säuleneluat, der Limonenphase und der wässrigen Phase         | 91  |
| <b>Abb. 2-92:</b>  | Produkte der Citronellol-Transformation durch Pilze  | 95  |
| <b>Abb. 2-93:</b>  | Strukturen der mittels NMR identifizierten Substanzen  | 96  |
| <b>Abb. 2-94:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6)   | 102 |
| <b>Abb. 2-95:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6) - silyliert   | 102 |
| <b>Abb. 2-96:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7)   | 103 |
| <b>Abb. 2-97:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7) - silyliert   | 103 |
| <b>Abb. 2-98:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4)  | 104 |
| <b>Abb. 2-99:</b>  | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4) - silyliert  | 104 |
| <b>Abb. 2-100:</b> | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9)   | 105 |
| <b>Abb. 2-101:</b> | Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9) - silyliert   | 105 |
| <b>Abb. 2-102:</b> | Festphasenextrakte aus Medien citronellole gefütterter Kulturen von <i>C. carcharias</i> : HPLC-Chromatogramme | 109 |
| <b>Abb. 2-103:</b> | pH-Abhängigkeit der Citronellol-Blindwerte bei direkter Citronelloladdition                                    | 111 |
| <b>Abb. 2-104:</b> | Citronellolblindwert bei pH 4 unter Zusatz einer äquimolaren Menge Wasserstoffperoxid                          | 112 |
| <b>Abb. 2-105:</b> | Abbau von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6) zu Rosenoxid bei verschiedenen pH-Werten                           | 113 |
| <b>Abb. 2-106:</b> | Stabilität von 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (4) in SNLH-Medium bei pH 7,0                                  | 113 |
| <b>Abb. 2-107:</b> | Citronellol-Transformation durch <i>P. sapidus</i> (direkte Substratzugabe)                                    | 116 |
| <b>Abb. 2-108:</b> | Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i> (direkte Substratzugabe)                                 | 117 |
| <b>Abb. 2-109:</b> | Kulturparameter der Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i> (direkte Substratzugabe)             | 117 |
| <b>Abb. 2-110:</b> | Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i> (Gasphasen-Substratzugabe)                               | 118 |
| <b>Abb. 2-111:</b> | Kulturparameter der Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i> (Gasphasen-Substratzugabe)           | 118 |
| <b>Abb. 2-112:</b> | Substrat- und Produktverteilung bei der Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>                  | 120 |
| <b>Abb. 2-113:</b> | Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i> (SNLH-Medium)  | 122 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Abb. 2-114:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Pilztrockenmasse vor Citronellolzugabe   | 124 |
| <b>Abb. 2-115:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Pilztrockenmassebildung nach der ersten Citronellolzugabe  | 124 |
| <b>Abb. 2-116:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol ( <b>9</b> )   | 125 |
| <b>Abb. 2-117:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die trockenmassenorm. Bildung v. 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol ( <b>9</b> )                                      | 125 |
| <b>Abb. 2-118:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Bildung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol ( <b>6</b> )   | 126 |
| <b>Abb. 2-119:</b> | Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die trockenmassenorm. Bildung v. 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol ( <b>6</b> )                                      | 126 |
| <b>Abb. 2-120:</b> | Bildung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol ( <b>6</b> ) durch <i>C. carcharias</i> bei verschiedenen Ca-Konzentrationen   | 127 |
| <b>Abb. 2-121:</b> | Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol ( <b>9</b> ) durch <i>C. carcharias</i> bei verschiedenen Ca-Konzentrationen   | 128 |
| <b>Abb. 2-122:</b> | Bildung von Triol ( <b>9</b> ) und Epoxid ( <b>4</b> ) aus Citronellol durch <i>C. carcharias</i> in verschiedenen Transformationsmedien und myzelfreiem Wachstumsmedium | 130 |
| <b>Abb. 2-123:</b> | Bildung von Diol ( <b>7</b> ) aus Citronellol durch <i>C. carcharias</i> in verschiedenen Transformationsmedien und myzelfreiem Wachstumsmedium sowie pH-Verlauf         | 131 |
| <b>Abb. 2-124:</b> | Untersuchung des Lichteinflusses auf die Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>   | 132 |
| <b>Abb. 2-125:</b> | Wirkungen der Cytochrom-P450-Inhibitoren 1-Aminobenzotriazol und SKF-525 A auf die Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>                                 | 133 |
| <b>Abb. 2-126:</b> | Untersuchung des Einflusses von Cyclohexenoxid auf die Citronellol-Transformation durch <i>C. carcharias</i>   | 134 |
| <b>Abb. 2-127</b>  | Vergleich der Citronellol-Transformation durch adaptierte und nicht-adaptierte Kulturen von <i>C. carcharias</i>   | 136 |
| <b>Abb. 2-128:</b> | Triolbildung durch <i>C. carcharias</i> bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen   | 137 |
| <b>Abb. 2-129:</b> | Diolbildung durch <i>C. carcharias</i> bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen (bezogen auf 100 mL Kulturvolumen)   | 138 |
| <b>Abb. 2-130</b>  | Rosenoxidbildung durch <i>C. carcharias</i> bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen   | 138 |
| <b>Abb. 2-131:</b> | Trockenmassen von <i>C. carcharias</i> im Verlauf der Citronellol-Transformation mit verschiedenen Substratmengen  | 139 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Abb. 2-132:</b> | Triolbildung aus Citronellol durch <i>C. carcharias</i> bei unterschiedlichen Zeitpunkten der ersten Substratzugabe                      | 140 |
| <b>Abb. 2-133:</b> | Diolbildung aus Citronellol durch <i>C. carcharias</i> bei unterschiedlichen Zeitpunkten der ersten Substratzugabe                       | 140 |
| <b>Abb. 2-134:</b> | Gehalte an 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol ( <b>9</b> ) und 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol ( <b>6</b> ) im Reaktormedium                    | 144 |
| <b>Abb. 2-135:</b> | Citronellol und Rosenoxid in der Reaktorabluft   | 144 |
| <b>Abb. 2-136:</b> | Sauerstoffsättigung und pH-Wert im Verlauf der Transformation  | 145 |
| <b>Abb. 2-137:</b> | Glucosegehalt im Verlauf der Transformation  | 145 |
| <b>Abb. 2-138:</b> | Transformationsprodukte von Limonen und $\alpha$ -Pinen durch <i>C. carcharias</i>   | 149 |
| <b>Abb. 3-1:</b>   | Herstellung von cis/trans-Rosenoxid durch sensibilisierte Photooxidation   | 154 |
| <b>Abb. 3-2:</b>   | Bildung von Isopentenylidiphosphat über den Mevalonsäureweg u. Dimerisierung mit Dimethylallyldiphosphat zu Geranyldiphosphat            | 158 |
| <b>Abb. 3-3:</b>   | Biosynthesewege einiger Monoterpene – ausgehend von Geranyldiphosphat  | 159 |
| <b>Abb. 3-4:</b>   | Die wichtigsten durch Biotransformationen gebildeten allylischen Hydroxylierungsprodukte von Limonen, $\alpha$ -Pinen und $\beta$ -Pinen | 164 |
| <b>Abb. 3-5:</b>   | Transformationsprodukte von $\alpha$ -Pinen durch Basidiomyceten und ihre möglichen Bildungswege   | 166 |
| <b>Abb. 3-6:</b>   | Transformationsprodukte von $\beta$ -Pinen durch <i>P. sapidus</i> und ihre möglichen Bildungswege                                       | 167 |
| <b>Abb. 3-7:</b>   | Transformationsprodukte von Limonen durch <i>P. sapidus</i> und <i>C. carcharias</i> sowie mögliche Bildungswege                         | 168 |
| <b>Abb. 3-8:</b>   | Allylische Hydroxylierungsprodukte aus der Transformation von Citronellol durch <i>Botrytis cinerea</i>                                  | 169 |
| <b>Abb. 3-9:</b>   | Transformation von Citronellol durch <i>C. carcharias</i>  | 170 |
| <b>Abb. 3-10:</b>  | Hydroxylierung von Fenchol und Borneol durch <i>Diplodia gossypina</i> und von 1,8-Cineol durch <i>Bacillus cereus</i>                   | 171 |
| <b>Abb. 3-11:</b>  | Transformation von $\alpha$ -Pinen durch <i>Pseudomonas fluorescens</i> (NCIMB 11671) und <i>Nocardia</i> sp. (Strain 18.3)              | 173 |
| <b>Abb. 3-12:</b>  | Oxidation von cis/trans-Rosenoxid zur 9-Carbonsäure und deren Methylester durch <i>Aspergillus niger</i>                                 | 175 |
| <b>Abb. 3-13:</b>  | Baeyer-Villiger Oxidation von R-(+)-Campher durch <i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 17453)   | 176 |
| <b>Abb. 3-14:</b>  | Säurekatalysierte Hydratisierungen von $\alpha$ -Pinen und Citronellol   | 177 |

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Abb. 3-15:</b> | Enzymatische Hydratisierung von Limonen zu $\alpha$ -Terpineol  |     |
|                   | 177   |     |
| <b>Abb. 3-16:</b> | Bildung der cis-/trans-Carveol- und der Carvon-Enantiomere aus R(+)- bzw. S(-)-Limonen                                  | 179 |
| <b>Abb. 3-17:</b> | Struktur von multilamellaren und unilamellaren Vesikeln   | 227 |
| <b>Abb. 3-18:</b> | Aufnahme-mechanismen von Liposomen durch Zellen   | 230 |
| <b>Abb. 4-1:</b>  | Schematischer Aufbau des Bioreaktors mit Membranbelüftung   | 250 |
| <b>Abb. 4-2:</b>  | Aufbau des Hohlfasermembran-Extraktionssystems  | 251 |
| <b>Abb. 4-3:</b>  | Gasphasendosierung des Substrates   | 262 |
| <b>Abb. 6-1:</b>  | Massenspektrum von 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol ( <b>8</b> )   | 297 |
| <b>Abb. 6-2:</b>  | HPLC-MS-Spektrum des nicht identifizierten nichtflüchtigen Citronellol-Transformationsproduktes (Peak 2 aus Abb. 2-102) | 297 |

## Tabellenverzeichnis

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Tab. 2-1:</b>  | $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten: Identifizierung der Produkte            | 7   |
| <b>Tab. 2-2:</b>  | Produktmengen bei verschiedenen Basidiomyceten nach 72 h Transformationsdauer                | 8   |
| <b>Tab. 2-3:</b>  | Transformation von R-(+)-Limonen durch <i>Pleurotus sapidus</i>                              | 9   |
| <b>Tab. 2-4:</b>  | Transformation von (-)- $\beta$ -Pinen durch <i>Pleurotus sapidus</i>                        | 10  |
| <b>Tab. 2-5:</b>  | Verteilung von $\alpha$ -Pinen zwischen Medium und Myzel                                     | 13  |
| <b>Tab. 2-6:</b>  | Verunreinigungen verschiedener kommerziell erhältlicher $\alpha$ -Pinene in [%]              | 19  |
| <b>Tab. 2-7:</b>  | Plackett-Burman-Design für 15 Variablen in 16 Experimenten zur Abschätzung von Haupteffekten | 39  |
| <b>Tab. 2-8:</b>  | Medienparameter und Konzentrationsstufen für das Plackett-Burman-Design                      | 40  |
| <b>Tab. 2-9:</b>  | Pilzstämme für das Citronellol-Screening   | 93  |
| <b>Tab. 2-10:</b> | Identifizierte Produkte der Citronellol-Transformation durch Pilze                           | 95  |
| <b>Tab. 2-11:</b> | $^1\text{H}$ -NMR-Daten  | 97  |
| <b>Tab. 2-12:</b> | $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten   | 100 |
| <b>Tab. 2-13:</b> | Produktmengen der Citronellol-Transformation und Kulturparameter                             | 107 |
| <b>Tab. 2-14:</b> | Citronellolverluste über die Reaktorabluft   | 146 |



|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Tab. 2-15:</b> | Transformation von R-(+)-Limonen und (-)- $\alpha$ -Pinen durch <i>C. carcharias</i>                                       | 148 |
| <b>Tab. 3-1:</b>  | Acyclische Monoterpenoide mit Bedeutung als Duft- und Aromastoffe  | 151 |
| <b>Tab. 3-2:</b>  | Cyclische Monoterpenoide mit Bedeutung als Duft- und Aromastoffe   | 152 |
| <b>Tab. 3-3:</b>  | Biosynthese von Terpenoiden durch höhere Pilze   | 156 |
| <b>Tab. 3-4:</b>  | Einige Monoterpene aus regenerierbaren Quellen   | 161 |
| <b>Tab. 3-5:</b>  | Wasserlöslichkeit einiger Terpene bei 25°C   | 179 |
| <b>Tab. 3-6:</b>  | Dampfdrücke einiger Terpenoide und organischer Lösungsmittel   | 183 |
| <b>Tab. 3-7:</b>  | log P-Werte von Monoterpenoiden und organischen Lösungsmitteln   | 186 |
| <b>Tab. 3-8:</b>  | Bedeutung von Vitaminen im Pilzmetabolismus  | 204 |
| <b>Tab. 3-9:</b>  | Mittlere Vitamingehalte von Hefeextrakt  | 204 |
| <b>Tab. 3-10:</b> | Essentielle Mineralstoffe und Spurenelemente in Pilzen   | 206 |
| <b>Tab. 3-11:</b> | HLB-Werte und kritische Mizellenbildungskonzentrationen der verwendeten nichtionischen Tenside                             | 226 |
| <b>Tab. 4-1:</b>  | Namen und Bezugsquellen der verwendeten Pilzstämme   | 242 |
| <b>Tab. 4-2:</b>  | Verwendete Nährmedienbestandteile  | 243 |
| <b>Tab. 4-3:</b>  | Spezielle Medienzusätze für die Substrat-Dosierungs-Versuche   | 244 |
| <b>Tab. 4-4:</b>  | Verwendete externe und interne Standards für die GC-FID, GC-MS sowie Substrate und Inhibitoren für die Biotransformationen | 244 |
| <b>Tab. 4-5:</b>  | Weitere Chemikalien  | 246 |
| <b>Tab. 4-6:</b>  | Lösungsmittel  | 246 |
| <b>Tab. 4-7:</b>  | Gase für die Gaschromatographie und sonstige Anwendungen   | 247 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| ATCC              | American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA                              |
| APT               | attached proton test  |
| CBS               | Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande                                |
| CMC               | critical micellar concentration   |
| CW                | Carbowax 20 M   |
| DSM               | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen,<br>Braunschweig                 |
| FSU               | Pilzkultursammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena,<br>Sektion Biologie, Weimar |
| GAP               | <i>Ganoderma applanatum</i>   |
| GFR               | <i>Grifola frondosa</i>   |
| ELSD              | Evaporative light scattering detector   |
| HLB               | hydrophile lipophile balance  |
| LPME              | liquid phase micro extraction   |
| KI                | Kovats-Index  |
| LNP               | Ligninperoxidase  |
| LUV               | large unilamellar vesicle   |
| MGI               | <i>Meripilus giganteus</i>  |
| MLV               | multilamellar vesicle   |
| MNP               | manganabhängige Peroxidase  |
| PAK               | polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff   |
| PSA               | <i>Pleurotus sapidus</i>  |
| SE                | SE 54   |
| SNLB <sub>1</sub> | Standardnährlösung/Vitamin B <sub>1</sub> -Medium                                       |
| SNLH              | Standardnährlösung/Hefe-Medium  |
| SPME              | solid phase micro extraction  |
| SUV               | small unilamellar vesicle   |
| THI               | <i>Trametes hirsuta</i>   |

# 1 Einleitung

Wasser ist die häufigste Substanz in allen lebenden Systemen: Mit einem Anteil von mindestens 70% stellt es das Grundmedium der meisten Stoffwechselfvorgänge dar. Dies ist vor allem auf seine einzigartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften zurückzuführen, die es aufgrund seiner dipolaren Struktur und der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu einem sehr guten Lösungsmittel für alle polaren Substanzen und Ionen machen. Die autoprotolytischen Eigenschaften des Wassermoleküls sind Voraussetzung für das Säure-Base-Gleichgewicht in lebenden Zellen. Wasser ist direkt an vielen enzymatischen Reaktionen als Cosubstrat (Hydrolysen) oder als Reaktionsprodukt (z.B. im Citratcyclus) beteiligt. Auch ist es die Hauptquelle für Wasserstoff in Form von Protonen oder in der reduzierten Form als Wasserstoffatome oder Hydridionen, den wichtigsten Mediatoren bei der Übertragung und Speicherung von Stoffwechselenergie [1].

Auch lipophile Substanzen nehmen einen wichtigen Platz im Stoffwechsel aller Lebewesen ein. Ihre bedeutendste Funktion ist die Zellkompartimentierung durch die Ausbildung von Biomembranen – also Doppelschichten amphiphiler Lipidmoleküle (meist Phospholipide). So entstehen lipophile Barrieren, deren semipermeable Eigenschaften durch hydrophile Zellwandbestandteile (z.B. Polysaccharide) nicht erreichbar wären.

Lipidmembranen sind durchlässig für lipophile Moleküle und kleine, polare, ungeladene Moleküle (z.B. Wasser, Glycerol, Harnstoff), jedoch nicht für große, polare, geladene oder ungeladene Moleküle (z.B. Aminosäuren oder Monosaccharide) und für Ionen.

Diese Undurchlässigkeit für Ionen ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung von Protonengradienten (Energiespeicherung) und allgemein Potentialdifferenzen (z.B. für die Reizleitung in Nerven und Muskeln höherer Tiere).

Die Membransysteme der Cytoplasmamembran einschließlich des endoplasmatischen Reticulums und bei Eukaryonten zusätzlich der verschiedenen Zellorganellen stellen jedoch auch wichtige lipophile Reaktionsräume. Die zentralen Prozesse der Energiegewinnung in Zellen findet membrangebunden statt (Atmungskettenphosphorylierung und Photosynthese) und erfordert lipophile Elektronentransporter sowie Enzyme, deren Oberfläche zumindest teilweise lipophil ist, damit sie in der Membran löslich sind. En-

zymatische Umsetzungen lipophiler Substrate erfordern darüber hinaus lipophile Bindungsstellen an den aktiven Zentren der beteiligten Enzyme.

Es wird deutlich, daß auf zellulärer Ebene das Problem des Zusammenwirkens hydrophiler und lipophiler Kompartimente nicht nur gelöst ist, sondern sogar eine Voraussetzung für alle biologischen Prozesse darstellt.

Die Fähigkeit einiger Enzyme, auch in lipophilen Reaktionsräumen (oder zumindest an Grenzflächen) katalytisch aktiv zu sein, macht man sich in der Biotechnologie durch enzymatische Reaktionen in organischen, hydrophoben Medien zu nutze. Vor allem mit Hilfe von Enzymen aus der Klasse der Hydrolasen (Lipasen, andere Esterasen, Proteasen) sind auf diesem Wege vor allem reverse Hydrolysen von Interesse [2].

Die Oxyfunktionalisierung lipophiler Substrate erfordert Elektronenakzeptoren als Kofaktoren; sie ist daher bevorzugt mit lebenden Zellen als Biokatalysatoren durchführbar. Diese Transformationen werden meist von spezialisierten Mikroorganismen vorgenommen und von der Vielzahl der Lebewesen nur in kleinerem Umfang im Rahmen des Sekundärstoffwechsels durchgeführt, während mengenmäßig bedeutende Umsetzungen lipophiler Substanzen sich bei den meisten Organismen auf die Gruppen der Triacylglycerole und Phospholipide als Energiequellen und Membranbestandteile konzentrieren.

Für die Biotechnologie sind neben natürlichen Stoffen (z.B. Steroiden, Terpenoiden) vor allem die Xenobiotika – also natürlich normalerweise nicht vorkommende Substanzen, z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, halogenierte oder andere Aromaten, sowie halogenierte oder nichthalogenierte Aliphaten interessant.

Transformationen von Steroiden und einigen Terpenoiden führen zu pharmazeutischen Wirkstoffen, einige Mono- und Sesquiterpenoide sind als Aromastoffe bedeutend, die Transformation von Xenobiotika könnte zu Sanierung kontaminierter Umweltkompartimente (Wasser, Boden, Luft) eingesetzt werden, und einige stereospezifisch oxyfunktionalisierte Aromaten oder Aliphaten sind als Edukte für chemische Synthesen geeignet.

Die Beispiele verdeutlichen, daß die Oxyfunktionalisierung lipophiler Substrate ein zentrale Aufgabe in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie darstellt. Diese Transformationen sind aufgrund der chemischen Inkompatibilität lipophiler und wäßriger Systeme mit Problemen verbunden, für die allgemein anwendbare Lösungen noch nicht

vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit werden Lösungsansätze anhand von Terpenttransformationen durch Basidiomyceten untersucht.

Die Auswahl dieses lipophil-wäßrigen Systems ergab sich aus den interessanten Duft- und Aromastoffeigenschaften vieler Terpenttransmutationsprodukte und aus der langen Tradition der Pilzbiotechnologie bei der Lebensmittelherstellung.

Die Biokatalysatoren für diese ersten überlieferten Fermentationsprozesse in der Menschheitsgeschichte waren Hefen – also Pilze. Mit ihrer Hilfe stellten die Babylonier und Sumerer bereits vor ca. 8 000 Jahren ein alkoholisches Getränk her, das man heute als Vorläufer des Bieres bezeichnen kann. Bereits um 4 000 v. Chr. betrieben die Ägypter ein Ansäuern des Brotes durch die Kohlensäure aus dem Rückstand des Bieres. Der Wein als weiteres Gärungsprodukt wird bereits im 1. Buch Mose (ca. 3 500 Jahre alt) erwähnt [3].

Aber auch myzelbildende Pilze – hauptsächlich aus der taxonomisch uneinheitlichen Gruppe der Schimmelpilze – haben wichtige Bedeutung bei der fermentativen Veredelung von Lebensmitteln erlangt. Neben den Edelschimmelkäsen (Roquefort mit *Penicillium roquefortii* und Camembert/Brie mit *P. camemberti*) sind hier die asiatischen Fermentationsprodukte (z.B. Pilzreis, Sojasauce u.a.) zu nennen, die mit Schimmelpilzen der Gattungen *Rhizopus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Monascus* und *Aspergillus* hergestellt werden.

Aus dem Organismenreich der Mycobionta (Pilze) sind heute weit mehr als 100 000 Arten bekannt, die der Wirtschaft in den letzten Jahrzehnten Zugang zur industriellen Produktion einer Reihe wichtiger Verbindungen verschafft haben. Für Lebensmittel bedeutend sind hier die organischen Säuren (Citronen- und Gluconsäure durch *Aspergillus niger*) und die Vitamine (z.B. Vitamin B<sub>2</sub> =Riboflavin durch die Hefen *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*). Auch einige für die Lebensmittelproduktion wichtige technische Enzyme (z.B.  $\alpha$ -Amylasen, Dextranasen, Pectinasen, Lipasen, Proteasen) werden mit Hilfe von Pilzen (vor allem *Aspergillus*-Arten) gewonnen.

Die zu den höheren Pilzen zählende Klasse *Basidiomycetes* (Ständerpilze) gehört mit ca. 30 000 bekannten Arten zu den größten Pilzklassen. Ihre Fruchtkörper waren bereits zu Zeiten, als der Mensch noch als Sammler seinen Nahrungsbedarf deckte, fester Bestandteil der menschlichen Ernährung. Mittlerweile werden jährlich weltweit 1,6 Mio t des

Kulturchampignons (*Agaricus bisporus*), 917 000 t des Austernseitlings (*Pleurotus ostreatus*), 526 000 t des Shiitake-Pilzes (*Lentinus edodes*) sowie einige andere Arten kommerziell angebaut (Daten von 1991, [4]).

Während für die meisten der heutigen biotechnologischen Anwendungen von Pilzen verschiedene Ascomyceten (Schlauchpilze), Deuteromyceten (imperfekte Pilze) und auch Zygomyceten (Jochpilze) eingesetzt werden, beschränkt sich die kommerzielle biotechnologische Anwendung von Basidiomyceten bislang auf die Gewinnung von Speisepilzen und den Einsatz einiger Weißfäulepilze (z.B. *Phanerochaete chrysosporium*) für den biologischen Abbau von Xenobiotika [5].

Die Fähigkeit von Basidiomyceten zur Biosynthese von Aromastoffen einschließlich einer Vielzahl von Terpenen ist schon seit längerem bekannt [6, 7, 8, 9]. Bedingt durch ihr natürliches terpenhaltiges Substrat (Holz, Blätter, Koniferennadeln) sind sie jedoch nicht nur zur *de-novo*-Synthese, sondern auch zur Biotransformation von Terpenen in der Lage [10, 11].

## 1.1 Problemstellung

Biotransformationen von Terpenen durch Mikroorganismen haben in den letzten vier Jahrzehnten zur Identifizierung einer Vielzahl von Produkten geführt, die z.T. als Aromastoffe von Bedeutung sind [12, 13, 14]. Die Umsetzung in technisch anwendbare biotechnologische Prozesse erwies sich jedoch aus verschiedenen Gründen als außerordentlich schwierig:

- Terpene sind in höheren Konzentrationen membrantoxisch und führen daher meist zu einer Schädigung der eingesetzten Mikroorganismen.
- Terpenkohlenwasserstoffe sind kaum wasserlöslich; ihre Biotransformation mit Mikroorganismen in wässrigen Submerskulturen wird dadurch erschwert.
- Terpene – besonders die Monoterpenkohlenwasserstoffe – sind leichtflüchtig. Dies führt zu Substratverlusten über die Gasphase, da eine gute Versorgung der Kulturen mit Sauerstoff als obligatem Substrat für das Wachstum der aeroben Mikroorganismen und für die Terpenoxidation eine effektive Belüftung erfordert.

Anhand dieser lipophilen Substrate und unter Verwendung verschiedener Stämme von Basidiomyceten als Modellsystem sollten Lösungsansätze für die genannten Probleme untersucht werden, die gegebenenfalls auch auf andere Biotransformationen lipophiler Substrate übertragen werden könnten.

Als Schwerpunkte der Arbeit sind zu nennen:

- Optimierung der Transformationsbedingungen für die einzelnen ausgewählten Pilzstämme und Substrate,
- Variation der Dosierung der lipophilen Substrate mit dem Ziel einer möglichst hohen Transformationsleistung, d.h. geringer Substrattoxizität, hohen Produktbildungsraten und einem langem Erhalt der Transformationsaktivität,
- Identifizierung der Transformationsprodukte und Aufklärung ihrer Bildungswege.

---

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Biotransformationen von Monoterpenkohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten

#### 2.1.1 Vergleich der $\alpha$ -Pinen-Transformationsleistungen verschiedener Basidiomyceten

Basidiomyceten sind in der Lage,  $\alpha$ -Pinen und andere Terpenkohlenwasserstoffe zu oxyfunktionalisieren. Als Produkte entstehen dabei Gemische von Terpenalkoholen, -ketonen und -aldehyden [10, 11].

Zunächst sind die Transformationsleistungen einiger terpenttransformierender Pilze untersucht worden, um geeignete Stämme auszuwählen, die aufgrund ihres Wachstumsverhaltens und nach Art und Menge der gebildeten Produkte für eine Optimierung der Biotransformation geeignet sein sollten.

Dazu wurden Stämme von *Pleurotus sapidus* (PSA), *Ganoderma applanatum* (GAP), *Meripilus giganteus* (MGI), *Trametes hirsuta* (THI), *Pleurotus flabellatus* (PFL) und *Grifola frondosa* (GFR) untersucht.

Nach einer Inkubationszeit der experimentellen Kulturen von 2,5 Tagen wurden 200  $\mu$ L  $\alpha$ -Pinen (=1,25 mmol) direkt in den Kulturkolben (100 mL Kulturvolumen) gegeben.

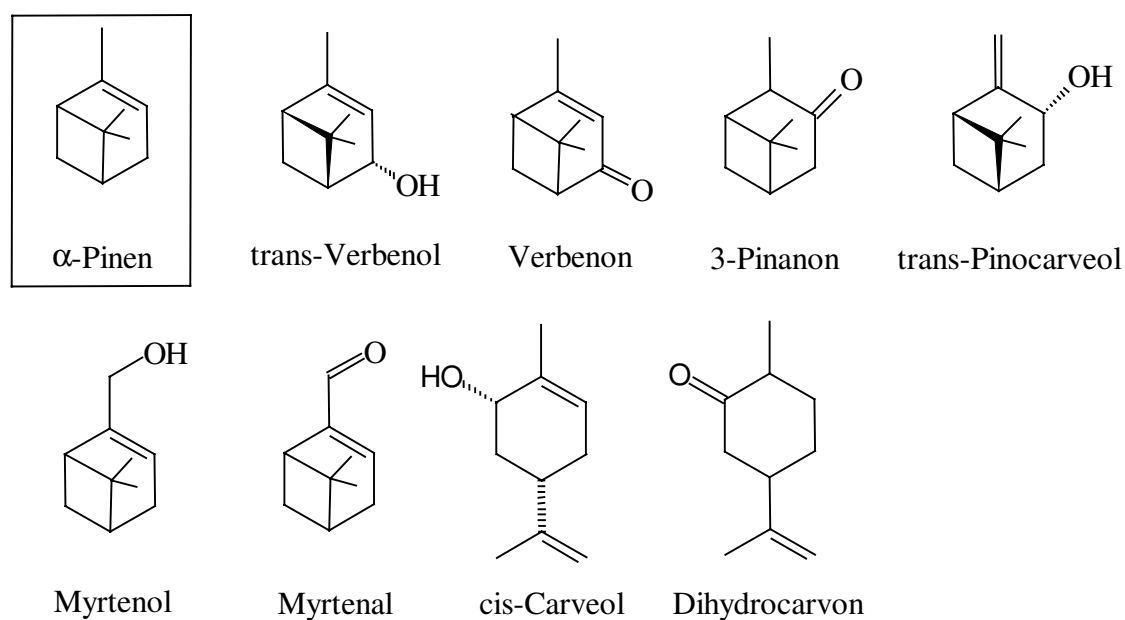
Nach 72 h wurde das Kulturmedium mit Pentan/Ether extrahiert und mittels GC-MS und GC-FID analysiert. Die Transformationsprodukte wurden durch Vergleich der Massenspektren mit Referenzspektren, Überprüfung der Kovats-Indices und – soweit vorhanden – durch direkten Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-1 dargestellt.

Als Blindwert wurde ein Medienblindwert (ohne Pilz) mit der gleichen Pinenmenge geführt, um nichtenzymatisch gebildete Produkte von Biotransformationsprodukten unterscheiden zu können.



**Tab. 2-1:**  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten: Identifizierung der Produkte (KI= Kovats-Index, MS=Referenz-Massenspektrum, Std.=Standard)

| Substanz                 | Identifizierung    | KI (CW 20M) | Lit.-KI (CW 20M) | KI (SE 54) | Lit.-KI (SE 54) |
|--------------------------|--------------------|-------------|------------------|------------|-----------------|
|                          |                    |             | [15, 16, 17]     |            |                 |
| <b>trans-Verbenol</b>    | Std. (cis), MS, KI | 1708        | 1735             | 1125       | 1140            |
| <b>Verbenon</b>          | Std., MS, KI       | 1718        | 1733, 1784       | 1174       | 1195            |
| <b>Myrtenol</b>          | Std., MS, KI       | 1829        | 1842             | -          | -               |
| <b>trans-Pinocarveol</b> | Std., MS, KI       | 1678        | 1676             | -          | -               |
| <b>3-Pinanon</b>         | MS, KI             | 1539        | 1524             | -          | -               |
| <b>cis-Carveol</b>       | Std., MS, KI       | 1875        | 1858             | -          | -               |
| <b>Myrtenal</b>          | Std., MS, KI       | 1636        | 1638             | -          | -               |
| <b>Dihydrocarvon</b>     | MS, KI             | 1617        | 1600             | -          | -               |



**Abb. 2-1:**  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten

**Tab. 2-2:** Produktmengen bei verschiedenen Basidiomyceten nach 72 h Transformationsdauer [mg L<sup>-1</sup>]

|                          | GAP  | PSA  | MGI  | PFL  | THI  | GFR  | Blindwert |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|-----------|
| <b>trans-Verbenol</b>    | 2,26 | 9,12 | 1,05 | 0,88 | 1,90 | 3,68 | 0,33      |
| <b>Verbenon</b>          | 2,60 | 6,40 | -    | 0,29 | 0,45 | 0,84 | 0,34      |
| <b>Myrtenol</b>          | 0,28 | 0,94 | 1,18 | 0,96 | 5,74 | 0,65 | -         |
| <b>trans-Pinocarveol</b> | 0,11 | 0,82 | -    | 0,14 | 0,17 | 0,41 | -         |
| <b>3-Pinanon</b>         | -    | 0,67 | -    | -    | -    | -    | -         |
| <b>cis-Carveol</b>       | -    | 0,37 | -    | -    | -    | -    | -         |
| <b>Myrtenal</b>          | -    | 0,09 | -    | -    | -    | -    | -         |
| <b>Dihydrocarvon</b>     | -    | 0,06 | -    | -    | -    | -    | -         |

Als Hauptprodukte traten allylische Oxidationsprodukte auf. Bei fast allen untersuchten Pilzen überwogen trans-Verbenol und Verbenon (Tab. 2-2). Lediglich bei *Meripilus giganteus* und bei *Trametes hirsuta* war Myrtenol Hauptprodukt.

### 2.1.2 Limonen- und $\beta$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*

Für Transformationen anderer Monoterpenkohlenwasserstoffe wurde *P. sapidus* ausgewählt, da er in den vorhergehenden Versuchen mit  $\alpha$ -Pinen die besten Transformationsergebnisse erzielt hatte.

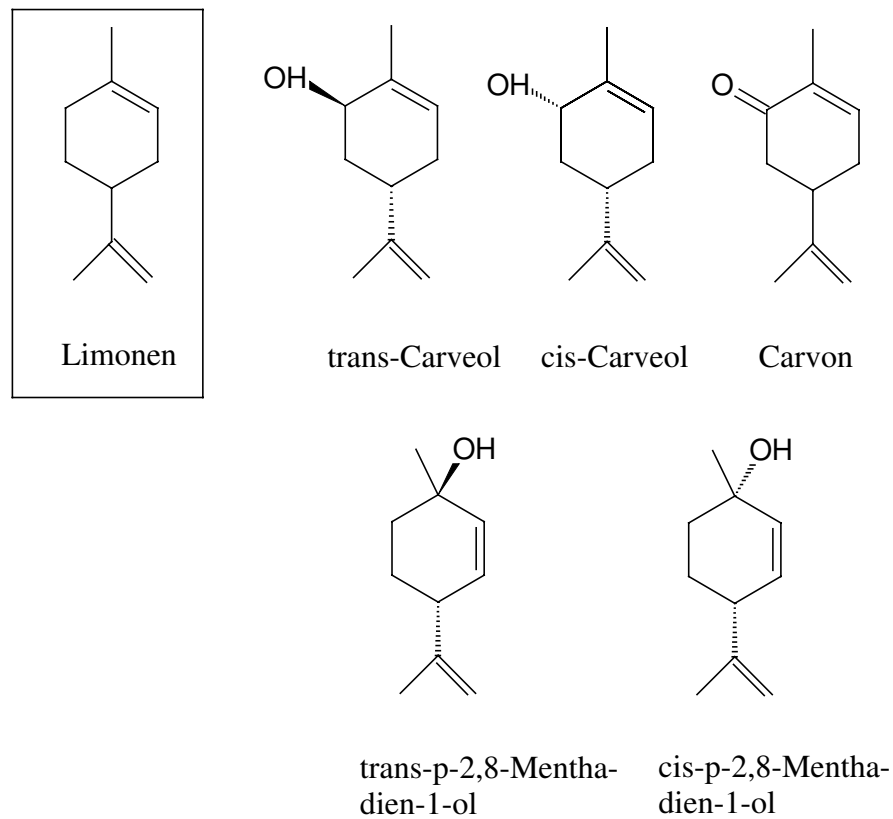
Die Transformation von **Limonen** (Tab. 2-3) ergab die allylischen Alkohole cis- und trans-Carveol als Hauptprodukte (Abb. 2-2). Daneben trat Carvon, das korrespondierende Keton, auf.

Außerdem wurden noch cis- und trans-p-2,8-Menthadien-1-ol gebildet. Dabei handelt es sich um die allylischen Alkohole, die nach Umlagerung der 1,2-Doppelbindung des Limonens und Hydroxylierung am C-1 entstehen.

**$\beta$ -Pinen** (Tab. 2-4 und Abb. 2-3) wurde ebenfalls zu den korrespondierenden allylischen Alkoholen oxidiert: Das Hauptprodukt trans-Pinocarveol entsteht durch direkte Hydroxylierung und Myrtenol in etwas geringerer Menge durch Umlagerung der exocyclischen Doppelbindung in den Ring und Hydroxylierung der Methylgruppe. Als weitere Produkte wurden 3-Pinanon und trans-Myrtanol identifiziert.

**Tab. 2-3:** Transformation von R-(+)-Limonen durch *P. sapidus*  
(48 h Transformationsdauer)

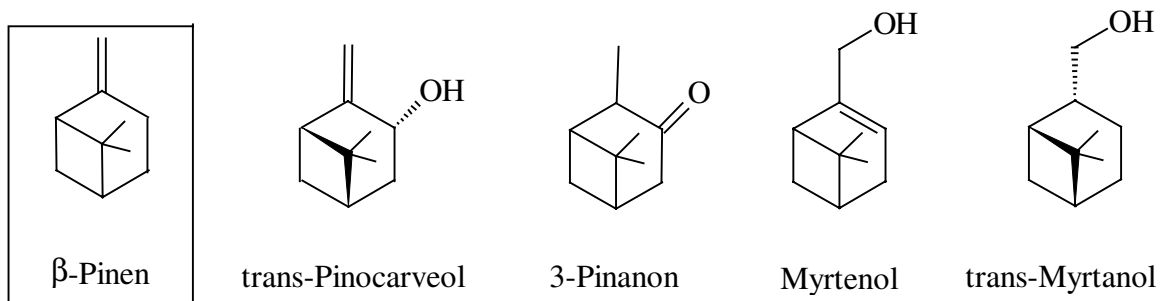
| Substanz                    | Identifizierung | KI<br>(CW 20M) | Lit.-KI<br>(CW 20M)<br>[15, 16, 17] | [mg L <sup>-1</sup> ] |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|
| trans-p-2,8-Menthadien-1-ol | MS, KI          | 1629           | 1622                                | 4,37                  |
| cis-p-2,8-Menthadien-1-ol   | MS, KI          | 1673           | 1665                                | 4,44                  |
| Carvon                      | Std., MS, KI    | 1715           | 1715                                | 3,19                  |
| trans-Carveol               | Std., MS, KI    | 1839           | 1824                                | 7,12                  |
| cis-Carveol                 | Std., MS, KI    | 1866           | 1858                                | 8,76                  |



**Abb. 2-2:** R-(+)-Limonen-Transformation durch *P. sapidus*

**Tab. 2-4:** Transformation von (-)- $\beta$ -Pinen durch *P. sapidus*  
(48 h Transformationsdauer)

| Substanz                 | Identifizierung | KI (CW 20M) | Lit.-KI (CW 20M) [15, 16, 17] | [mg L <sup>-1</sup> ] |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| <b>3-Pinanon</b>         | MS, KI          | 1524        | 1524                          | 4,86                  |
| <b>trans-Pinocarveol</b> | Std., MS, KI    | 1650        | 1676                          | 7,47                  |
| <b>Myrtenol</b>          | Std., MS, KI    | 1788        | 1779                          | 6,47                  |
| <b>trans-Myrtanol</b>    | Std., MS        | 1857        | -                             | 0,83                  |



**Abb. 2-3:**  $\beta$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*

Außerdem wurde untersucht, ob *P. sapidus* in der Lage ist, Sesquiterpenkohlenwasserstoffe zu transformieren. Dabei zeigte sich, daß beim Einsatz von Valencen als Substrat keine Produktmengen auftraten, die über den chemischen Blindwert hinausgingen.

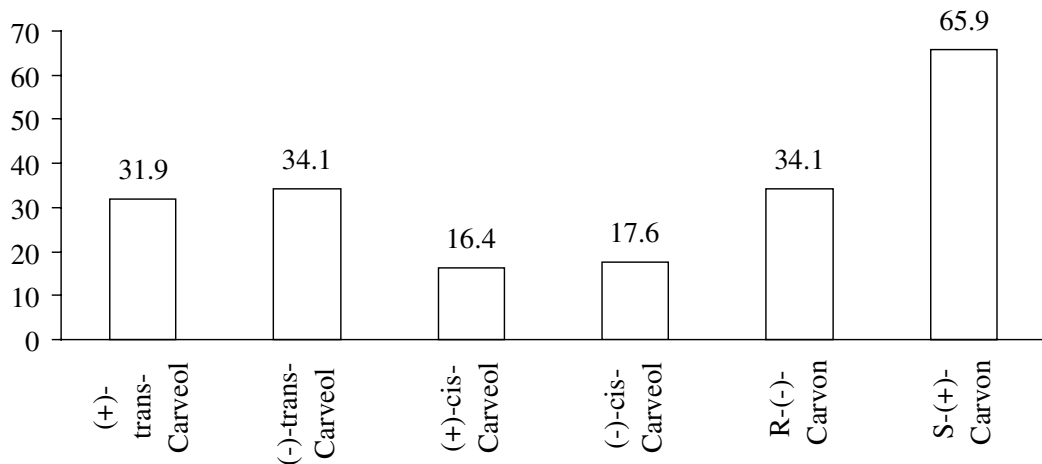
### 2.1.3 Enantiomerenverteilung der Limonen-Transformationsprodukte

Die Enantiomerenverteilung der Transformationsprodukte aus enantiomerenreinen Limonenen wurde gaschromatographisch unter Verwendung einer chiralen Trennphase untersucht. Die Abb. 2-4 und 2-5 zeigen, daß sowohl bei R-(+)-Limonen als auch bei S-(-)-Limonen im ersten Oxidationsschritt bei den cis- und trans-Carveolen eine Racemisierung auftrat. Nach der weiteren Oxidation zum Carvon wurde bevorzugt das S-(+)-

Carvon (67,5 bzw. 65,9%) gebildet, unabhängig davon, ob als Substrat R-(+)- oder S-(-)-Limonen eingesetzt worden waren.

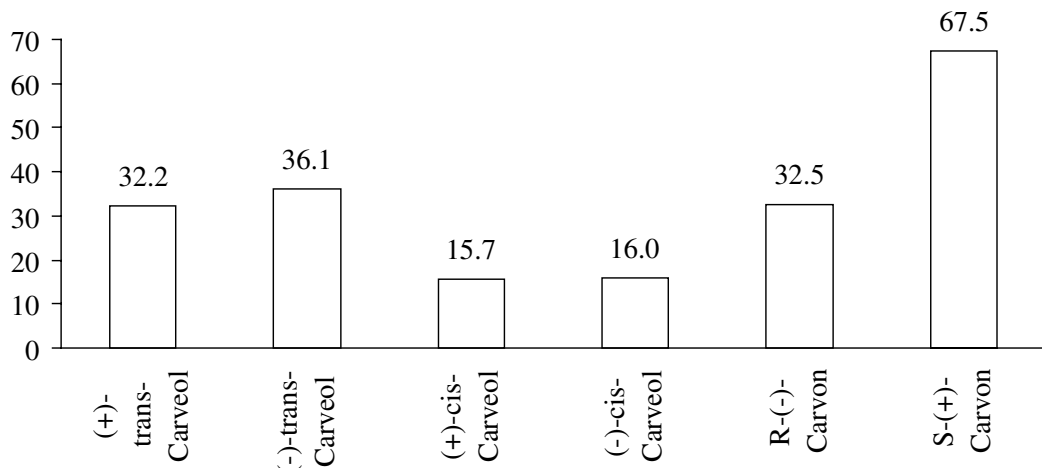
Eine gewisse Enantioselektivität der Limonentransformation durch *P. sapidus* konnte folglich nur im zweiten oxidativen Schritt beobachtet werden. Aufgrund des bei beiden Substraten festgestellten Überschusses des S-(+)-Enantiomers war eine gezielte Gewinnung enantiomerenreiner R-(-)- bzw. (S)-(+)-Carvone allerdings nicht möglich.

[%] Enantiomerenanteil



**Abb. 2-4:** Enantiomerenverteilung der Transformationsprodukte bei der Transformation von R-(+)-Limonen durch *P. sapidus* (Carveole: [%]-Angaben bezogen auf die Gesamt-Carveolmenge)

[%] Enantiomerenanteil



**Abb. 2-5:** Enantiomerenverteilung der Transformationsprodukte bei der Transformation von R-(-)-Limonen durch *P. sapidus* (Carveole: [%]-Angaben bezogen auf die Gesamt-Carveolmenge)

### **Teilzusammenfassung 2.1.1 bis 2.1.3**

- Die Transformationen des Monoterpenkohlenwasserstoffes  $\alpha$ -Pinen durch 6 verschiedene Basidiomyceten ergab die Monoterpenalkohole trans-Verbenol und Myrtenol sowie das Monoterpenketon Verbenon als Hauptprodukte in Konzentrationen von bis zu 10 mg L<sup>-1</sup>.
- *P. sapidus* bildete die größten Produktmengen aus  $\alpha$ -Pinen. Er transformierte Limonen zu cis/trans-Carveol als Hauptprodukt und zu dem korrespondierenden Keton (Carvon) als Nebenprodukt.  $\beta$ -Pinen wurde zu dem allylischen Alkohol trans-Pinocarveol als Hauptprodukt und dem korrespondierenden Keton (3-Pinanon) transformiert.
- Die Untersuchung der Enantiomerenverteilung bei der Transformation enantiomerenreiner Limonene ergab eine Racemisierung im ersten oxidativen Schritt (Carveole) und im zweiten Schritt einen Enantiomerenanteil von 66-68% für S-(+)-Carvon, der unabhängig von der Stereochemie des eingesetzten Substrates war.

#### **2.1.4 Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel bei den $\alpha$ -Pinen- und Limonen-Transformationen durch *P. sapidus***

##### **2.1.4.1 $\alpha$ -Pinen-Verteilung nach direkter Substratdosierung**

Lipophile Stoffe wie Monoterpenkohlenwasserstoffe lösen sich bevorzugt in Zellmembranen. Bei der Dosierung in eine Submerskultur ist daher zu erwarten, daß das Substrat bevorzugt aus der wäßrigen Phase in die Zellmembranen übergeht und dort bis zu Metabolisierung gelöst bleibt, bzw. nach Rückdiffusion in die wäßrige Phase über die Gasphase verloren geht.

Ziel des Versuches war es, die Verteilung von Substrat und Produkten zwischen wäßriger Phase und Myzelphase im Verlauf der Transformation zu untersuchen.

Dazu wurde die Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch getrennte Aufarbeitung des Mediums und des Myzels von *P. sapidus* genauer untersucht. Die Substratzugabe erfolgte zur Verminderung der Toxizität in zwei Dosen von je 100  $\mu$ L (= 0,63 mmol = 85,8 mg) je 100 mL Kultur am 3. und 4. Kulturtag (= Tag 0 und 1 der Transformation).

Aus Abb. 2-6 ist ersichtlich, daß das in die Kultur dosierte  $\alpha$ -Pinen sich bevorzugt im Myzel löste, höchstwahrscheinlich in den lipophilen Zellmembranen.

Die Abnahme des Pinengehaltes im Myzel verlief nicht parallel zu einer entsprechenden Produktbildung. Dieses Ergebnis sowie die erhebliche Lücke in der Substratbilanz sind auf die hohe Flüchtigkeit von  $\alpha$ -Pinen zurückzuführen.

Tab. 2-5 zeigt, daß während der Produktbildungsphase (1. und 2. Transformationstag) die Pinenmenge im Mittel in etwa 100-fachem Überschuß *im Myzel* vorlag. Im weiteren Kulturverlauf trat keine Produktbildung mehr auf, und der Verteilungskoeffizient Myzel/Medium nahm aufgrund von Gasphasenverlusten auf ca. 26 ab.

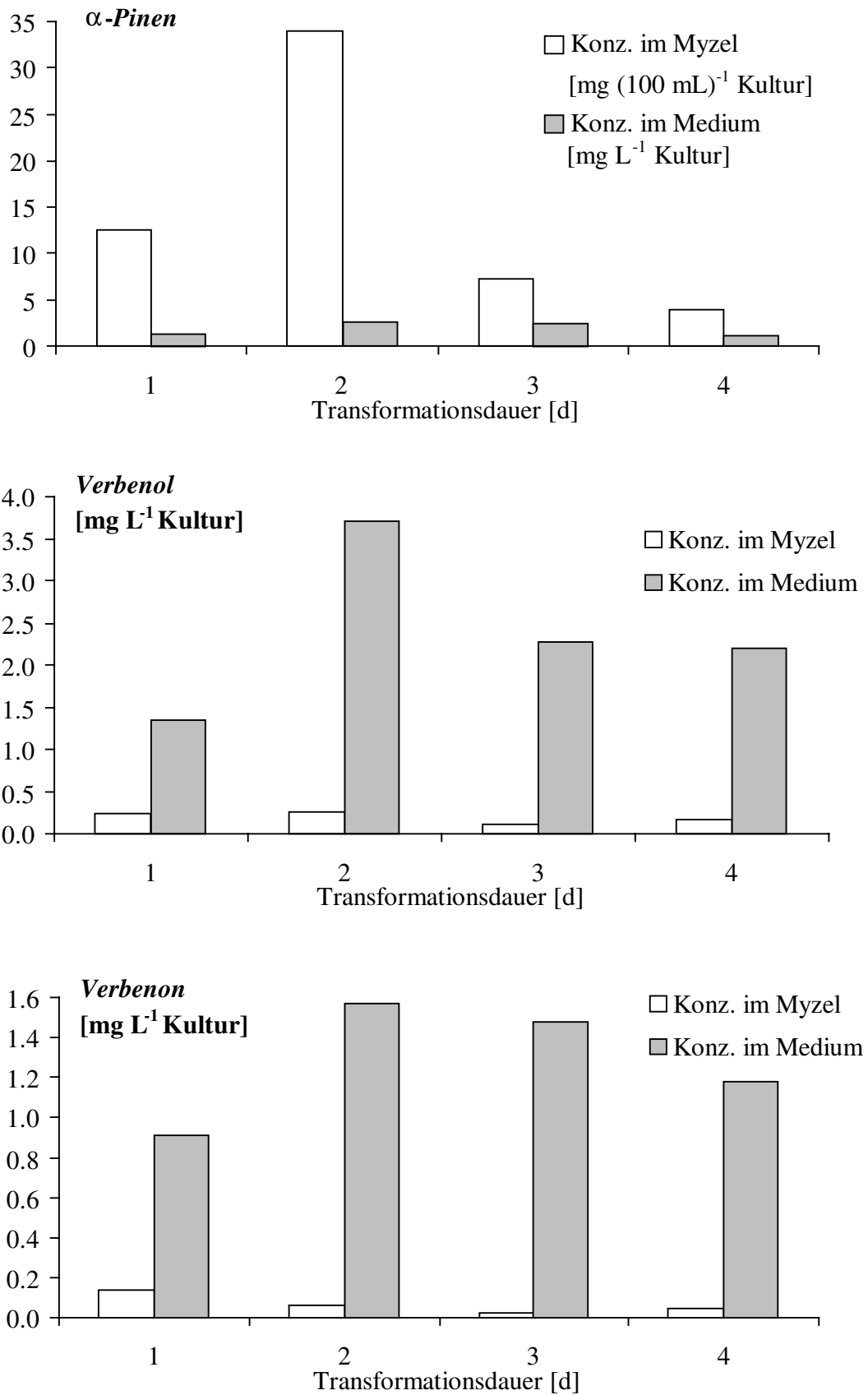
Auf der Produktseite waren die Verhältnisse denen auf der Substratseite genau entgegengesetzt, d.h. die Produkte fanden sich im Kulturverlauf in 10-20-fachem Überschuß *im Medium* wieder.

**Tab. 2-5:** Verteilung von  $\alpha$ -Pinen zwischen Medium und Myzel

| Transform.-<br>dauer [d] | Myzel                           |                        | Medium                          |                        | Verteilungskoeff.<br>Myzel /Medium |
|--------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|
|                          | [mg L <sup>-1</sup> ]<br>Kultur | [%] der<br>dos. Menge* | [mg L <sup>-1</sup> ]<br>Kultur | [%] der<br>dos. Menge* |                                    |
| 1                        | 125                             | 14,0%                  | 1,38                            | 0,16%                  | 87,1                               |
| 2                        | 340                             | 18,0%                  | 2,70                            | 0,16%                  | 114,2                              |
| 3                        | 73                              | 3,5%                   | 2,42                            | 0,14%                  | 25,1                               |
| 4                        | 40                              | 1,7%                   | 1,11                            | 0,06%                  | 26,5                               |

\* Die Zunahme der Pinenmenge von Tag 1 auf Tag 2 ist auf die 2. Pinendosierung von 100  $\mu$ L zurückzuführen.

Um eine weitere Differenzierung der Substrat- und Produktverteilung im Myzel vorzunehmen, wurde in einem weiteren Ansatz aus dem Myzelaufschluß eine *cytosolische* und eine *Membran-/Zellbruchstück-Fraktion* gewonnen und gaschromatographisch untersucht.



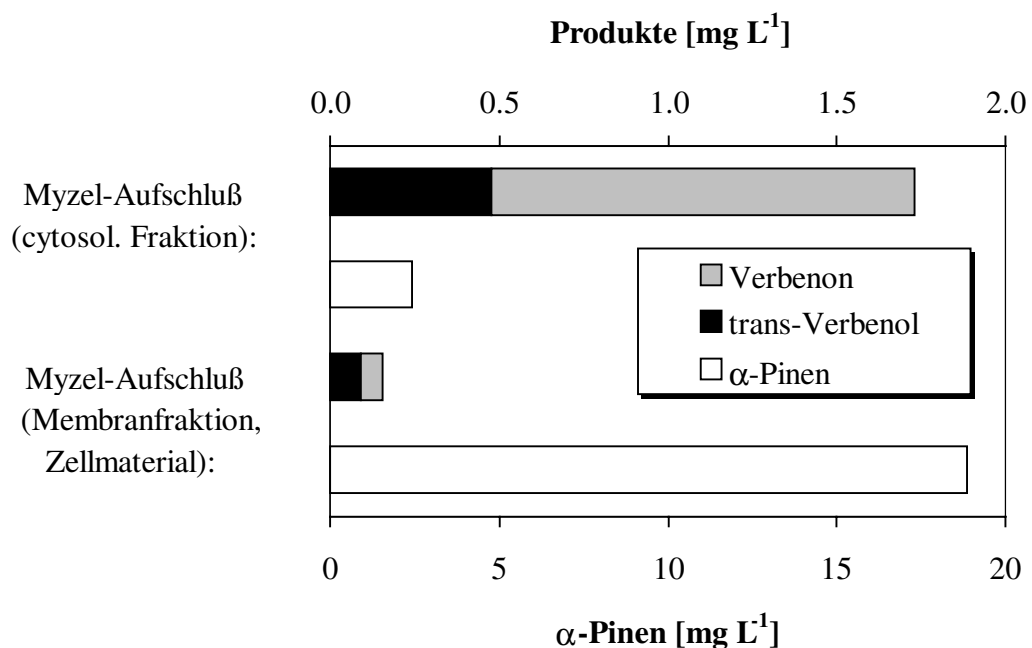
**Abb. 2-6:** Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel im Verlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*



Wie Abb. 2-7 zu entnehmen ist, verteilten sich Substrat und Produkte *innerhalb des Myzels* wie folgt:

- $\alpha$ -Pinen lag zu etwa 90 % in der *Membran-/Zellmaterial-Fraktion* vor
- die Produkte (trans-Verbenol, Verbenon) waren dagegen zu etwa 90 % in der *cytosolischen Fraktion* gelöst.

Da eine vollständige und artefaktfreie Trennung der cytosolischen und der Membranfraktion nicht möglich war, dürften die realen Verhältnisse noch deutlicher für eine Akkumulation des Kohlenwasserstoffes in der Membranfraktion sprechen.



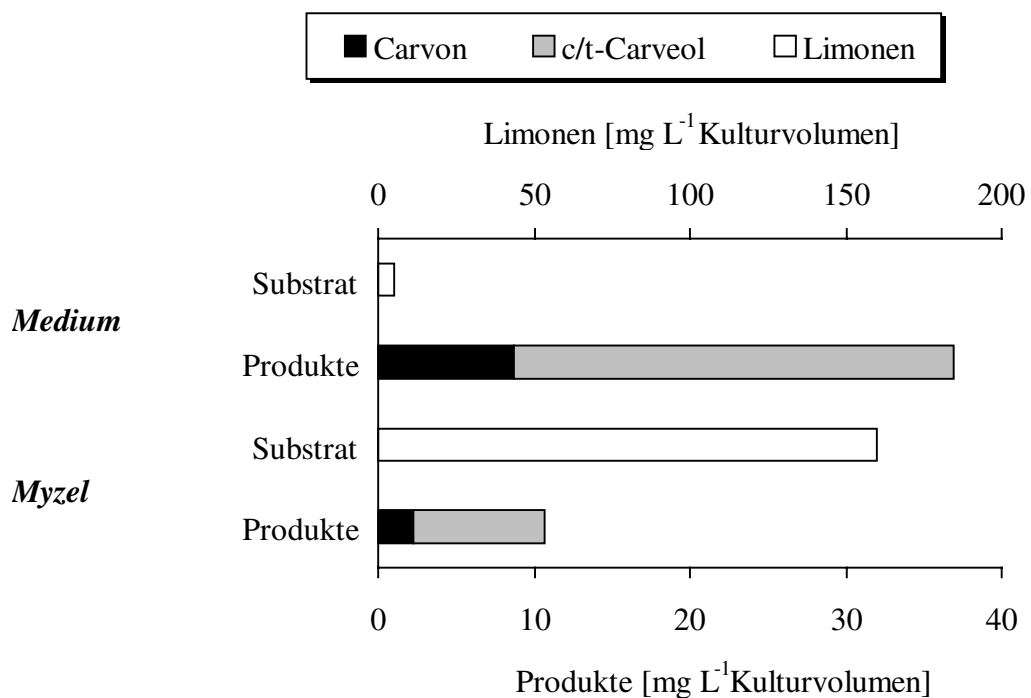
**Abb. 2-7** Differenzierung der Substrat-/Produktverteilung in verschiedenen Myzelfraktionen (3 Tage Transformationsdauer, *P. sapidus*)

#### 2.1.4.2 Limonen-Verteilung nach Substratzugabe über die Gasphase

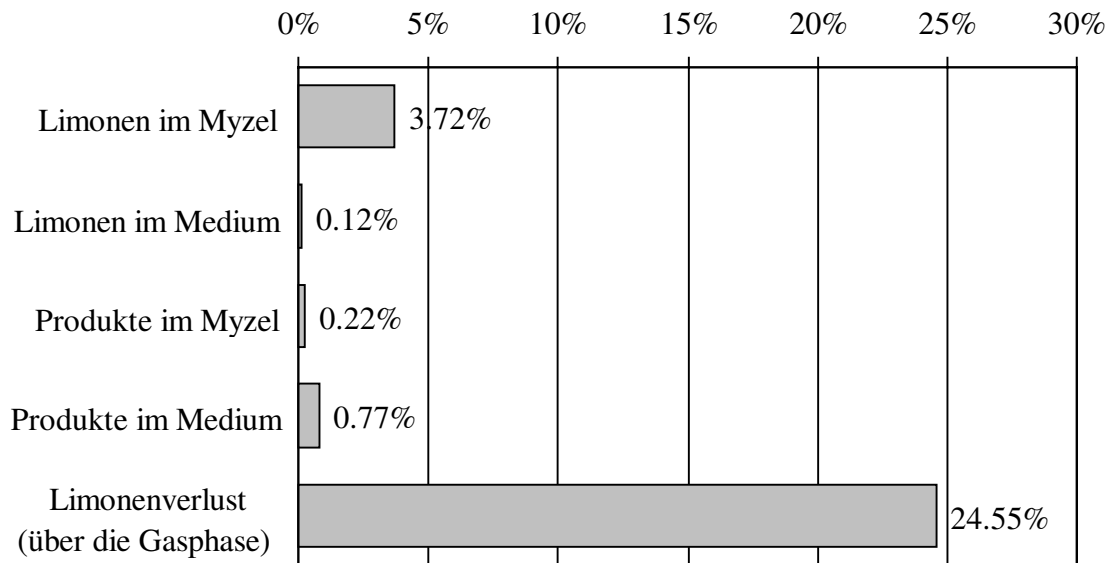
Eine Zudosierung des Substrates Limonen über die Gasphase (Reservoir mit 500  $\mu$ L) führte im Hinblick auf die Verteilung zwischen Myzel und Kulturmedium zu äquivalenten Ergebnissen wie die direkte Dosierung von  $\alpha$ -Pinen. Abb. 2-8 zeigt, daß die Substratmenge im Myzel mit ca. 160 mg L<sup>-1</sup> etwa um Faktor 5 über dem Wert für Pinen

nach 2 Transformationstagen lag (vgl. Abb. 2-6). Dies ist auf die permanente Sättigung der Gasphase durch das verwendete Gasphasenreservoir zurückzuführen.

In dieser Versuchsreihe wurden auch die Limonenverluste über die Gasphase innerhalb von 2 Transformationstagen quantifiziert. Abb. 2-9 zeigt, daß ein großer Anteil des eingesetzten Substrates (24,5 %) über die Gasphase verloren ging, während ein Anteil von 4,8 % (Summe von Substrat + Produkten im Medium und Myzel) in der Submerskultur wiedergefunden wurde. Die Restmenge von 70,6% befand sich nach dieser Transformationsdauer noch im verwendeten Gasphasenreservoir.



**Abb. 2-8:** Verteilung des Substrates und der Produkte bei der Limonen-Transformation durch *P. sapidus* (2 Tage Transformationsdauer)



**Abb. 2-9:** Verteilung von Substrat und Produkten (Carveol + Carvon) sowie Gasphasenverluste (500  $\mu\text{L}$  Limonen im Gasphasenreservoir, 2 Tage Transformationsdauer, [%]-Angaben bezogen auf die Stoffmengen)

#### Teilzusammenfassung 2.1.4

- Die separate Untersuchung von Myzel und Medium ergab sowohl für die  $\alpha$ -Pinen-Transformation (direkte Dosierung) als auch für Limonen-Transformation (Gasphasendosierung), daß die Substrate zum größten Teil im Myzel gelöst wurden, während die oxyfunktionalisierten Produkte bevorzugt im Medium vorlagen.
- Eine weitere Trennung des Myzels in eine cytosolische und eine Membran/Zellmaterialfraktion ergab, daß die Substrate bevorzugt in der Membranfraktion waren und die Produkte in der cytosolischen Fraktion.
- Die Erstellung einer Massenbilanz ist im offenen System (belüfteter Kolben) aufgrund der großen Substratverluste über die Gasphase schwierig. Vom eingesetzten Limonen gingen innerhalb von 2 Tagen fast 25% verloren.

⇒ Fazit: Für die Produktgewinnung ist eine Aufarbeitung des Myzels nicht notwendig, da die Produkte zum größten Teil in das Medium abgegeben werden. Die Akkumulation der Substrate in den Membranen erklärt die toxische Wirkung auf *P. sapidus*.

### 2.1.5 Untersuchung der Kulturen von *P. sapidus* auf weitere Metabolisierung der primären Transformationsprodukte

Neben der Oxyfunktionalisierung zu Transformationsprodukten mit einer oder mehreren Hydroxy-, Keto- oder Aldehydgruppen ist die weitere Oxidation zu den entsprechenden Carbonsäuren denkbar. Aus diesem Grund wurden Kulturen von *P. sapidus* nach 1, 2, 3, 4, und 6 Tagen  $\alpha$ -Pinen-Transformationszeit auf saure Transformationsprodukte hin untersucht. Dazu wurden Säuren und Myzel nach dem neutralen Extraktionsschritt noch sauer extrahiert und die erhaltenen sauren Extrakte methyliert.

Bei der GC-MS-Auswertung konnten keine sauren Produkte identifiziert werden, die als Abbauprodukte des  $\alpha$ -Pinsens in Frage kamen.

Neben der weiteren Oxidation der primären Transformationsprodukte ist auch eine Konjugation mit hydrophilen Gruppen (Mono- oder Disaccharide, Sulfat u.a.) möglich. Dabei entstehen nichtflüchtige Produkte, die nur nach Derivatisierung (Silylierung, Acetylierung) der funktionellen Gruppen gaschromatographisch zu analysieren wären. Da diese Derivatisierungen bei Terpenen zur Artefaktbildung führen können und eine GC-MS-Auswertung der Substanzen erschwert wird, wurde ein anderer Weg gewählt: Durch Adsorption aus der wässrigen Phase an makroporöses Styrol-Divinylbenzol-Harz (Lewatit OC 1064) wurden lipophile Substanzen aus dem Kulturmedium und separat aus dem Myzel (Sammelproben 1, 2, 3, 4 und 7 Tage nach Transformationsbeginn) gewonnen und mittels HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) im Normalphasenmodus (Diolsäule) auf nichtflüchtige Komponenten hin untersucht.

Ein Vergleich der Chromatogramme von Transformationskulturen mit dem Blindwert (d.h. Pilzkultur ohne Limonenzusatz) ergab für Medium und Myzel keine Unterschiede im chromatographischen Bild der nichtflüchtigen Bestandteile (Chromatogramme nicht abgebildet). Eine Bildung nichtflüchtiger Transformationsprodukte konnte bei *P. sapidus* folglich nicht festgestellt werden.

## 2.1.6 Untersuchung von Terpenblindwerten

### 2.1.6.1 Substratreinheit

Verunreinigungen in den für die Transformation verwendeten Monoterpenkohlenwasserstoffen kommen als Ursache für erhöhte Blindwerte in Betracht.

Die gängigen Monoterpene sind in einer Reinheit von mindestens 98% kommerziell erhältlich. Als Verunreinigungen können außer Nebenbestandteilen des für die Herstellung verwendeten Rohstoffes (z.B. ätherische Öle aus Koniferenharzen oder Orangenschalen) auch während der Lagerung entstandene Autoxidations- oder Umlagerungsprodukte enthalten sein. Art und Menge der Verunreinigungen unterscheiden sich bei verschiedenen Terpenen – auch chargenabhängig – deutlich (s. Tab. 2-6).

Selbst geringe Gehalte an Verunreinigungen führen bei der Verwendung für Biotransformationen zu meßbaren Blindwerten, die von den enzymatisch gebildeten Produkten subtrahiert werden müssen. Eine weitere Aufreinigung der Substrate für Terpentransformationen ist z.B. durch Destillation möglich; da jedoch auch im Verlauf der Kultivierung eine nichtenzymatische Produktbildung auftreten kann, sind parallel zu den Biotransformationsversuchen geführte Blindwerte sinnvoller.

**Tab. 2-6:** Verunreinigungen verschiedener kommerziell erhältlicher  $\alpha$ -Pinene [%]

|  | <i>tr-Verbenol</i> | <i>Verbenon</i> | <i>Myrte-<br/>nol</i> | <i>Myr-<br/>tenal</i> | <i><math>\alpha</math>-Terpineol</i> | <i><math>\alpha</math>-Fenchol</i> |
|--|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>(±)-<math>\alpha</math>-Pinen I*</b><br>(98%, Aldrich)  | 0,02               | 0,01            | 0,01                  | -                     | -                                    | -                                  |
| <b>(±)-<math>\alpha</math>-Pinen II*</b><br>(98%, Aldrich) | 0,10               | 0,07            | 0,02                  | 0,02                  |                                      |                                    |
| <b>(-)-<math>\alpha</math>-Pinen</b><br>(>97%, Fluka)      | -                  | -               | -                     | -                     | -                                    | -                                  |
| <b>(+)-<math>\alpha</math>-Pinen</b><br>(>97%, Fluka)      | 0,70               | 0,29            | 0,21                  | 0,17                  | 0,01                                 | 0,05                               |

\* unterschiedliche  $\alpha$ -Pinen-Chargen

### 2.1.6.2 pH-Wert-Abhängigkeit der Blindwerte in Standardnährlösung

Da Basidiomyceten den pH-Wert des Kulturmediums im Kulturverlauf je nach Pilzstamm und verwendetem Medium unterschiedlich stark absenken, sind infolge dieses sauren Milieus nichtenzymatische Reaktionen möglich.

Daher wurde das Blindwert-Verhalten von  $\alpha$ -Pinen in SNLH-Medium bei den pH-Werten 3,0 / 3,5 / 4,0 / 5,0 / 6,0 und 7,0 untersucht. Die Substratblindwerte (d.h. Verunreinigungen des eingesetzten Substrates) wurde von den hier angegebenen Werten bereits subtrahiert.

Abb. 2-10 bis Abb. 2-13 zeigen den Zeitverlauf innerhalb einer Woche für  *$\alpha$ -Terpineol*, *trans-Verbenol*, *Verbenon* und *Myrtenol*.

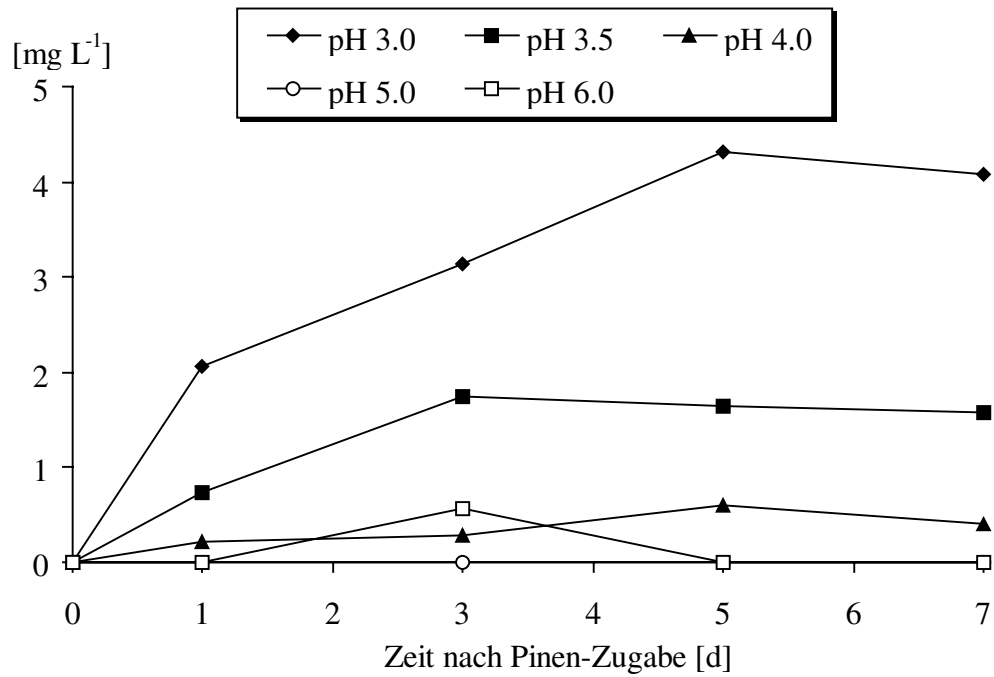
Die Bildung von  *$\alpha$ -Terpineol* erfolgte bei den pH-Werten 3,0 bzw. 3,5 in Konzentrationen bis zu 4,5 bzw. 1,8 mg L<sup>-1</sup>. Bei höheren pH-Werten lagen die Gehalte dagegen unter 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

*Trans-Verbenol* wurde in höheren Konzentrationen von 2,5-4 mg L<sup>-1</sup> bei den pH-Werten 5,0 / 6,0 und 7,0 am 5. und 7. Tag gefunden.

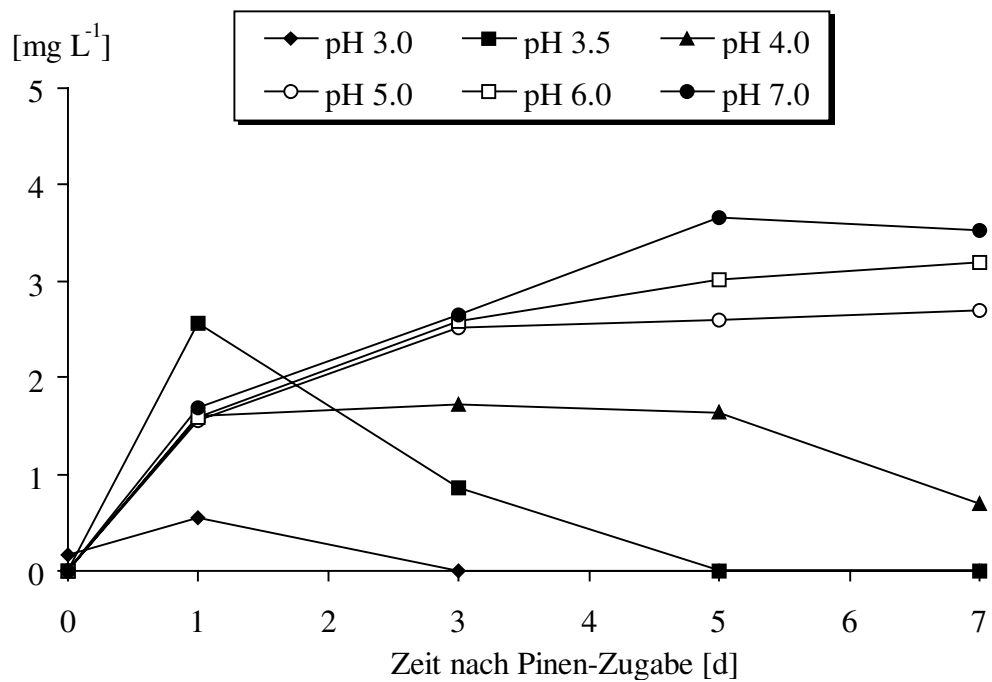
Bei den pH-Werten 3,0 und 3,5 trat nach einem Tag ein Maximum auf, danach nahmen die Gehalte wieder ab. Dies könnte auf einen säurekatalysierten Abbau des Verbenols zurückzuführen sein.

Ein geringer Teil (ca. 10%) des Verbenols wurde zu Verbenon oxidiert (s. Abb. 2-12), das nur bei den pH-Werten 3,0 und 3,5 im Medium nachgewiesen werden konnte. Die Restmenge an Verbenol wurde zu anderen Verbindungen abgebaut, die aufgrund der geringen Konzentrationen jedoch nicht identifiziert werden konnten.

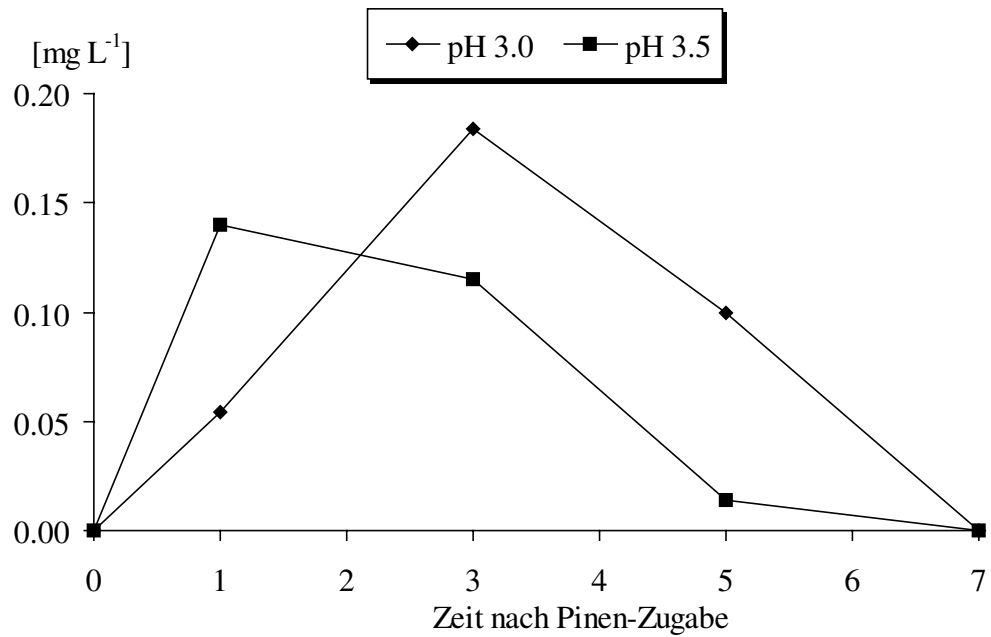
Myrtenol wurde wie – der andere Terpenalkohol Verbenol – bevorzugt bei höheren pH-Werten nachgewiesen. Bei niedrigeren pH-Werten setzte sich das aus dem Pinen gebildete Myrtenol vermutlich so schnell zu weiteren Abbauprodukten um, daß es im Medium nicht mehr nachweisbar war.



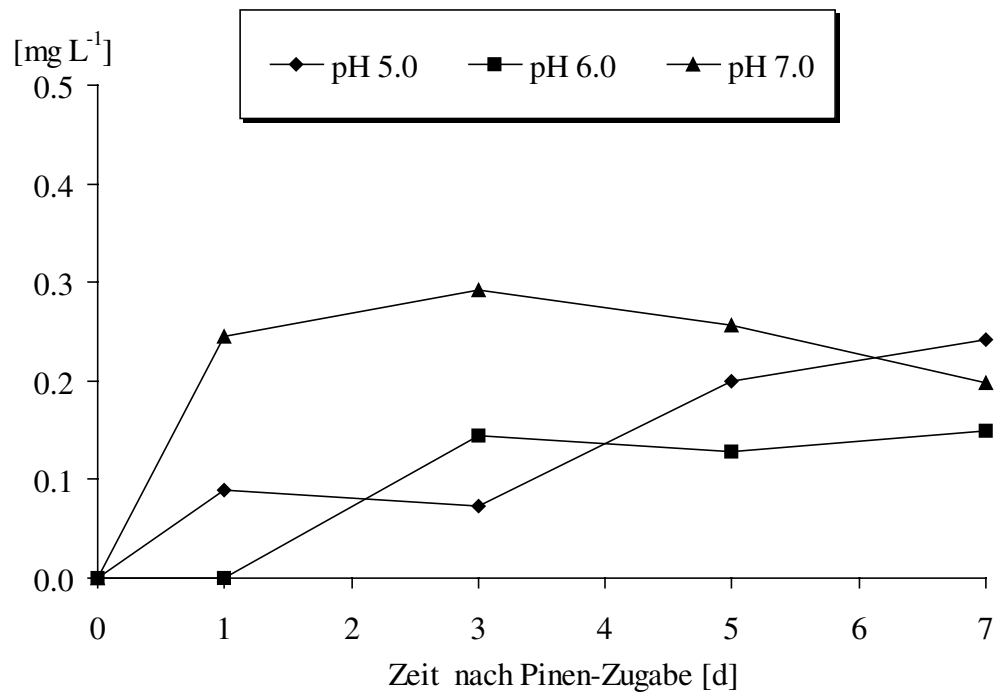
**Abb. 2-10:** Zeitverlauf des  $\alpha$ -Terpineol-Gehaltes im  $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert



**Abb. 2-11:** Zeitverlauf des trans-Verbenol-Gehaltes im  $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert



**Abb. 2-12** Zeitverlauf des Verbenon-Gehaltes im  $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert



**Abb. 2-13:** Zeitverlauf des Myrtenol-Gehaltes im  $\alpha$ -Pinen-Blindwert in Abhängigkeit vom pH-Wert



### 2.1.6.3 Einfluß des Pilzmyzels auf die Blindwertentwicklung

Wie in Abschnitt 2.1.4 erläutert, werden Terpenkohlenwasserstoffe in Submerskulturen von Basidiomyceten bevorzugt im Pilzmyzel gelöst. Bei den im vorigen Abschnitt erläuterten Blindwertversuchen wurde dieser Speichereffekt nicht mit einbezogen, denn unter den gewählten Bedingungen (Blindwerte in wäßrigen Medien) waren schon einen Tag nach der letzten Substratdosierung nur noch ca.  $80 \text{ mg L}^{-1}$   $\alpha$ -Pinen (=4,7 % der eingesetzten Menge) im Medium nachweisbar (vgl. Abb. 2-14).

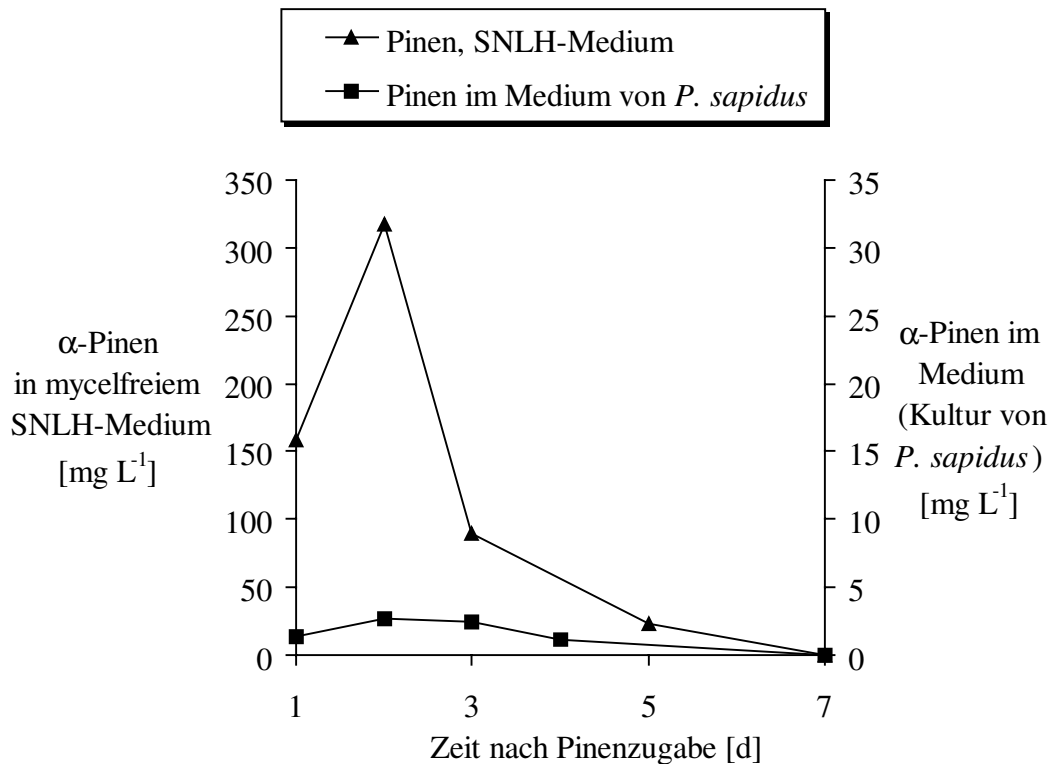
Um festzustellen, ob der Speichereffekt des Pilzmyzels zu einer Erhöhung der Blindwerte führt, wurden 7 Tage alte Submerskulturen von *P. sapidus*, *G. applanatum*, *M. giganteus*, *T. hirsuta* und *G. frondosa* autoklaviert und der pH-Wert bei allen Kulturen unter sterilen Bedingungen auf 5,0 eingestellt. Analog den Biotransformationsversuchen wurden diese Blindwerte mit  $2 \times 100 \mu\text{L}$   $\alpha$ -Pinen pro 100 mL Medium im Abstand von 24 h versetzt.

Abb. 2-14 zeigt, daß der Pinengehalt der wäßrigen Phase im myzelhaltigen Blindwert aufgrund der besseren Löslichkeit in der Myzelphase weit unter den Gehalten im myzel-freien Blindwert lag.

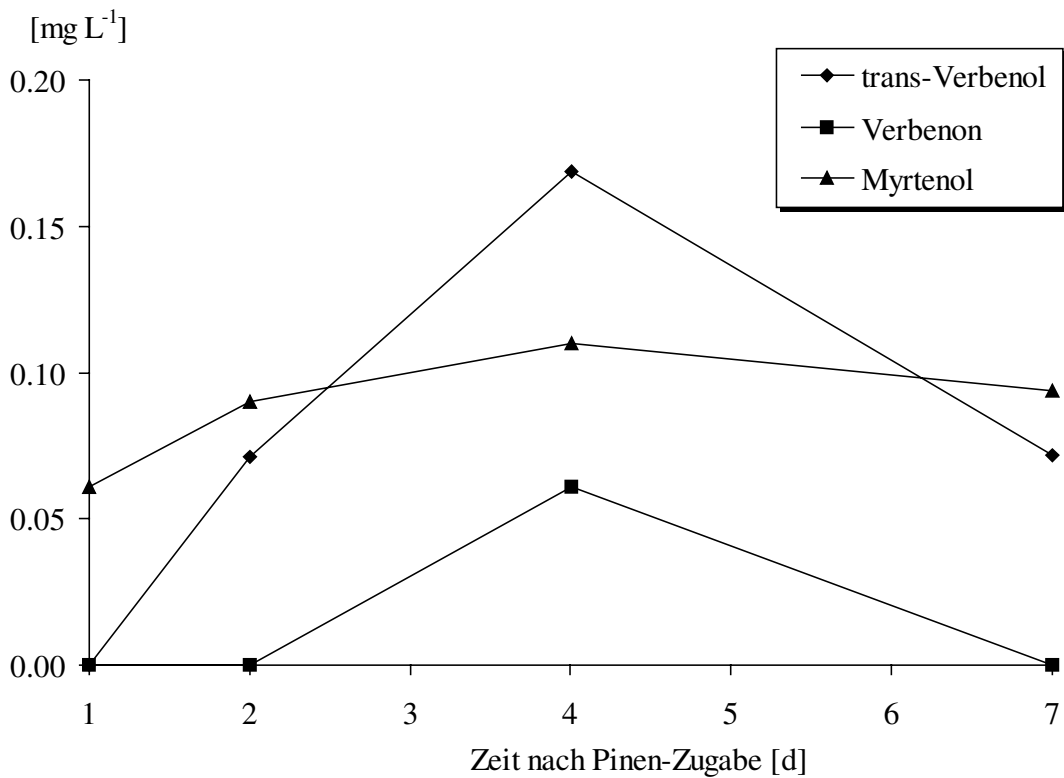
Bei allen Pilzen blieben die Gehalte an oxyfunktionalisierten Terpenen deutlich unter  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Abb. 2-15 bis 2-19). Bei *G. applanatum* lag der max. Verbenolgehalt bei ca.  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ , während er bei allen anderen Pilzen unter  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  blieb.

Kleine Mengen Verbenon (max.  $0,23 \text{ mg L}^{-1}$ ) und Myrtenol (max.  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) waren im Gegensatz zum Blindwertversuch ohne Myzel bei pH 5,0 ebenfalls nachweisbar.

Als Ergebnis ist festzuhalten, daß das Myzel bei einem Vergleich mit den im vorigen Abschnitt dokumentierten Blindwerten auf den Verbenolblindwert einen deutlich senkenden Effekt hatte, jedoch zu einer geringfügigen Erhöhung des Verbenongehaltes führte. Ein Einfluß auf den Myrtenolgehalt im Medium wurde nicht festgestellt.



**Abb. 2-14:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Gehalte in mycelfreiem sowie myzelhaltigem SNLH-Medium (*P. sapidus*, Dosierung von 2 x 100  $\mu$ L an Tag 0 u. 1)



**Abb. 2-15:**  $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von *P. sapidus*

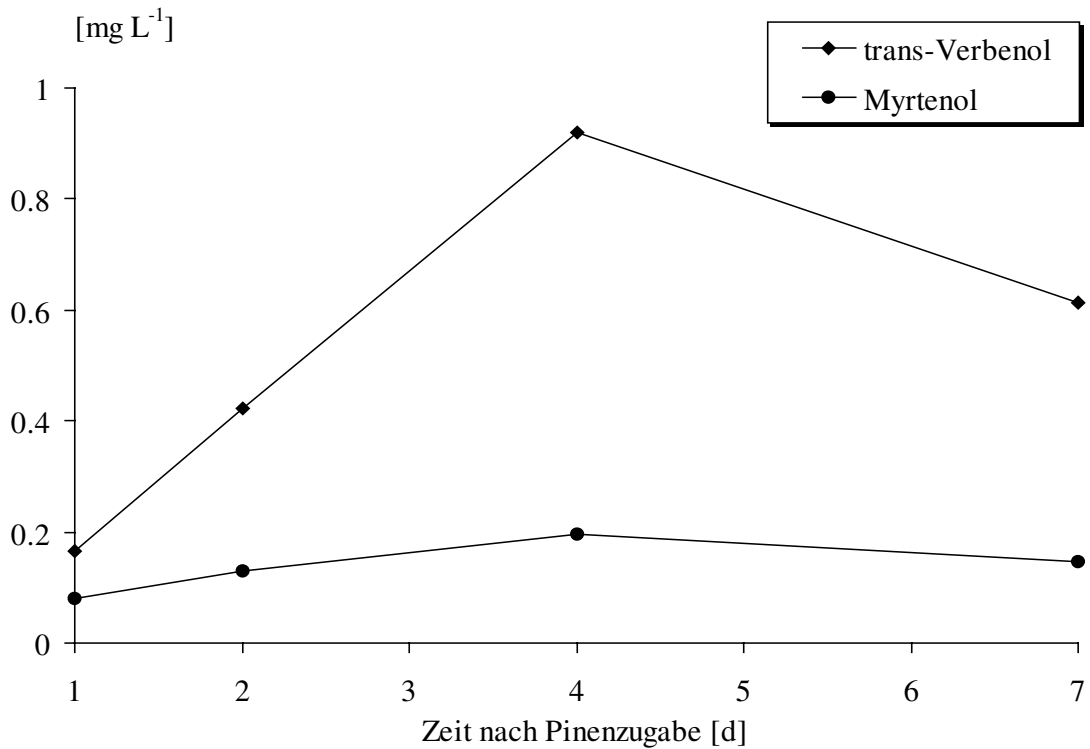


Abb. 2-16:  $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von *G. applanatum*

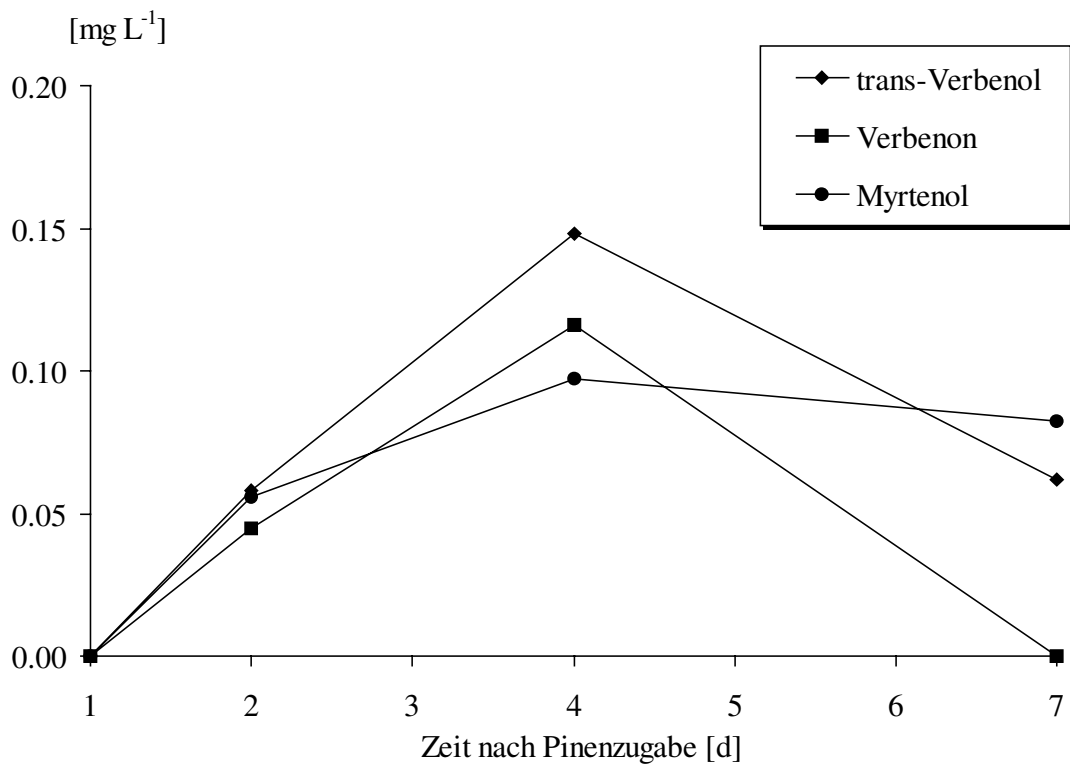


Abb. 2-17:  $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von *M. giganteus*

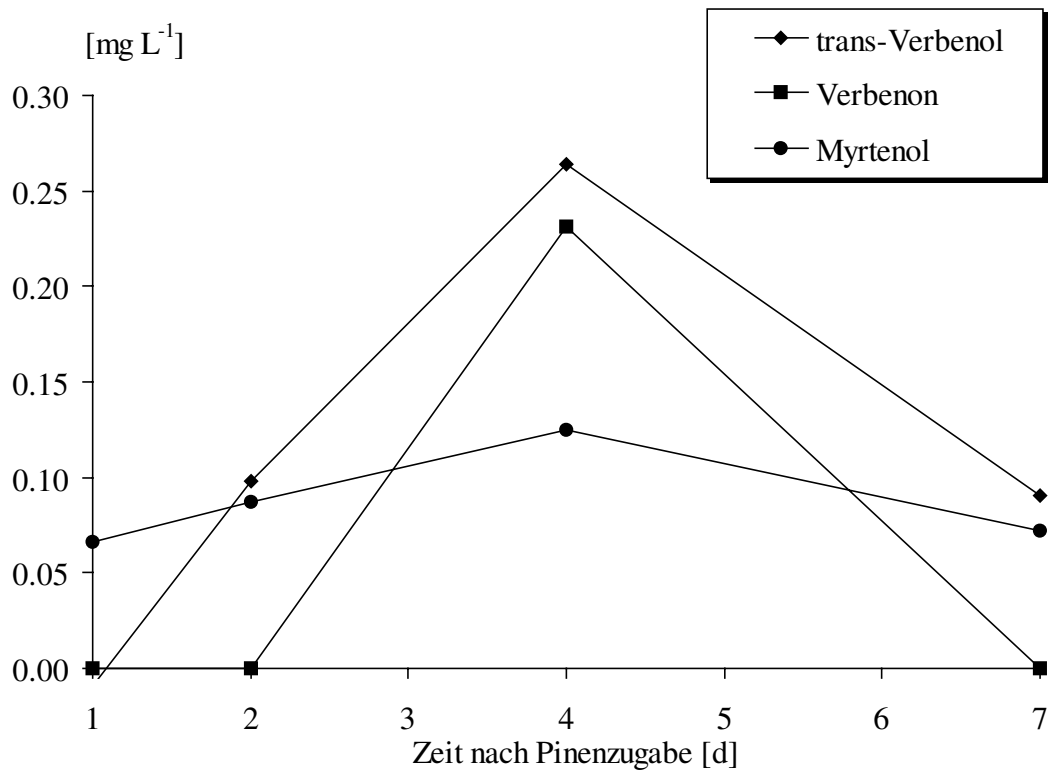


Abb. 2-18:  $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von *T. hirsuta*

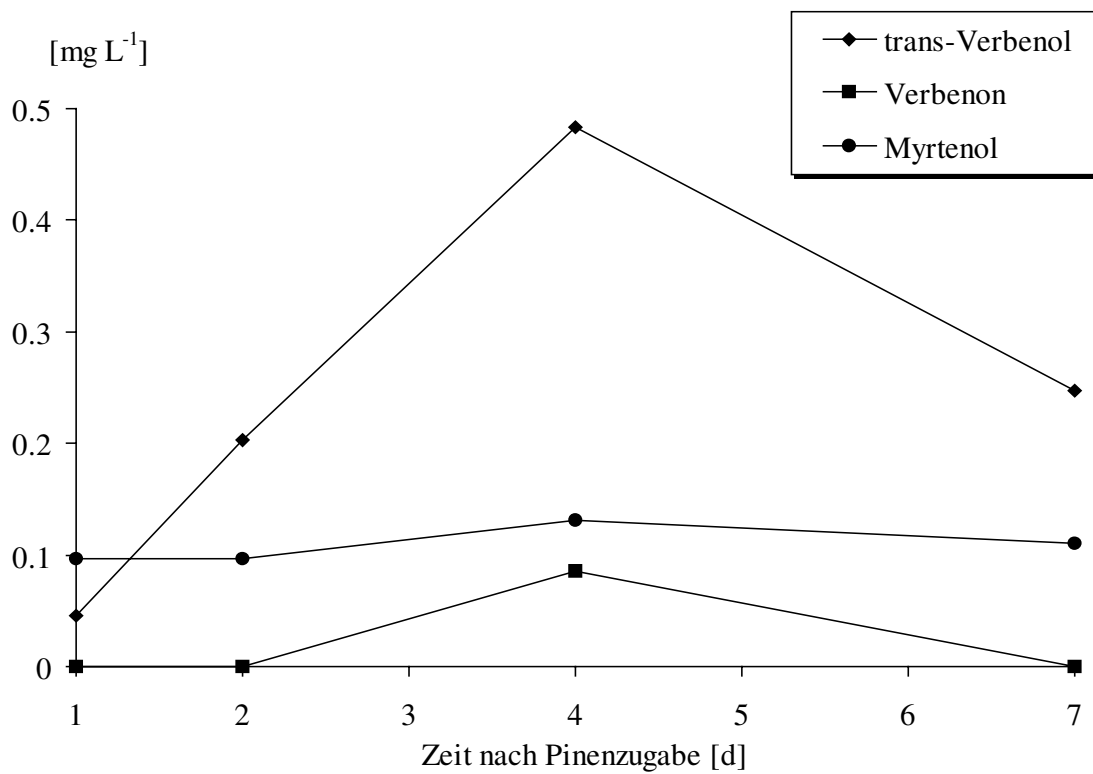
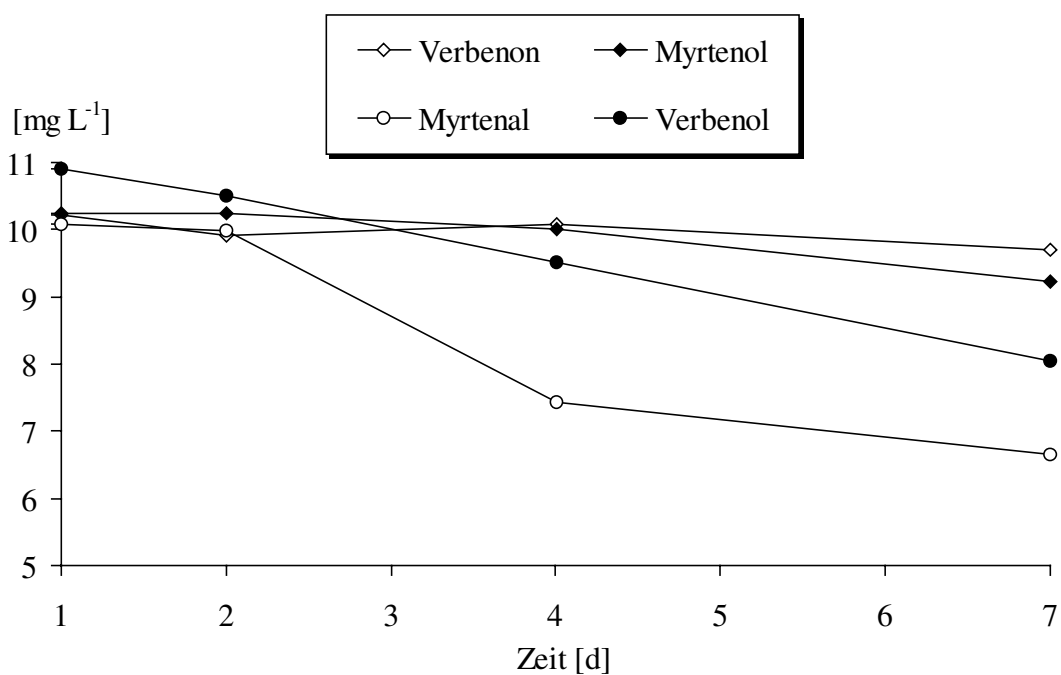


Abb. 2-19:  $\alpha$ -Pinen-Blindwert mit autoklavierter Submerskultur von *G. frondosa*

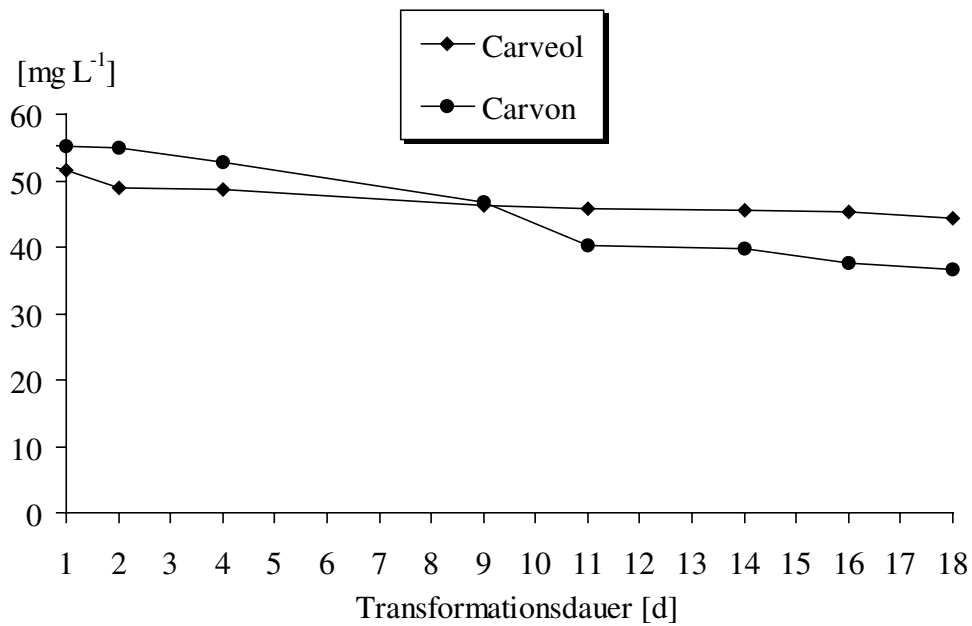
#### 2.1.6.4 Produktverluste im Verlauf der Inkubation

Eine Bilanzierung der leichtflüchtigen Monoterpenkohlenwasserstoffe war aufgrund der großen Verluste im offenen System (Kulturkolben mit Cellulosestopfen) schwierig. Aufgrund der geringeren Flüchtigkeit und der besseren Wasserlöslichkeit stellte dies bei den oxyfunktionalisierten Terpenen dagegen kein Problem dar. Die Verluste über die Gasphase und aufgrund von Reaktionen in wässriger Lösung lagen innerhalb einer Woche für Myrtenol, Verbenol und Verbenon im Bereich von 10 bis max. 20%, bei Myrtenal waren es 30% (Abb. 2-20).

Abb. 2-21 zeigt die Verluste an Carveol und Carvon über einen Zeitraum von 18 Tagen ausgehend von höheren Konzentrationen (53 bzw. 55 mg L<sup>-1</sup>). Nach 7 Tagen hatte die Konzentration um etwa 10% abgenommen.



**Abb. 2-20:** Zeitverlauf der Gehalte an Verbenol, Verbenon, Myrtenol und Myrtenal, gelöst in SNLH-Medium, unter Kulturbedingungen



**Abb. 2-21** Zeitverlauf der Gehalte an Carveol und Carvon, gelöst in SNLH-Medium, unter Kulturbedingungen

### Teilzusammenfassung 2.1.6

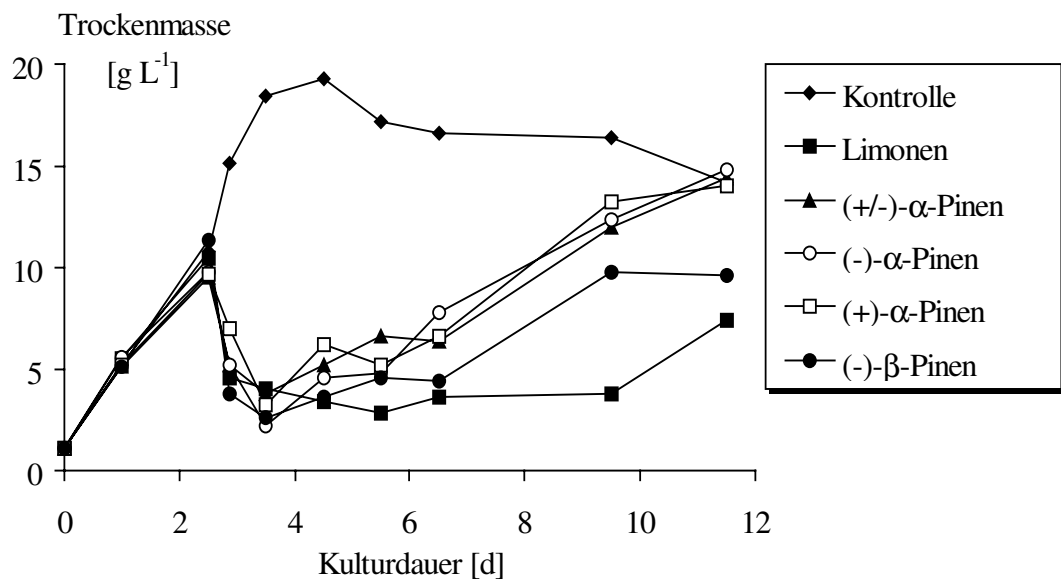
- Einige oxyfunktionalisierte Terpene traten in nicht vernachlässigbaren Mengen in den Blindwerten auf. Dazu gehörten auch einige Biotransformationsprodukte, wie trans-Verbenol, Verbenon und Myrtenol.
  - Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Blindwerte ergab, daß bei pH-Werten <4,0 verstärkt Hydratationsreaktionen (zu  $\alpha$ -Terpineol) auftreten.
  - In myzelhaltigen Medien wurden insgesamt niedrigere Blindwerte festgestellt als in myzelfreien Medien. Dies ist auf die Akkumulation der Terpenkohlenwasserstoffe im Pilzmyzel zurückzuführen.
  - Nennenswerte Produktverluste waren nur bei mehrwöchigen Transformationsdauern festzustellen. Eine chemische Umsetzung dieser Produkte zu weiteren oxyfunktionalisierten Produkten konnte nicht festgestellt werden.
- ⇒ Fazit: Die quantitative Einbeziehung von Substratblindwerten bei Terpen-Biotransformationen erwies sich als notwendig; die Produktstabilität in wäßriger Lösung war dagegen unter den gegebenen Bedingungen ausreichend.

### 2.1.7 Substrat- und Produkttoxizität von Terpenkohlenwasserstoffen, -alkoholen und -ketonen

#### 2.1.7.1 Substrattoxizität

Terpenkohlenwasserstoffe zeigen eine vergleichbare Mikroorganismen-Toxizität wie andere nichtwassermischbare organische Lösungsmittel.

Aus Abb. 2-22 wird deutlich, daß bei *P. sapidus* nach Zugabe der Terpenkohlenwasserstoffe eine starke Trockenmasseabnahme auftrat, die sich nur durch eine Absenkung der zugegebenen Terpendosis verhindern ließ. Ziel von Optimierungsversuchen mußte es daher sein, eine möglichst große Terpenmenge in möglichst kurzer Zeit umzusetzen, ohne dabei die Enzymaktivität sowie die Vitalität der Kulturen zu zerstören.



**Abb. 2-22:** Zeitverlauf der Pilztrockenmasse in Submerskulturen von *P. sapidus* bei Zusatz verschiedener Terpenkohlenwasserstoffe (Zugabe von je 100 µl Terpen pro 100 mL nach 2,5 und 3,5 Tagen)

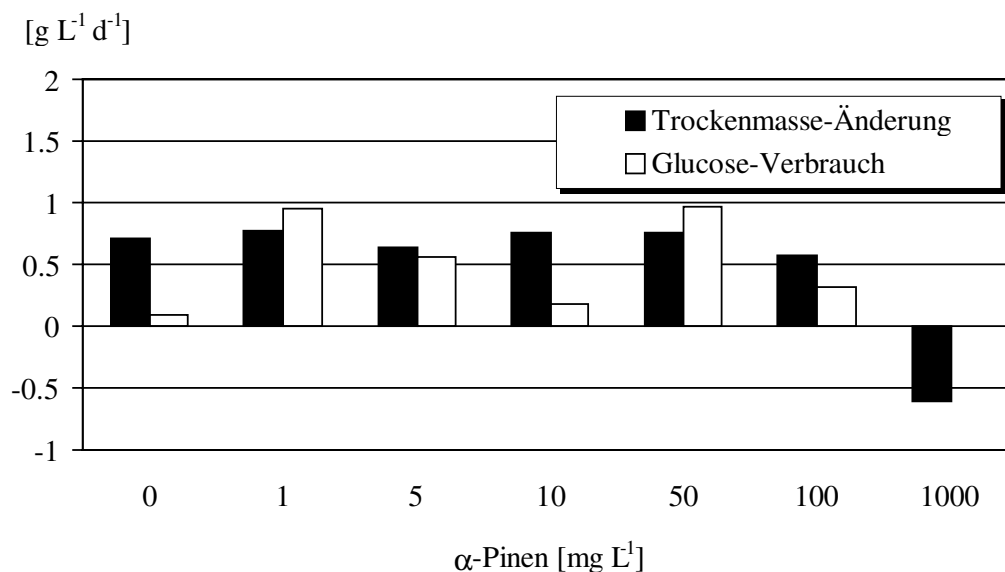
Abb. 2-22 zeigt auch, daß nach einer Kulturzeit von ca. 4 bis 6 Tagen (d.h. einer Transformationsdauer von 2 bis 3 Tagen) die Kulturen wieder anwuchsen, d.h. die Terpene wirkten aufgrund ihrer Membrantoxizität in erster Linie wachstumshemmend („fungistatisch“) und bewirkten keine vollständige Abtötung der Zellen.

Die bei Terpentransformationen eingesetzten Substratmengen liegen im allgemeinen weit über deren wäßrigen Sättigungskonzentrationen. Für  $\alpha$ -Pinen beträgt diese ca.  $5 \text{ mg L}^{-1}$

(vgl. 3.2.4.1, Tab. 3-5). Um festzustellen, in welchem Konzentrationsbereich eine Schädigung der Kulturen auftritt, wurde das  $\alpha$ -Pinen den Submerskulturen von *P. sapidus* und *G. applanatum* in verschiedenen Mengen zugesetzt.

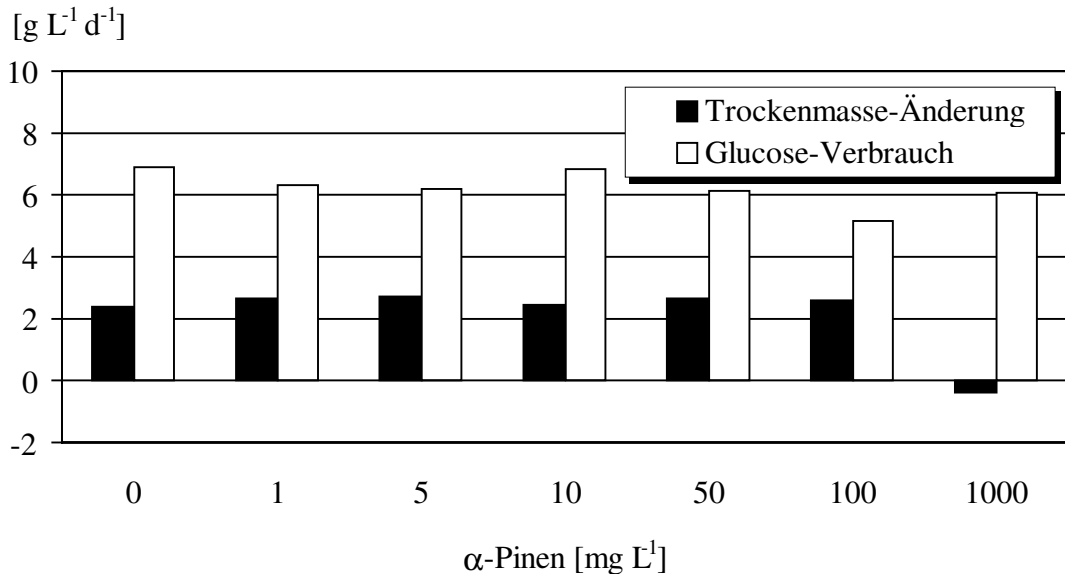
Die Abb. 2-23 und 2-24 zeigen die Trockenmasseänderung und den Glucoseverbrauch innerhalb von 24 Stunden nach der Substratzugabe. Bei Konzentrationen bis einschließlich  $50 \text{ mg L}^{-1}$  war keine Schädigung feststellbar. Bei  $100 \text{ mg L}^{-1}$  trat bei beiden Pilzen eine geringere Trockenmassezunahme auf. Bei  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  war der fungistatische Effekt bei beiden Stämmen sehr deutlich: Beide Pilze zeigten eine Abnahme der Trockenmasse.

Der Glucoseverbrauch besitzt für die Beurteilung der Terpentoxizität nur geringe Aussagekraft, da er bei *G. applanatum* unabhängig vom Terpengehalt konstant hoch blieb ( $6-7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und bei *P. sapidus* sehr gering und schwankend war (Probenahme aus verschiedenen Kulturkolben). Bei  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  war jedoch bei diesem Pilz gar kein Glucoseverbrauch mehr meßbar.



**Abb. 2-23:** Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität von  $\alpha$ -Pinen bei *P. sapidus*





**Abb. 2-24:** Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität von  $\alpha$ -Pinen bei *G. applanatum*

Um artspezifische Unterschiede bei der  $\alpha$ -Pinentoxizität feststellen zu können, wurde ein Vergleich 5 verschiedener Basidiomycetenarten durchgeführt.

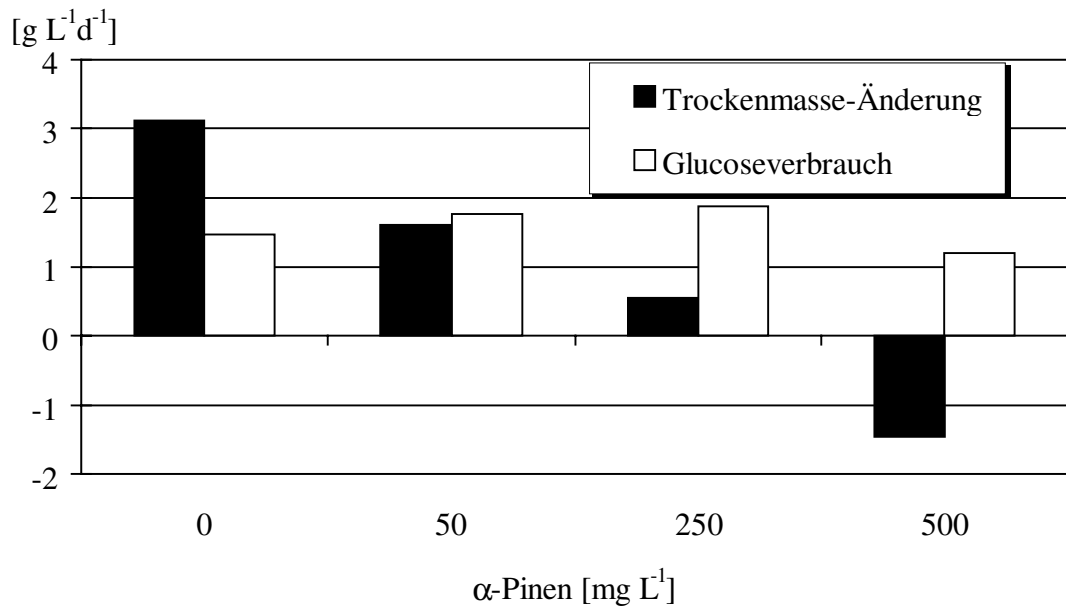
Zur besseren Emulgierung und gleichmäßigeren Verteilung des Terpens in den Submerskulturen und als Vorversuch für die Substratdosierung in Tensidemulsionen (vgl. 2.1.9.1.5) wurde das  $\alpha$ -Pinen dem Medium in wässriger Emulsion mit  $1 \text{ g L}^{-1}$  mit dem nichtionischen Tensid Tween 80 zugegeben. Die  $\alpha$ -Pinen-Konzentrationen betragen 50, 250 und  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . 2 Tage nach Tween- und Substratzugabe wurden Trockenmasse und Glucosegehalt bestimmt.

Die Abb. 2-25 bis 2-29 zeigen anhand der Trockenmasseänderung und des Glucoseverbrauchs innerhalb von 24 h nach Substratzugabe, daß zwischen den untersuchten Pilzen deutliche Unterschiede bestanden.

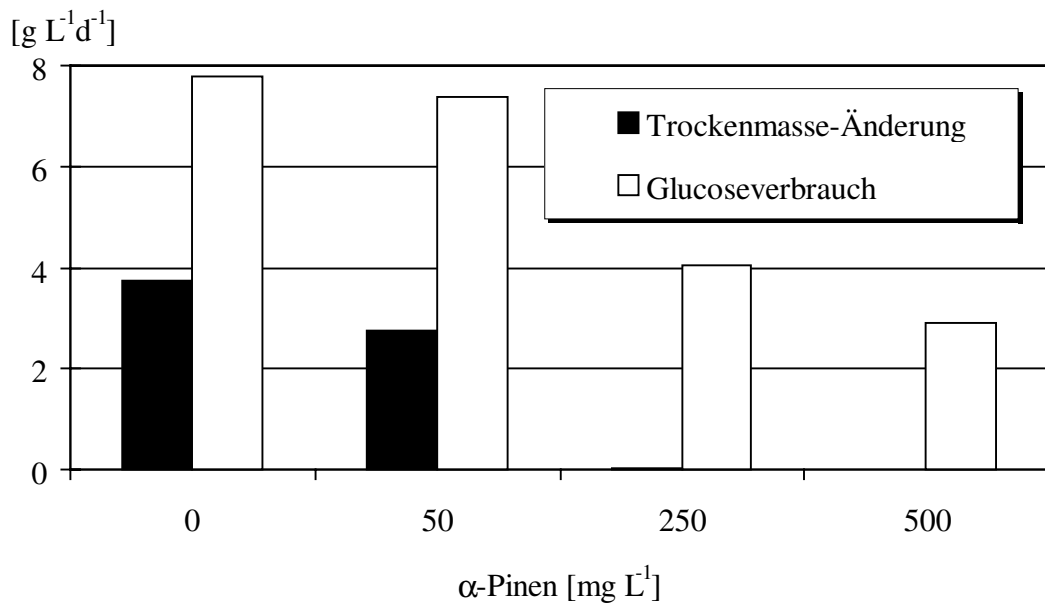
Ein  $\alpha$ -Pinen-Zusatz von  $50 \text{ mg L}^{-1}$  wirkte sich nur bei *P. sapidus* negativ auf die Trockenmasse aus, während alle anderen Pilzen bei dieser Konzentration noch keinen negativen Effekt zeigten.

$250$  und  $500 \text{ mg L}^{-1}$  führten bei *G. applanatum*, *P. sapidus* und *G. frondosa* zu einer deutlich geringeren Trockenmasse, bei *T. hirsuta* war dieser Effekt weniger ausgeprägt und bei *M. giganteus* war selbst bei  $250$  und  $500 \text{ mg L}^{-1}$  kein Effekt auf die Trocken-

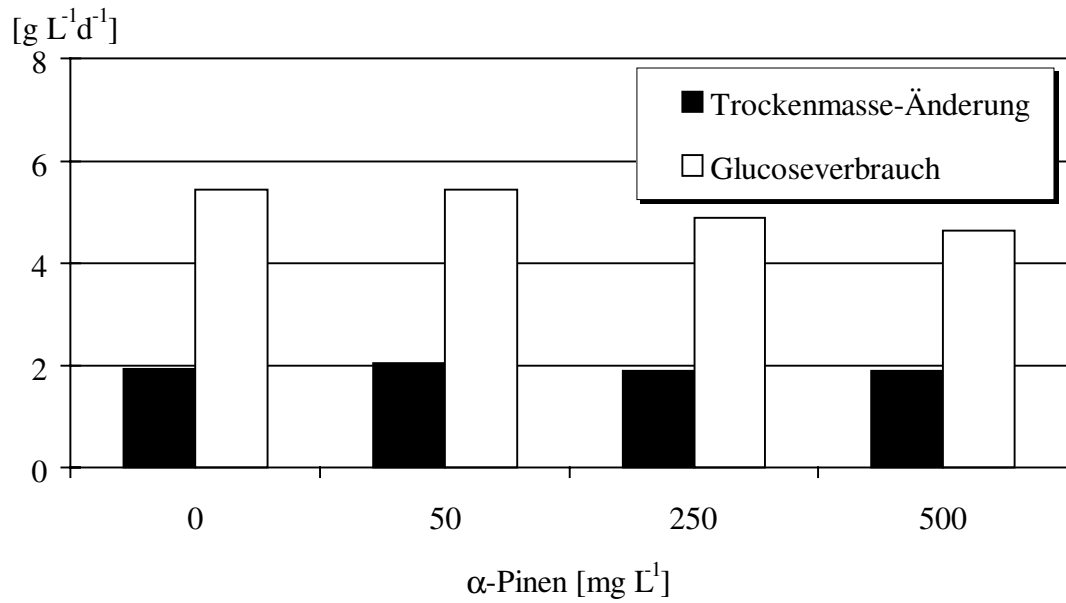
masse festzustellen; nur am geringeren Glucoseverbrauch ließ sich bei diesen Konzentrationen ein gewisser toxischer Effekt auf diesen Pilz erkennen.



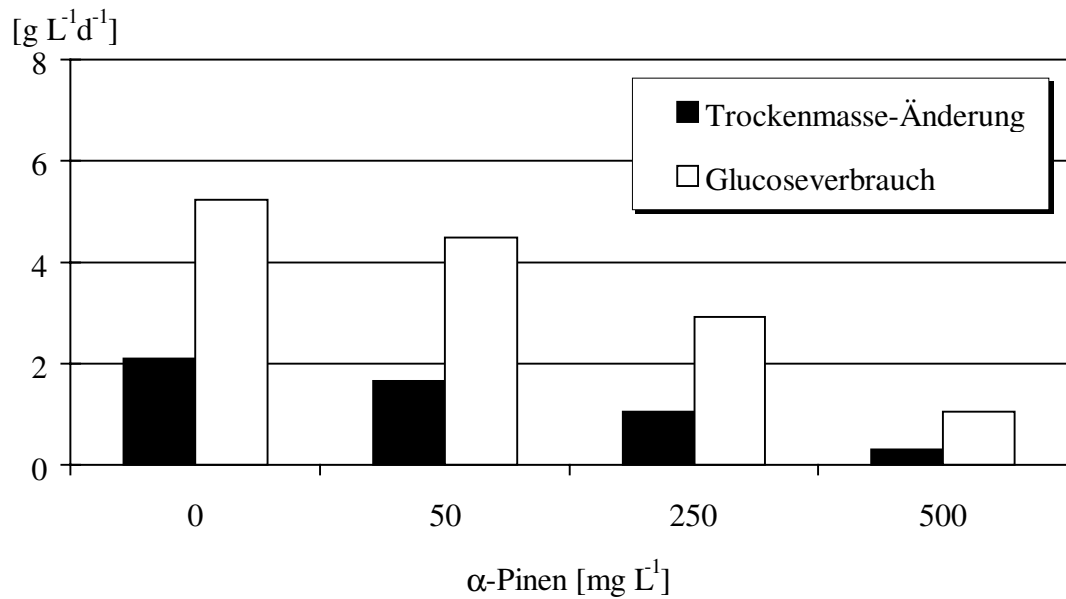
**Abb. 2-25:** Einfluß der  $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei *P. sapidus*



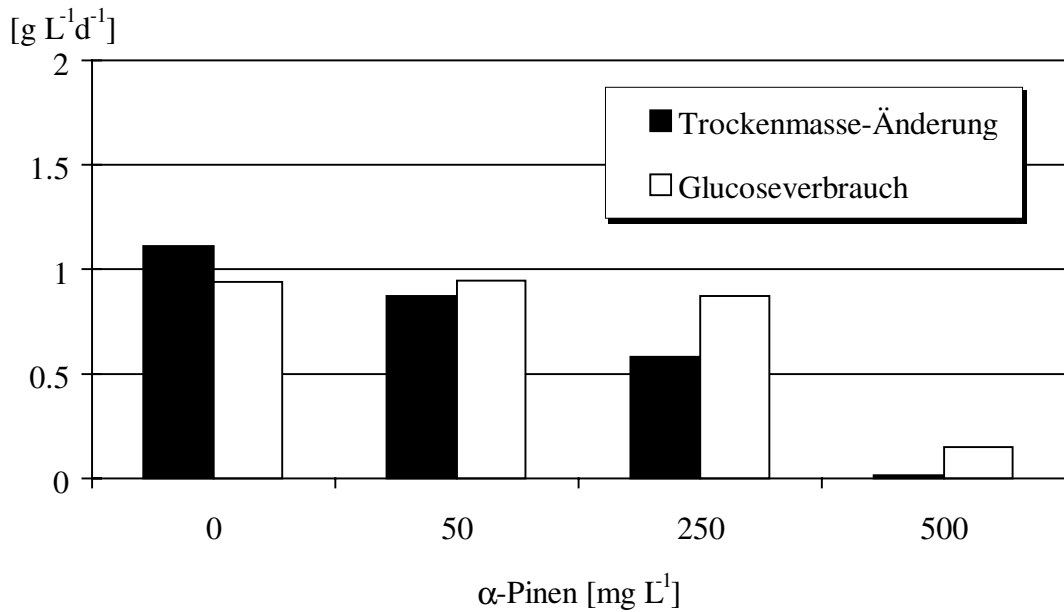
**Abb. 2-26:** Einfluß der  $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei *G. applanatum*



**Abb. 2-27:** Einfluß der  $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei *M. giganteus*



**Abb. 2-28:** Einfluß der  $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei *T. hirsuta*



**Abb. 2-29:** Einfluß der  $\alpha$ -Pinen-Konzentration im Medium auf Glucosegehalt und Trockenmasseentwicklung bei *G. frondosa*

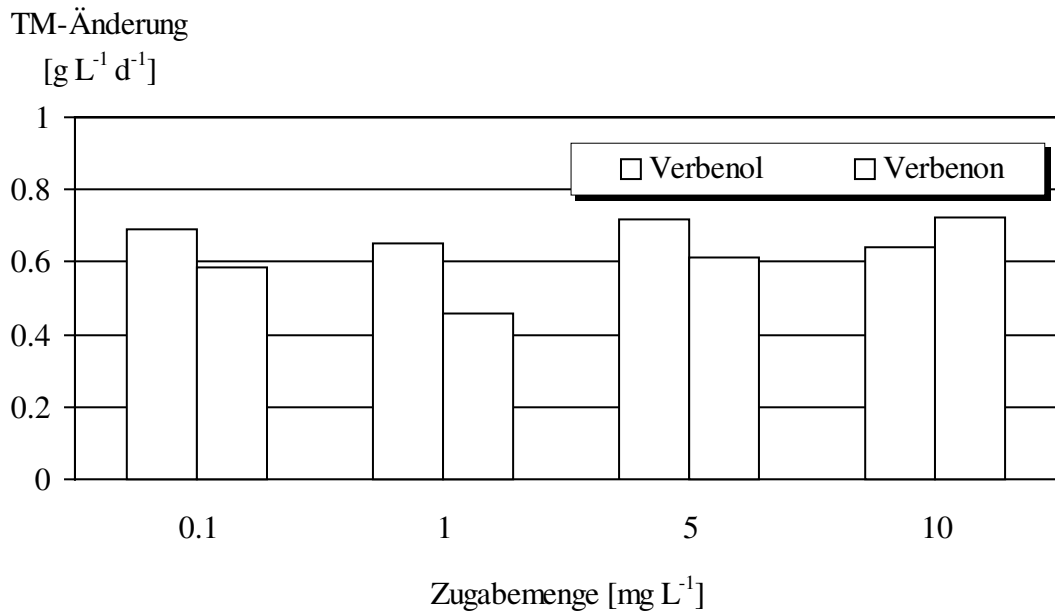
#### 2.1.7.2 Toxizität der $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte

Auch die Transformationsprodukte können fungitoxische Wirkungen aufweisen. Dabei kommt einerseits eine Produkthemmung der an der Transformation beteiligten Enzymsysteme in Frage, andererseits aber auch eine generelle Beeinträchtigung des Metabolismus und des Pilzwachstums.

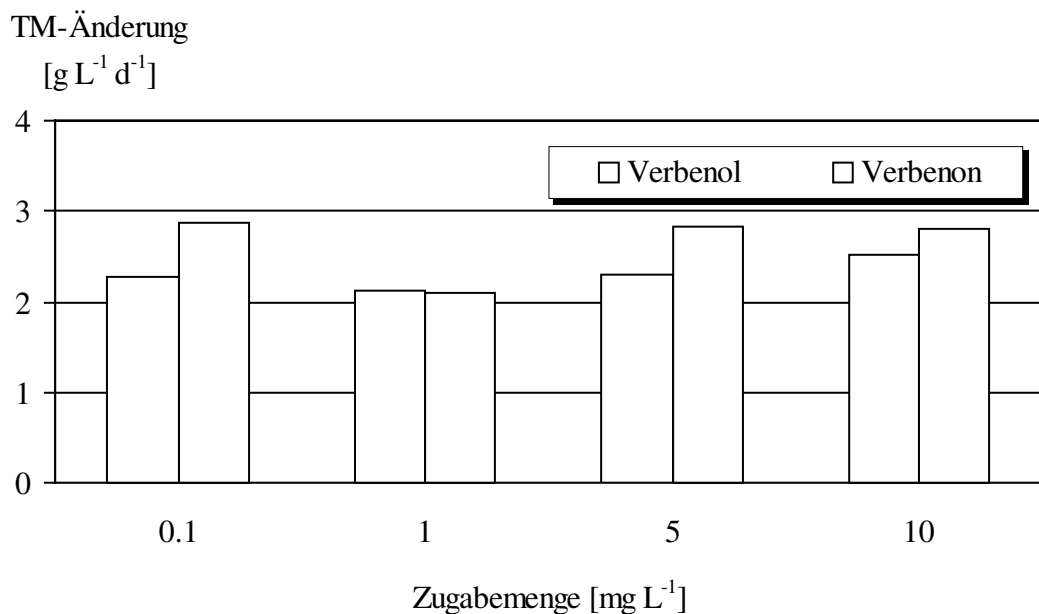
Eine Untersuchung des Effekts auf die Pinen-Transformationsleistung war aufgrund der Substrattoxizität nicht durchführbar: In den nur produktsupplementierten Kulturen ist eine schnellere Metabolisierung der Produkte zu vermuten als in den Kulturen mit Substrat- und Produktzusatz, weil die Substrattoxizität u.a. zu einer Störung des Terpenmetabolismus führen kann. Eine Differenzbildung zwischen den Produktgehalten solcher getrennt geführter Kulturen zur Abschätzung der Pinen-Transformationsraten ergibt daher keine aussagefähigen Ergebnisse.

Zur Abschätzung ihrer allgemeinen Fungitoxizität wurden cis-Verbenol und Verbenon jeweils als Einzelsubstanzen – den 2,5 Tage alten Kulturen von *P. sapidus* und *G. applanatum* in Konzentrationen von 0,1-10  $\text{mg L}^{-1}$  zugesetzt.

Den Abb. 2-30 und Abb. 2-31 ist zu entnehmen, daß in diesem Konzentrationsbereich kein Effekt auf das Pilzwachstum vorhanden war. Auch der Glucoseverbrauch wurde nicht beeinträchtigt (Ergebnisdaten nicht dargestellt).



**Abb. 2-30:** Wachstum von *P. sapidus* bei verschiedenen Verbenol- bzw. Verbenonkonzentrationen



**Abb. 2-31:** Wachstum von *G. applanatum* bei verschiedenen Verbenol- bzw. Verbenonkonzentrationen

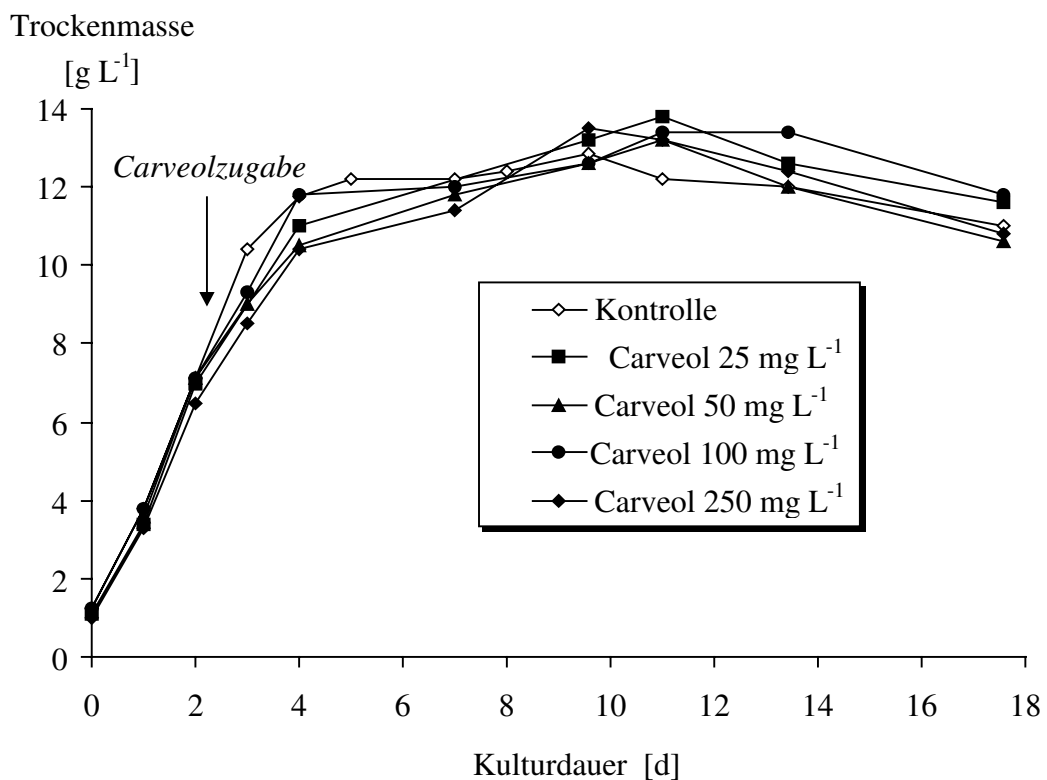
### 2.1.7.3 Produkttoxizität der Limonentransformationsprodukte

Eine ausführlichere Untersuchung der Produkttoxizität wurde anhand von *P. sapidus* für die Limonen-Transformationsprodukte cis/trans-Carveol (Isomerengemisch) und Carvon im Konzentrationsbereich von 25-250 mg L<sup>-1</sup> durchgeführt (Abb. 2-32 und 2-33).

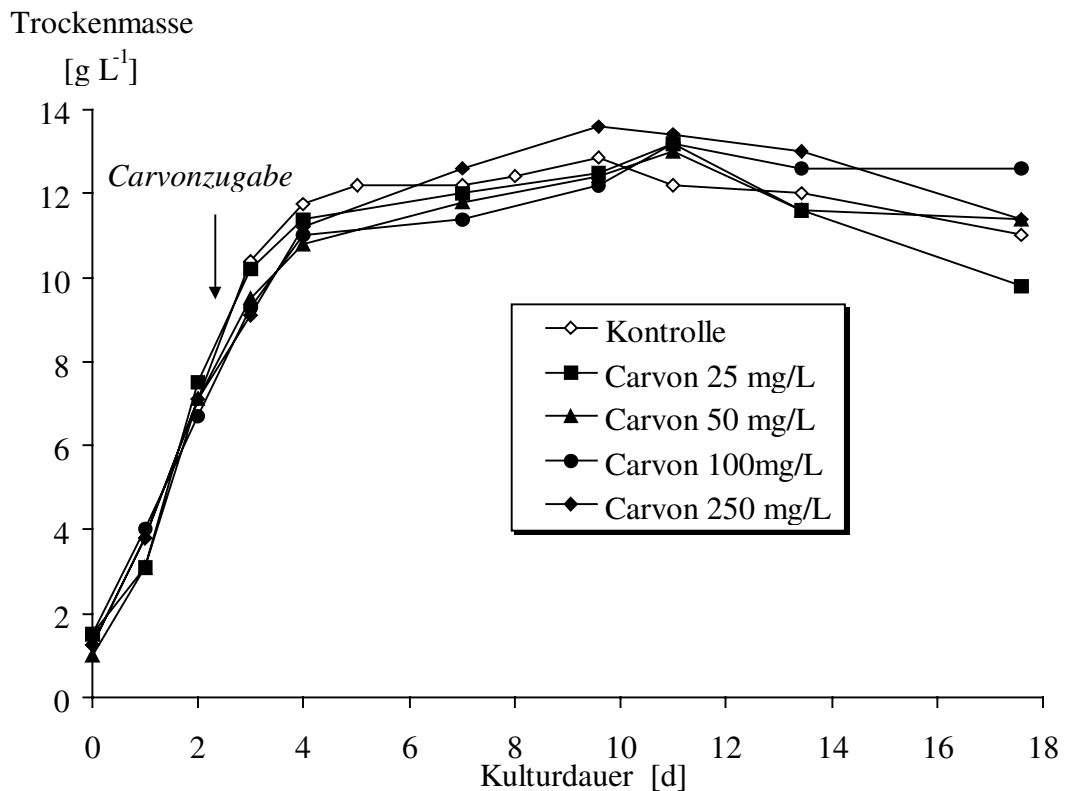
Die Wasserlöslichkeit von Carvon bzw. Carveol liegt mit 596 bzw. 2893 mg L<sup>-1</sup> (vgl. 3.2.3.1, Tab. 3-5) deutlich oberhalb dieses Konzentrationsbereiches.

Selbst bei 250 mg L<sup>-1</sup> Carveol bzw. Carvon wurde hier kein negativer Effekt auf das Wachstum festgestellt, d.h. die Fungitoxizität der Limonen-Transformationsprodukte spielte bei den mit diesem Pilz erreichten Produktkonzentrationen keine Rolle.

Eine Untersuchung der Hemmung terpenoxidierender Enzyme durch die oxyfunktionalisierten Terpene war aus den o.g. Gründen (s. 2.1.7.2) auch hier nicht durchführbar.



**Abb. 2-32:** Wachstum von *P. sapidus* in Submerskulturen bei Zusatz verschiedener Carveolmengen



**Abb. 2-33:** Wachstum von *P. sapidus* in Submerskulturen bei Zusatz verschiedener Carvonmengen

### Teilzusammenfassung 2.1.7

- Die Terpenkohlenwasserstoffe wiesen je nach Pilzstamm in Konzentrationen von mehr als 250 mg L<sup>-1</sup> eine beträchtliche Toxizität auf, die sich in einer starken Trockenmasseabnahme bemerkbar machte.
- Der vergleichsweise terpenresistente Stamm *M. giganteus* zeigte im Vergleich zu dem empfindlicheren *P. sapidus* allerdings keine guten und reproduzierbaren Transformationsleistungen.
- Die Produkte hatten im bei den Biotransformationen auftretenden Konzentrationsbereich keinen Einfluß auf das Pilzwachstum.

⇒ Fazit: Ziel der Optimierung mußte es sein, die toxischen Wirkungen der Substrate auf die Pilze zu minimieren, um möglichst gute Transformationsergebnisse zu erhalten.

## 2.1.8 Variation der Kulturbedingungen zur Verbesserung der Transformationsleistung

### 2.1.8.1 Plackett-Burman-Design zur Identifizierung von Medienbestandteilen mit Einfluß auf die Limonen-Transformation durch *P. sapidus*

Die Untersuchung der Medieneinflüsse auf die Limonentransformation durch *P. sapidus* wurde mit Hilfe eines statistischen Versuchsplanes durchgeführt.

Um eine Vorauswahl geeigneter Parameter zu treffen, die in ausführlicheren Untersuchungen weiter optimiert werden können, wurde ein Versuchsdesign nach PLACKETT und BURMAN [18, 19] angewendet.

Beim Plackett-Burman-Design handelt es sich um eine Fraktion eines vollständigen faktoriellen Designs mit 2 Konzentrationsstufen. Um (N-1) verschiedene Parameter auf zwei Konzentrationsstufen untersuchen zu können, benötigt man hier nur N Experimente, während man für ein vollständiges faktorielles Design  $2^N$  benötigen würde (für 15 Variablen also 32768 Experimente). Aufgrund der starken Reduzierung der durchzuführenden Experimente sind mit diesem Design nur *Haupteffekte* abschätzbar (z.B. der Effekt von Faktor a), nicht aber kombinierte Effekte (z.B. der Effekt der Kombination von Faktor a und b).

Für die Untersuchung der Limonen-Transformation durch *P. sapidus* wurde ein Design mit 15 Variablen in 16 Experimenten (entsprechend 16 verschiedenen Medienvariationen) entwickelt [20]. Die Faktorkombinationen der Experimente sind Tab. 2-7 zu entnehmen.

12 der Variablen waren Medienbestandteile, während 3 Variablen als sog. „Dummies“ eingesetzt wurden (Tab. 2-8). Dummies sind Variablen im Design, die keinem Medienbestandteil zugeordnet sind, deren Level (niedrig oder hoch) im Design-Schema also nicht zu realen Effekten führt. Der „Effekt“ der Dummies auf die zu optimierende Größe (hier: Produktkonzentrationen) ist im Idealfall=0. Die Dummyvariablen sind daher geeignet, statistische Schwankungen und daraus die Signifikanz der realen Effekte durch die anderen Variablen abzuschätzen.

Die Auswahl der 12 Variablen orientierte sich am für alle Transformationsversuche verwendeten Standardmedium, dem SNLH-Medium (vgl. Tab. 2-8, rechte Spalte).



Alle im SNLH-Medium vorhandenen Bestandteile wurden als niedrige Konzentrationsstufe im Plackett-Burman-Design eingesetzt und für die hohe Konzentrationsstufe entsprechend erhöht. Auf diese Weise war es möglich festzustellen, ob eine dieser Komponenten sich limitierend auf die Biotransformation auswirkte.

Die zusätzlich verwendeten Medienbestandteile waren folgende: *Malzextrakt*, *Universalpepton*, *Vitamin-Mischung*, *Calciumchlorid*, *Natriumchlorid*, *Kaliumchlorid*. Sie wurden nur in der hohen Konzentrationsstufe eingesetzt („+“ in Tab. 2-7), um zusätzliche positive Effekte auf die Transformation im Vergleich zum SNLH-Medium feststellen zu können.

**Tab. 2-7:** Plackett-Burman-Design für 15 Variablen in 16 Experimenten zur Abschätzung von Haupteffekten

| Faktor<br>→<br>Exp.Nr.<br>↓ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| 1                           | - | - | - | - | + | + | + | + | + | +  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 2                           | + | - | - | - | - | - | - | + | + | +  | +  | +  | +  | -  | -  |
| 3                           | - | + | - | - | - | + | + | - | - | +  | +  | +  | -  | +  | -  |
| 4                           | + | + | - | - | + | - | - | - | - | +  | -  | -  | +  | +  | +  |
| 5                           | - | - | + | - | + | - | + | - | + | -  | +  | -  | +  | +  | -  |
| 6                           | + | - | + | - | - | + | - | - | + | -  | -  | +  | -  | +  | +  |
| 7                           | - | + | + | - | - | - | + | + | - | -  | -  | +  | +  | -  | +  |
| 8                           | + | + | + | - | + | + | - | + | - | -  | +  | -  | -  | -  | -  |
| 9                           | - | - | - | + | + | + | - | + | - | -  | -  | +  | +  | +  | -  |
| 10                          | + | - | - | + | - | - | + | + | - | -  | +  | -  | -  | +  | +  |
| 11                          | - | + | - | + | - | + | - | - | + | -  | +  | -  | +  | -  | +  |
| 12                          | + | + | - | + | + | - | + | - | + | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| 13                          | - | - | + | + | + | - | - | - | - | +  | +  | +  | -  | -  | +  |
| 14                          | + | - | + | + | - | + | + | - | - | +  | -  | -  | +  | -  | -  |
| 15                          | - | + | + | + | - | - | - | + | + | +  | -  | -  | -  | +  | -  |
| 16                          | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

(+ = hohe Konz., - = niedrige Konz.)

**Tab. 2-8:** Medienparameter und Konzentrationsstufen für das Plackett-Burman-Design

| Var.-<br>Nr. |                                     |  | <i>Design-Versuch</i><br>Konz.stufen |      | SNLH-<br>Medium |
|--------------|-------------------------------------|--|--------------------------------------|------|-----------------|
|              |                                     |  | niedrig                              | hoch |                 |
| 1            | <b><u>C-Quelle:</u></b>             | Glucose [g L <sup>-1</sup> ]                         | 30                                   | 40   | 30              |
| 2            |                                     | Malzextrakt [g L <sup>-1</sup> ]                     | 0                                    | 10   | 0               |
| 3            | <b><u>N-Quelle:</u></b>             | Asparagin [g L <sup>-1</sup> ]                       | 4,5                                  | 9    | 4,5             |
| 4            |                                     | Universalpepton M66 [g L <sup>-1</sup> ]             | 0                                    | 9    | 0               |
| 5            | <b><u>Vitamine:</u></b>             | Hefeextrakt [g L <sup>-1</sup> ]                     | 3                                    | 6    | 3               |
| 6            |                                     | <b>Vitamin-Mischung: [mg L<sup>-1</sup>]</b>         |                                      |      |                 |
|              |                                     | Thiamin  | 0                                    | 2    |                 |
|              |                                     | Biotin   | 0                                    | 2    |                 |
|              |                                     | Niacin   | 0                                    | 8    |                 |
|              |                                     | Panthothensäure                                      | 0                                    | 2    |                 |
|              |                                     | Riboflavin   | 0                                    | 2    |                 |
|              |                                     | Pyridoxal-Hydrochlorid                               | 0                                    | 2    |                 |
|              |                                     | Folsäure   | 0                                    | 2    |                 |
| 7            | <b><u>P-Quelle:</u></b>             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g L <sup>-1</sup> ] | 1,5                                  | 3    | 1,5             |
| 8            | <b><u>Spuren-<br/>Elemente:</u></b> | [mg L <sup>-1</sup> ]                                |                                      |      |                 |
|              |                                     | Fe (FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)          | 0,08                                 | 8    | 0,08            |
|              |                                     | Zn (ZnSO <sub>4</sub> ) x 7 H <sub>2</sub> O         | 0,09                                 | 9    | 0,09            |
|              |                                     | Mn (MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)            | 0,03                                 | 3    | 0,03            |
|              |                                     | Cu (CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)          | 0,005                                | 0,5  | 0,005           |
| 9            | <b><u>Mineral-<br/>stoffe:</u></b>  | [g L <sup>-1</sup> ]                                 |                                      |      |                 |
| 10           |                                     | MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O                 | 0,5                                  | 1    | 0,5             |
| 11           |                                     | CaCl <sub>2</sub>                                    | 0                                    | 0,5  | 0               |
| 12           |                                     | NaCl   | 0                                    | 0,5  | 0               |
|              |                                     | KCl  | 0                                    | 0,5  | 0               |
| 13,14,15     | <b>Dummies</b>                      |  | -                                    | -    | -               |

Außer den Effekten auf die Produktbildung im Verlaufe der Biotransformation war auch der Einfluß der verschiedenen Medienparameter auf das Kulturwachstum von Interesse. Die Effekte auf die Trockenmasse vor Beginn der Transformation (d.h. vor Limonenzugabe) sind Abb. 2-34 zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der Dummy-Variablen ergab sich, daß Pepton und Hefeextrakt als komplexe Zusätze, sowie Calcium als Mineralstoff einen geringen positiven Einfluß auf das Kulturwachstum hatten.

Nach Beginn der Transformation (s. Abb. 2-35) kehrten sich beinahe alle Effekte um. Bei Glucose, Asparagin, Pepton, Magnesium und Natrium waren leicht negative Effekte erkennbar. Nur Hefeextrakt zeigte einen nach wie vor positiven Effekt.

Die Auswertung der Produktbildung nach 24 h Transformationsdauer (Abb. 2-36) ergab, daß Glucose, Malzextrakt und Pepton einen leicht positiven Effekt hatten, während der Vitaminzusatz und die Erhöhung des Kaliumchloridgehaltes im Medium zu einer niedrigeren Produktbildung führte.

Um zu vermeiden, daß die unterschiedlichen Trockenmassen in den verschiedenen Medien zu Fehleinschätzungen der Effekte führen, wurde in Abb. 2-37 das Transformationsergebnis nach 24 h normiert auf die jeweilige Trockenmasse der Kulturen dargestellt (Konzentrationsangaben in  $[\text{mg g}^{-1}]$  Trockenmasse).

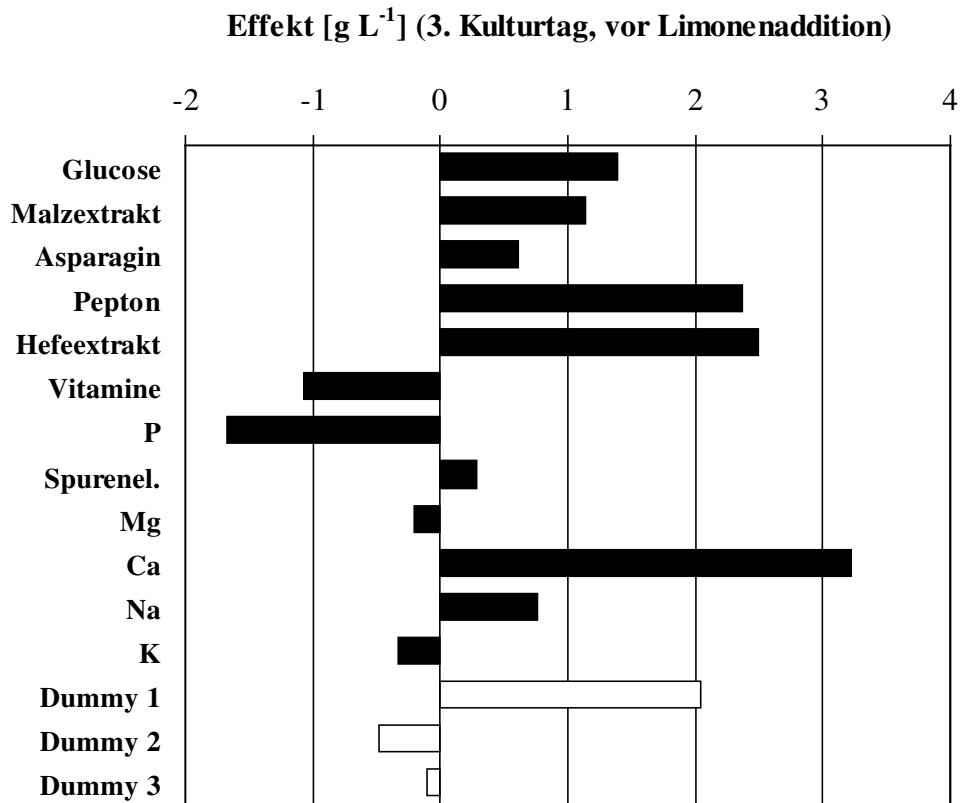
Qualitativ ergab sich das gleiche Bild wie ohne Normierung, der Effekt des Peptons trat allerdings noch deutlicher hervor, während der negative Einfluß des Kaliums geringer erschien.

In einem Folgeexperiment wurden Glucose, Malzextrakt und Pepton, also die Medienbestandteile, die im Plackett-Burman-Design einen gewissen positiven Effekt gezeigt hatten, separat in verschiedenen Konzentrationen untersucht

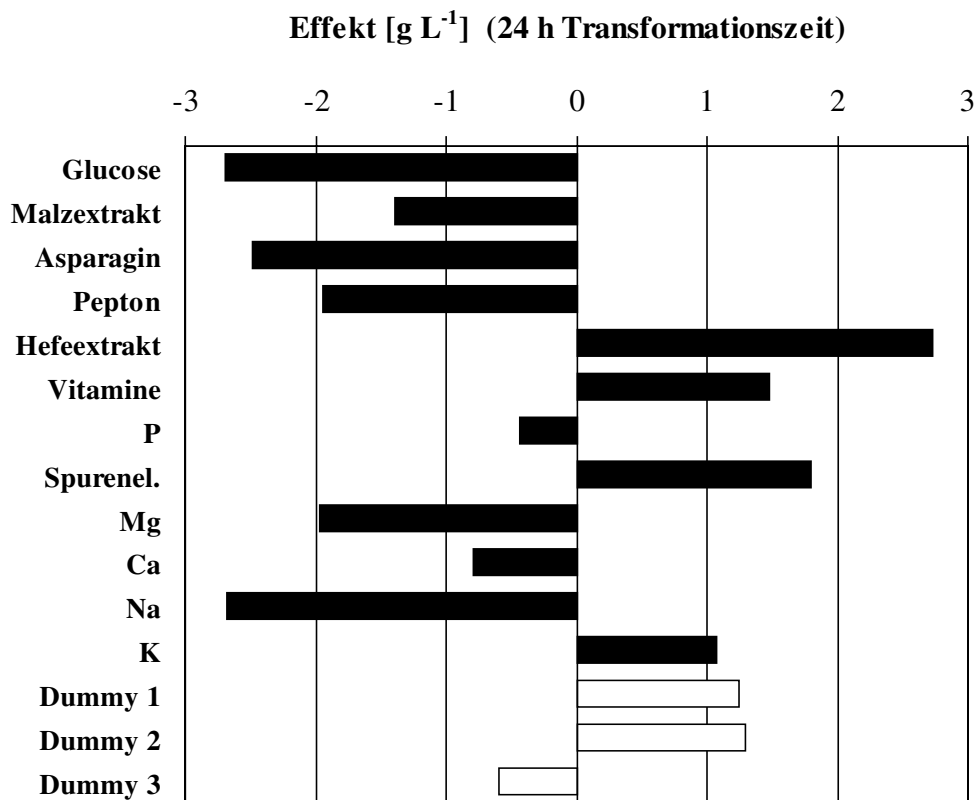
Eine Erhöhung des Anfangsgehaltes an *Glucose* von den im Standardmedium (SNLH) eingesetzten  $30 \text{ g L}^{-1}$  auf  $40 \text{ g L}^{-1}$  führte wie im Plackett-Burman-Experiment zu einer geringen Erhöhung der Produktkonzentration um  $3\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$  (Abb. 2-38).

Glucosemengen von  $50 \text{ g L}^{-1}$  bewirkten eine Abnahme der Produktbildung und bei  $60 \text{ g L}^{-1}$  war eine vollständige Beendigung der Produktbildung nach einem Tag festzustellen. Auch die Verringerung der Glucosekonzentration auf  $10 \text{ g L}^{-1}$  führte zu einer Abnahme der Produktbildung. Eine Glucosekonzentration von  $30\text{-}40 \text{ g L}^{-1}$  erwies sich daher für diese Transformation als günstigster Bereich.

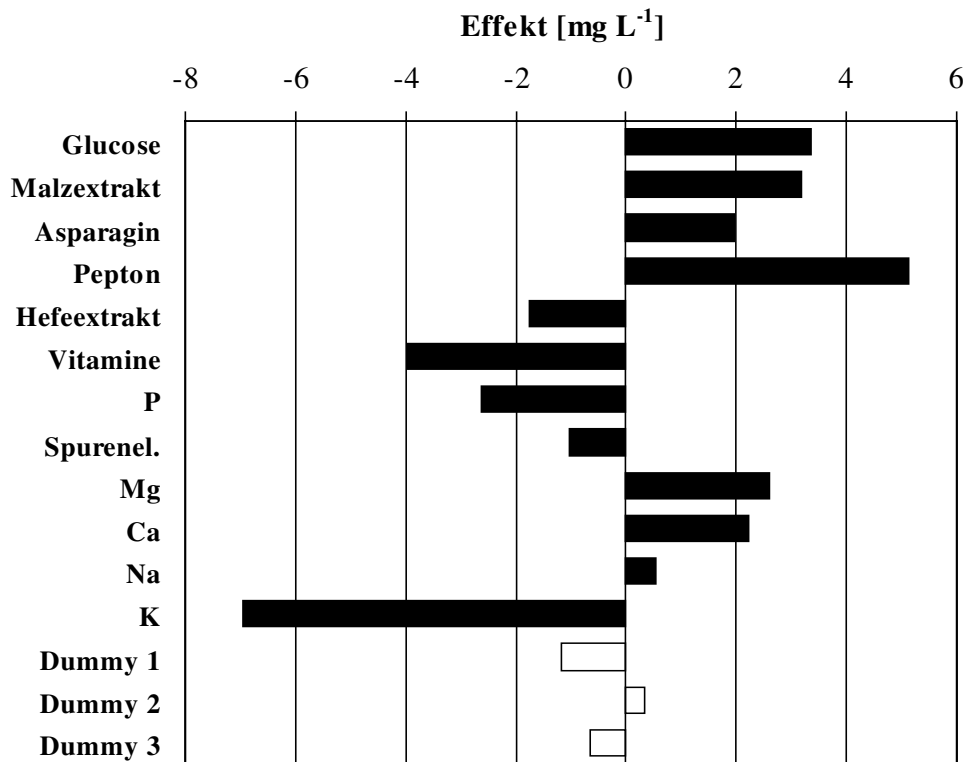
*Malzextrakt* bewirkte im Plackett-Burman-Design einen leicht positiven Effekt ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ , Abb. 2-36) nach 24 h Transformationsdauer. Abb. 2-39 zeigt, daß beim Zusatz verschiedener Konzentrationen ( $0$  bis  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum SNLH-Medium (ohne Malzextrakt) ebenfalls eine Erhöhung der Produktkonzentrationen um  $5\text{-}7 \text{ mg L}^{-1}$  zu beobachten war. Im weiteren Verlauf setzte sich dieser Effekt jedoch nicht fort, so daß nach 5 Tagen nur noch die niedrigste Malzextraktkonzentration eine leichte Erhöhung der Produktmenge im Vergleich zum Standardmedium zeigte.



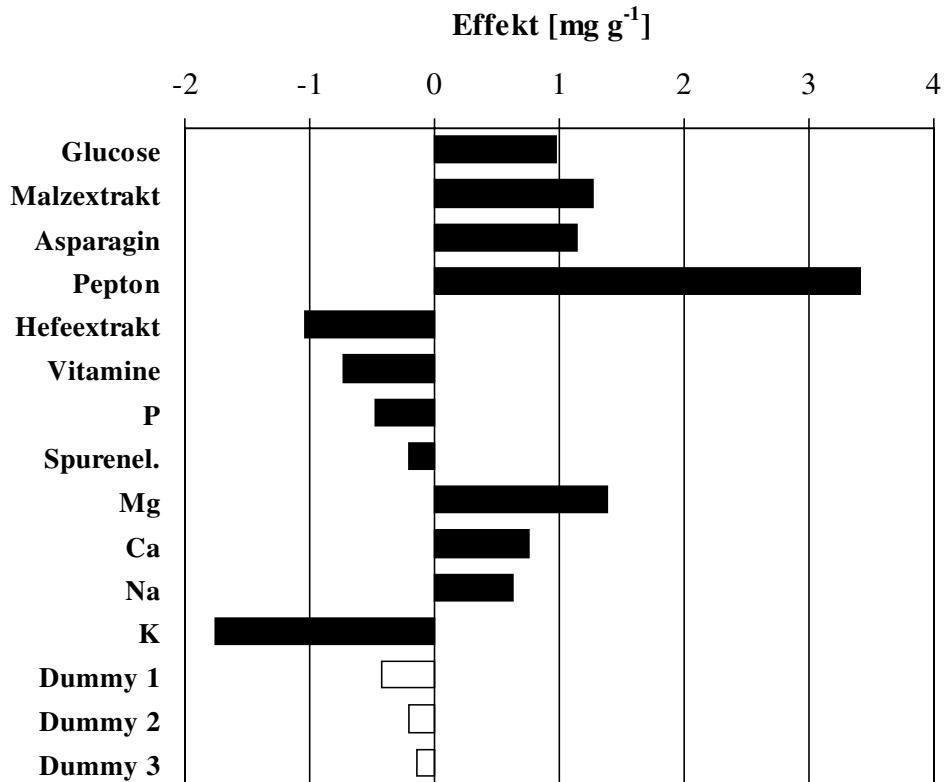
**Abb. 2-34:** Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse von *P. sapidus* nach 2,5 Kulturtagen (mittl. Trockenmasse: 17,8 g L<sup>-1</sup>)



**Abb. 2-35:** Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse bei *P. sapidus* nach 24 h Limonen-Transform. (mittl. Trockenm.: 5,3 g L<sup>-1</sup>)



**Abb. 2-36:** Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Transformation von Limonen durch *P. sapidus* (Carveol+Carvon, 24 h Transformation, mittl. Gehalt: 11,78 mg L<sup>-1</sup>)



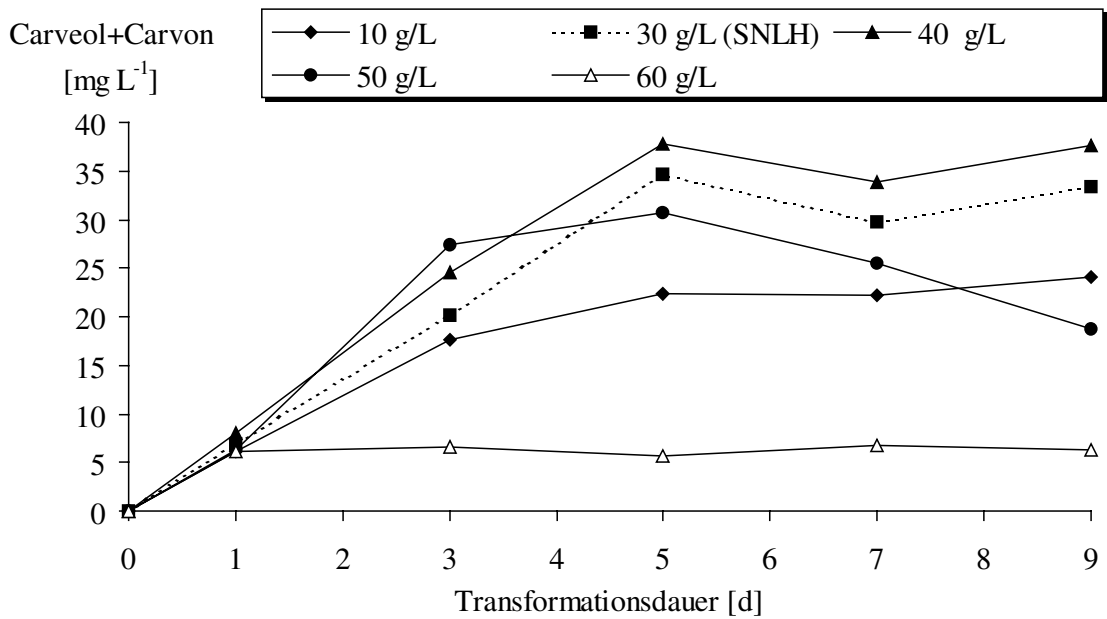
**Abb. 2-37:** Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Transformation von Limonen durch *P. sapidus* (Carveol+Carvon, trockenmassennormiert, 24 h Transformation, mittl. TM-normierter Gehalt: 3,38 mg g<sup>-1</sup>)

Der Zusatz von *Pepton* hatte im faktoriellen Versuchsplan nach 24 h Transformationszeit (vgl. Abb. 2-36) zu einem positiven Effekt von ca.  $5 \text{ mg L}^{-1}$  geführt. Anhand des zeitlichen Verlaufes der Produktkonzentrationen bei verschiedenen Peptongehalten (0 bis  $18 \text{ g L}^{-1}$ , Abb. 2-40) wurde festgestellt, daß der Effekt nach kurzer Transformationsdauer (24 h) reproduzierbar war, jedoch zu späteren Zeitpunkten nicht mehr auftrat. Im Produktmaximum (nach 5 Tagen) lag nur noch der Ansatz mit  $5 \text{ g L}^{-1}$  Pepton geringfügig über dem peptonfreien SNLH-Medium, während höhere Peptongehalte eher zu einer verminderten Produktbildung führten. Der Zusatz von Pepton als komplexem Medienbestandteil führte folglich nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Limonentransformation.

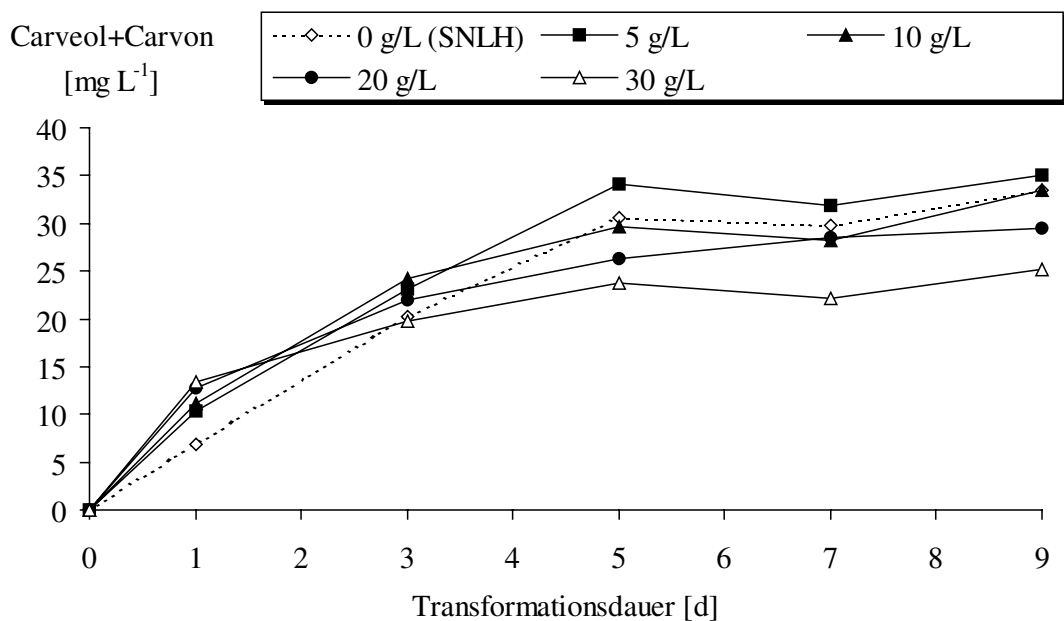
Die Erhöhung der Konzentration an *Kalium* von  $0,43 \text{ g L}^{-1}$  im SNLH-Medium auf  $0,79 \text{ g L}^{-1}$  (Zusatz von  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  KCl) hatte im Designversuch einen negativen Einfluß auf die Produktbildung gezeigt. Eine Absenkung der im Standardmedium eingesetzten Kaliumkonzentration könnte daher eventuell zu einer Verbesserung der Transformationsleistung führen. Um den Kaliumeffekt näher zu untersuchen, wurden Kaliumkonzentrationen zwischen 0 und  $0,86 \text{ g L}^{-1}$  eingesetzt.

Abb. 2-41 zeigt, daß bei Kaliumkonzentrationen bis zu  $0,64 \text{ g L}^{-1}$  weder ein positiver noch ein negativer Einfluß auf die Produktbildung im Vergleich zum SNLH-Medium feststellbar war. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von  $0,86 \text{ g L}^{-1}$  war jedoch die Produktbildung deutlich vermindert. Da diese Konzentration in etwa der Konzentration des höheren Kaliumlevels ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$  KCl) im faktoriellen Versuchsplan entsprach, konnte der negative Einfluß bei einer Erhöhung der Kaliumkonzentration bestätigt werden, ein positiver Effekt bei einer Verringerung im Vergleich zum SNLH-Medium wurde allerdings nicht festgestellt.

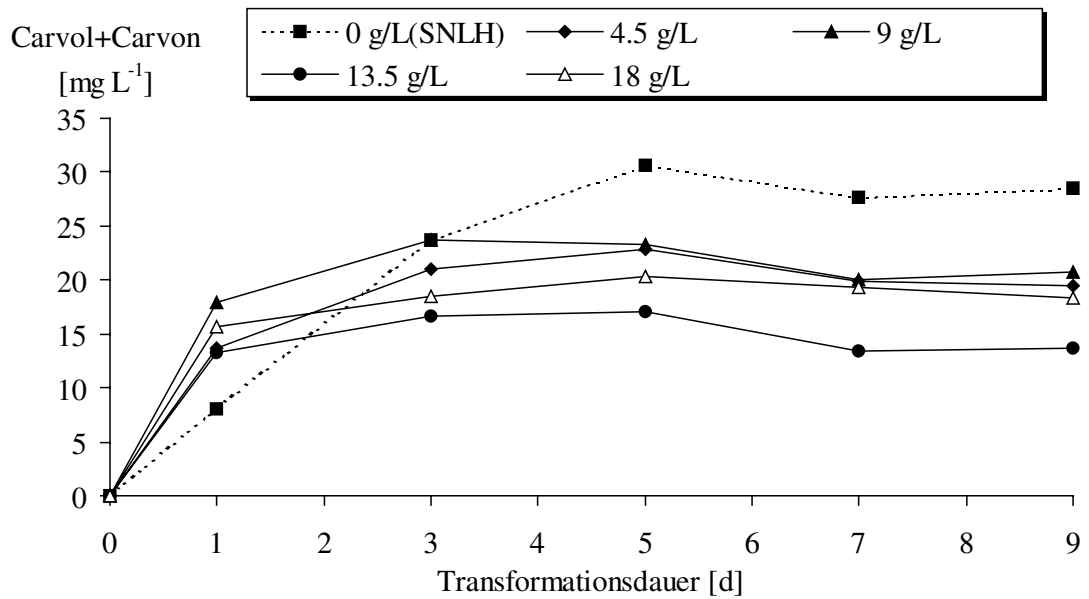
Aus den Versuchen zur Medienvariation ergab sich folglich, daß alle untersuchten Zusätze keine über den gesamten Transformationsverlauf signifikanten Verbesserungen der Limonentransformation mit sich brachten. Das SNLH-Medium wurde deshalb als Standardmedium für die Transformationsversuche beibehalten.



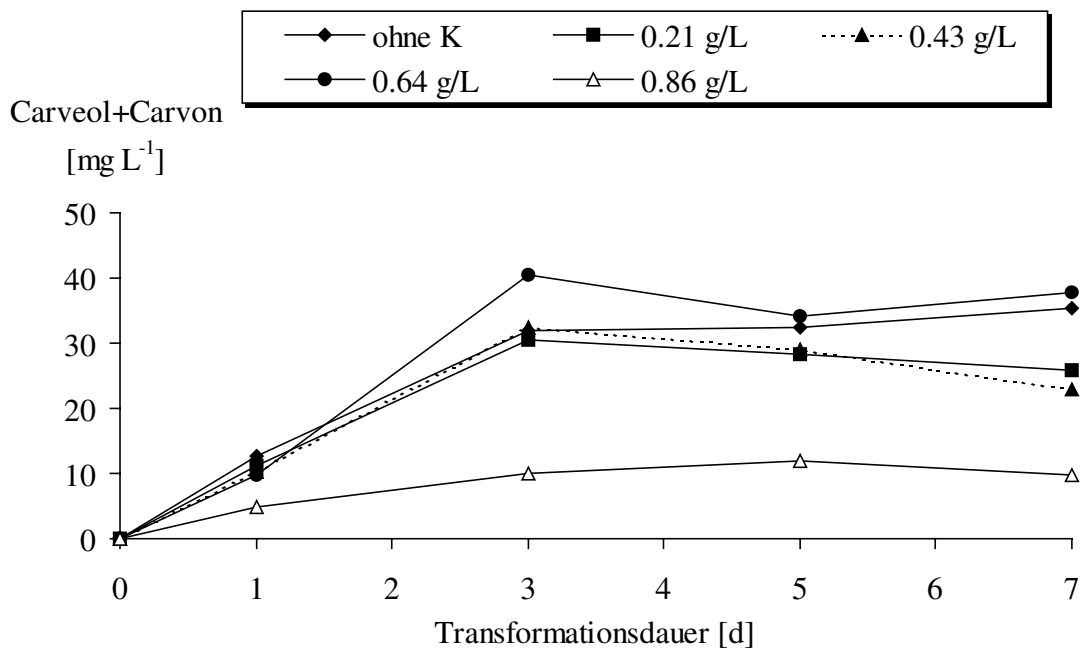
**Abb. 2-38:** Limonen-Transformation durch *P. sapidus* bei verschiedenen Glucosegehalten im Medium



**Abb. 2-39:** Limonen-Transformation durch *P. sapidus* bei verschiedenen Malzextraktgehalten im Medium



**Abb. 2-40:** Limonen-Transformation durch *P. sapidus* bei verschiedenen Peptongehalten im Medium



**Abb. 2-41:** Limonen-Transformation durch *P. sapidus* bei verschiedenen Kaliumgehalten im Medium

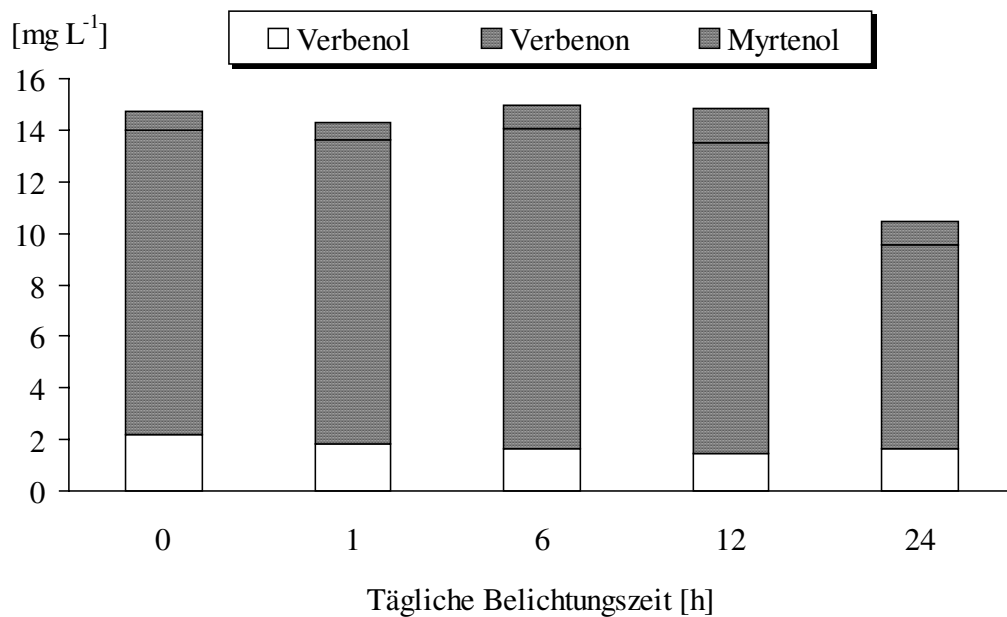


### 2.1.8.2 Lichteinfluß

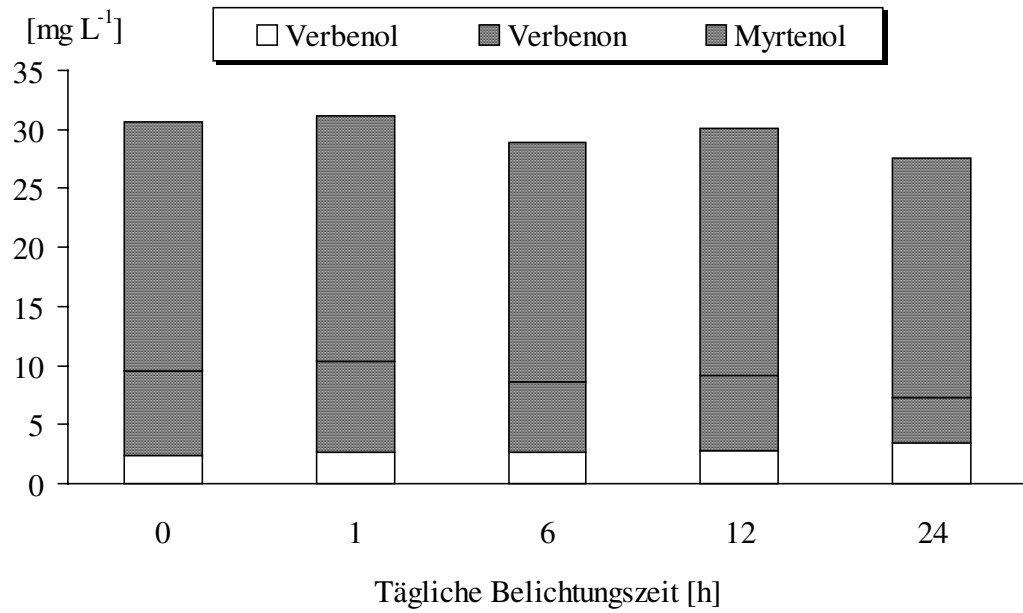
Licht ist ein Einflußfaktor, der im Gegensatz zu Kultivierungstemperatur, Schüttelgeschwindigkeit, Medienzusammensetzung, Kulturführung und Inokulummenge unter den normalen Kulturbedingungen nicht kontrolliert wurde, also jahreszeit-, witterungs- und standortabhängig war. Daher wurde ein Transformationsversuch unter kontrollierten Lichtbedingungen durchgeführt.

Dazu wurden Kulturen von *P. sapidus*, *T. hirsuta* und *G. frondosa* 0, 1, 6, 12 und 24 h täglich mit UV-A-Lampen belichtet. Parallel wurden belichtete und unbelichtete Pinen-Blindwerte geführt. Unterschiede in der Blindwertentwicklung durch die UV-A-Belichtung wurden jedoch nicht beobachtet.

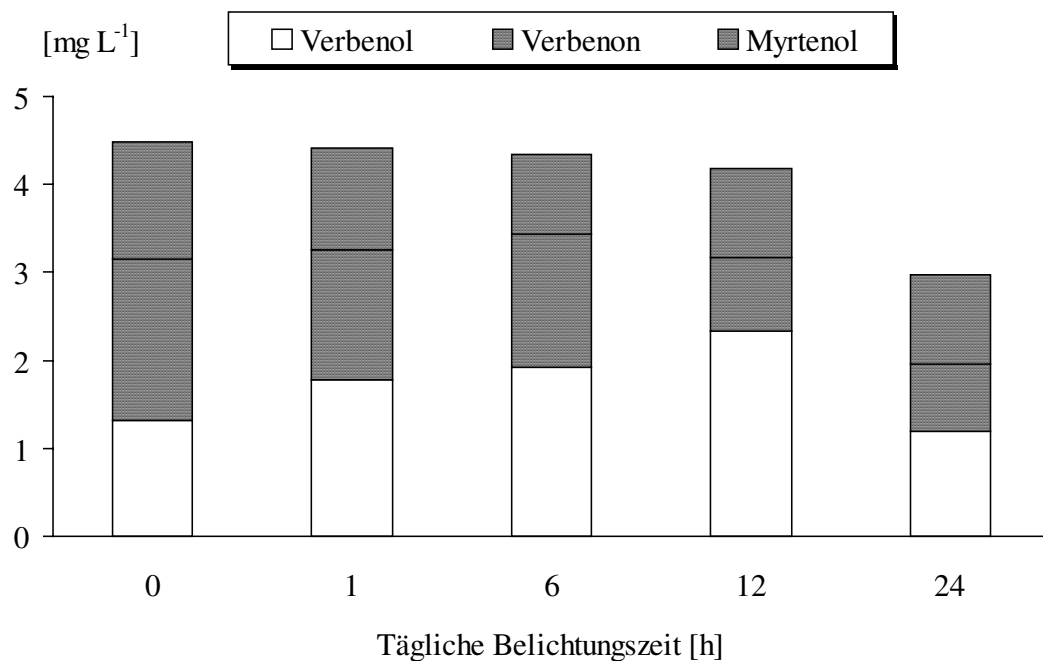
Die Ergebnisse der unter diesen Bedingungen durchgeführten  $\alpha$ -Pinen-Transformationen sind in Abb. 2-42 bis 2-44 dargestellt.



**Abb. 2-42:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von *P. sapidus* in Abhängigkeit von der täglichen UV A-Belichtungszeit



**Abb. 2-43:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von *T. hirsuta* in Abhängigkeit von der täglichen UV A-Belichtungszeit

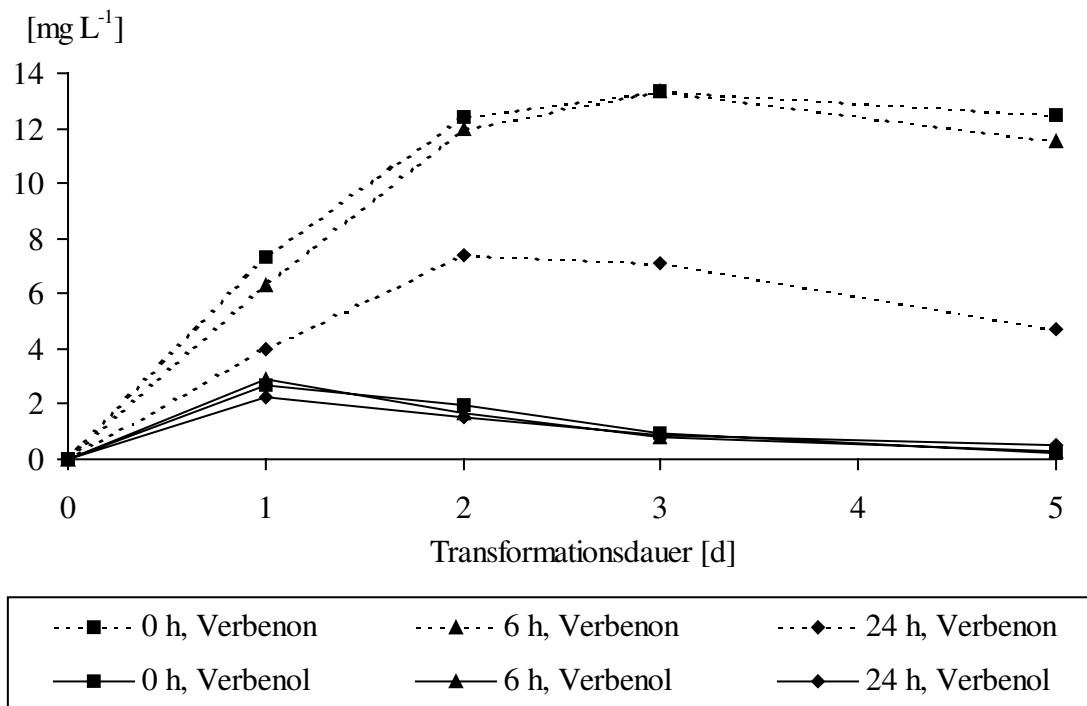


**Abb. 2-44:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (48 h) von *G. frondosa* in von der täglichen UV A-Belichtungszeit

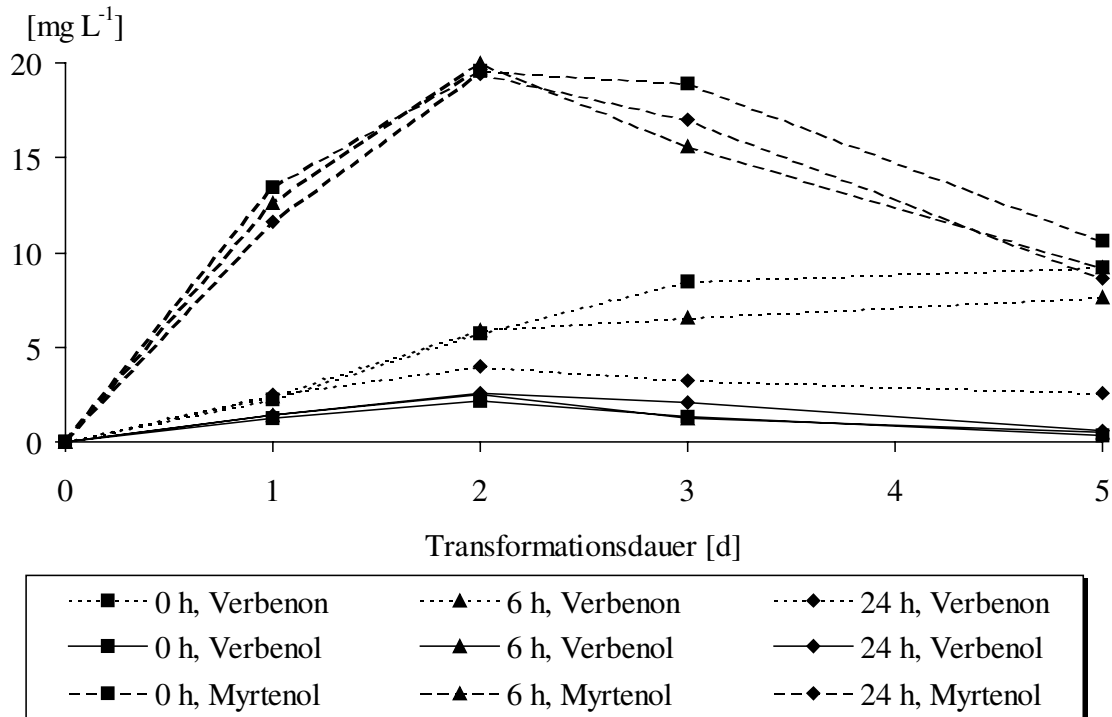
Bei Belichtungszeiten bis zu 12 h war weder eine Zu- noch eine Abnahme der Transformationsleistung feststellbar. Bei Dauerbelichtung trat jedoch bei den drei untersuchten Pilzen eine deutliche Abnahme der Produktbildung auf. Im Vergleich zur Produktsumme bei 12 h Belichtung nahm sie bei *P. sapidus* und *G. frondosa* um 30%, bei *T. hirsuta* um 8% ab.

Die Abb. 2-45 bis 2-47 zeigen den Zeitverlauf der Biotransformation bei Belichtungszeiten von 0, 6 und 24 h. Bei allen drei Pilzen zeigte sich bei Dauerbelichtung vor allem eine verminderte Oxidation von Verbenol zu Verbenon. Bei *T. hirsuta* war ein negativer Effekt auch schon bei 6 h täglicher Belichtung vorhanden. Dies ließ darauf schließen, daß durch Lichteinfluß die beteiligten alkoholoxidierenden Enzyme gehemmt bzw. inaktiviert wurden.

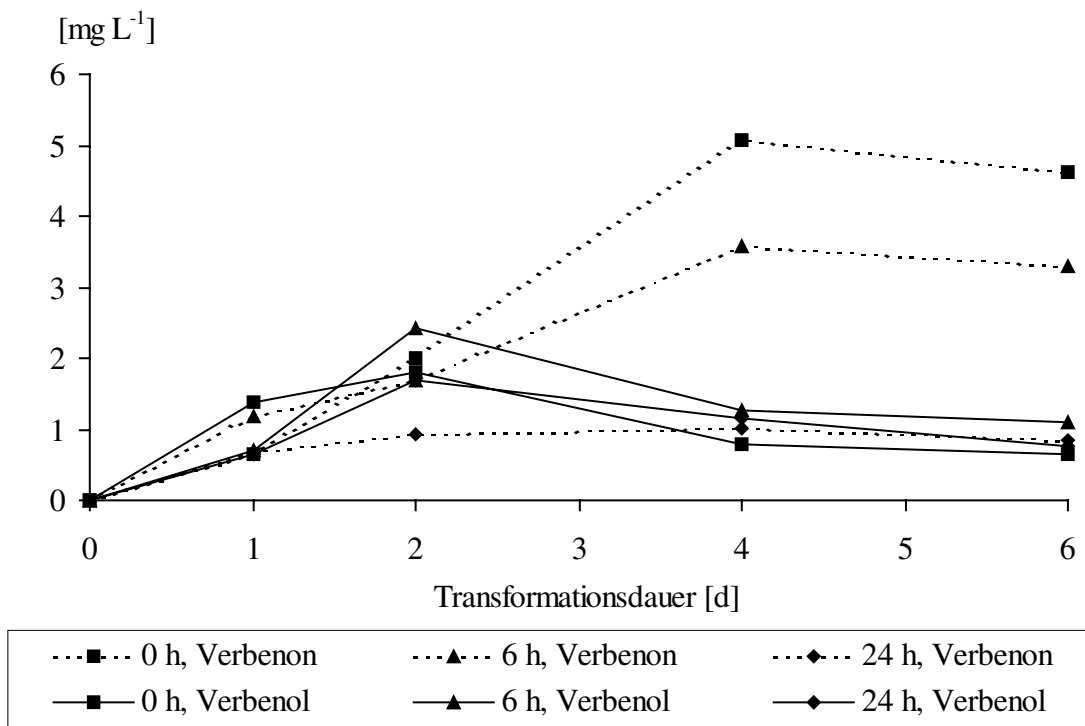
Auf die Transformation des Terpenkohlenwasserstoffs zum Alkohol schien die UV-A-Belichtung dagegen keinen Einfluß zu haben.



**Abb. 2-45:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus* bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten



**Abb. 2-46:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *T. hirsuta* bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten



**Abb. 2-47:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *G. frondosa* bei verschiedenen UV-A-Belichtungszeiten

### 2.1.8.3 pH-Wert

Basidiomyceten wachsen bevorzugt in sauren Kulturmedien. Im Kulturverlauf sinken die pH-Werte bei den meisten Stämmen in einen pH-Bereich zwischen etwa 4 und 5,5 ab und steigen später wieder an.

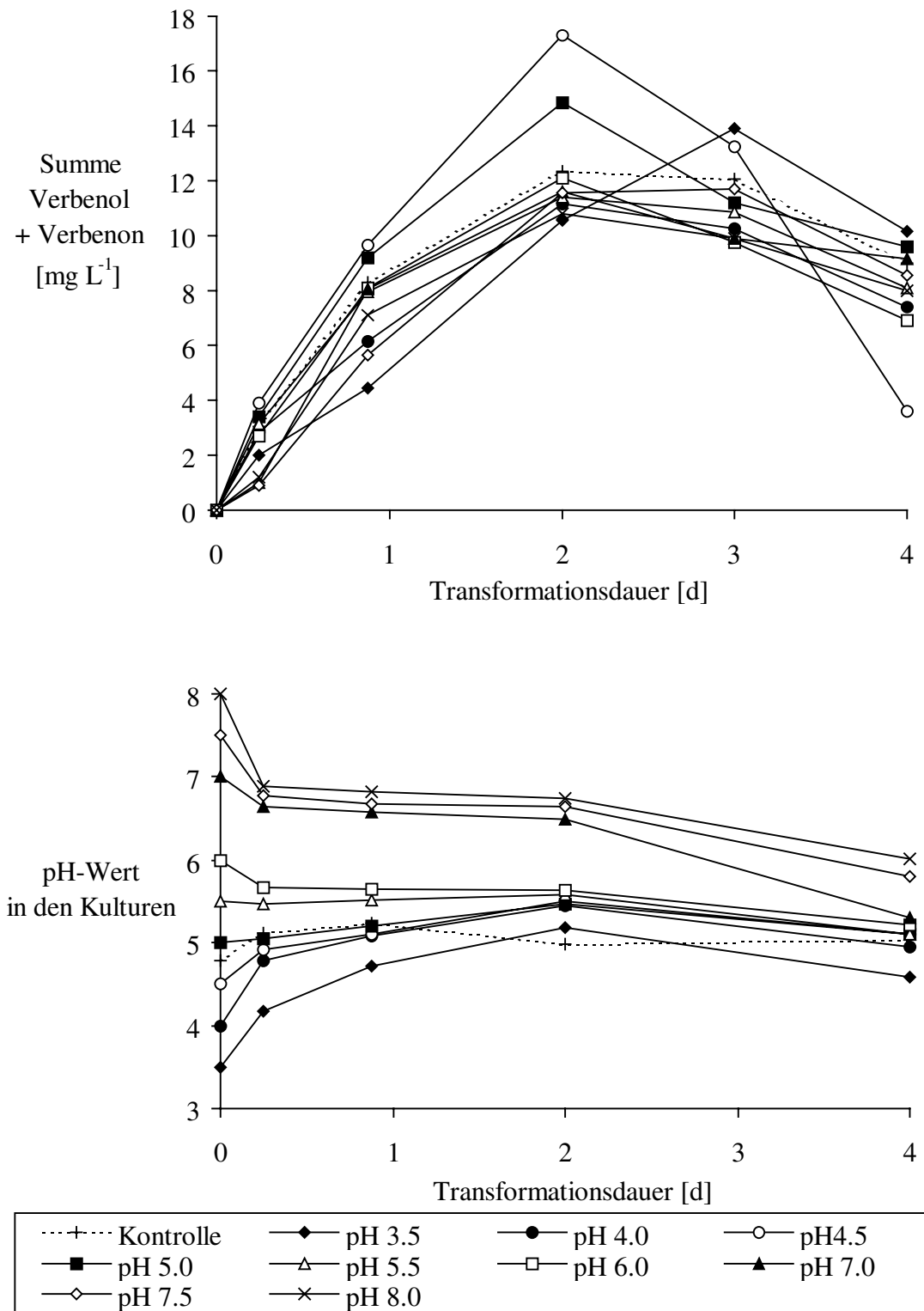
Eine Abhängigkeit der Transformationsleistung vom pH-Wert im Medium ist denkbar, wenn der durch den Pilz eingestellte pH-Wert zu einer Beeinflussung des Pilzmetabolismus, z.B. durch eine Hemmung oder Erhöhung der Nährstoffaufnahme führt. Darüber hinaus ist eine pH-Abhängigkeit besonders bei Terpententransformationen interessant, weil hier die chemischen Blindwerte stark pH-Wert-abhängig sind, d.h. pH-Werte im neutralen Bereich sind besonders günstig.

Für die Untersuchung wurden Kulturen von *P. sapidus* für 2,5 Tage kultiviert. Dann wurden unter sterilen Bedingungen pH-Werte zwischen 3,5 und 8,0 eingestellt und Substrat (2 x 100 µL pro 100 mL im Abstand von 24 h) zugegeben.

Abb. 2-48 zeigt, daß bei Einstellung von pH-Werten > 5,5 eine pH-Wert-Abnahme stattfand, die allerdings nicht zu einem vollständigen Angleich an den pH-Wert der nicht pH-justierten Kultur führte. Bei pH-Werten <5 wurde eine pH-Wert-Zunahme und dadurch ebenfalls eine teilweise Angleichung an den nativen pH-Wert festgestellt.

Die anfänglich deutliche pH-Änderung läßt sich einerseits auf eine aktive Reaktion des Pilzes zurückführen, eine Pufferungseffekt durch in der Myzelmasse gespeicherte Säuren und Basen ist jedoch ebenfalls möglich.

Betrachtet man die Produktbildung, so ergaben pH-Werte von 4,5 und 5,0 etwas höhere Transformationsleistungen als alle anderen pH-Werte. Der native pH-Wert des Pilzes lag bei etwas über 5,0, d.h. etwas über den günstigsten eingestellten pH-Werten.



**Abb. 2-48:** Abhängigkeit der  $\alpha$ -Pinen-Transformation von den eingestellten Anfangs-pH-Werten der Kulturmedien. Summe trans-Verbenol + Verbenon (oben) und im Kulturverlauf gemessene pH-Werte (unten)

### **Teilzusammenfassung 2.1.8:**

- Die Variation der Medienzusammensetzung ergab für die Limonen-Transformation durch *P. sapidus* keine signifikanten Verbesserungen im Vergleich zum eingesetzten hefeextrakthaltigen Standardmedium (SNLH). Dieses Medium wurde daher beibehalten.
  - Die UV-A-Belichtung hatte hauptsächlich bei Dauerbelichtung einen deutlich negativen Einfluß auf die Produktbildung, vor allem auf das Verbenon. Bei kürzeren Belichtungszeiten war dieser Effekt nicht vorhanden (*P. sapidus*) oder weniger ausgeprägt (*T. hirsuta*, *G. frondosa*). Eine Kontrolle der Belichtungsbedingungen würde daher für die Terpenttransformationen keine Verbesserungen bewirken.
  - Der Anfangs-pH-Wert im Medium zeigte keine signifikanten Effekte auf die Produktbildung. Der Bereich des nativen pH-Wertes in den Submerskulturen war am günstigsten für die Terpenttransformation.
- ⇒ Fazit: Die Variation der Kultivierungsbedingungen führte nicht zu verbesserten Transformationsergebnissen. Die geringen Umsatzraten mußten auf andere Ursachen zurückzuführen sein.

## **2.1.9 Versuche zur Optimierung der Substratverfügbarkeit zur Erhöhung der Transformationsleistung**

### **2.1.9.1 Optimierung der Terpen-Zugabe**

#### *2.1.9.1.1 Variation der zudosierten Substratmengen*

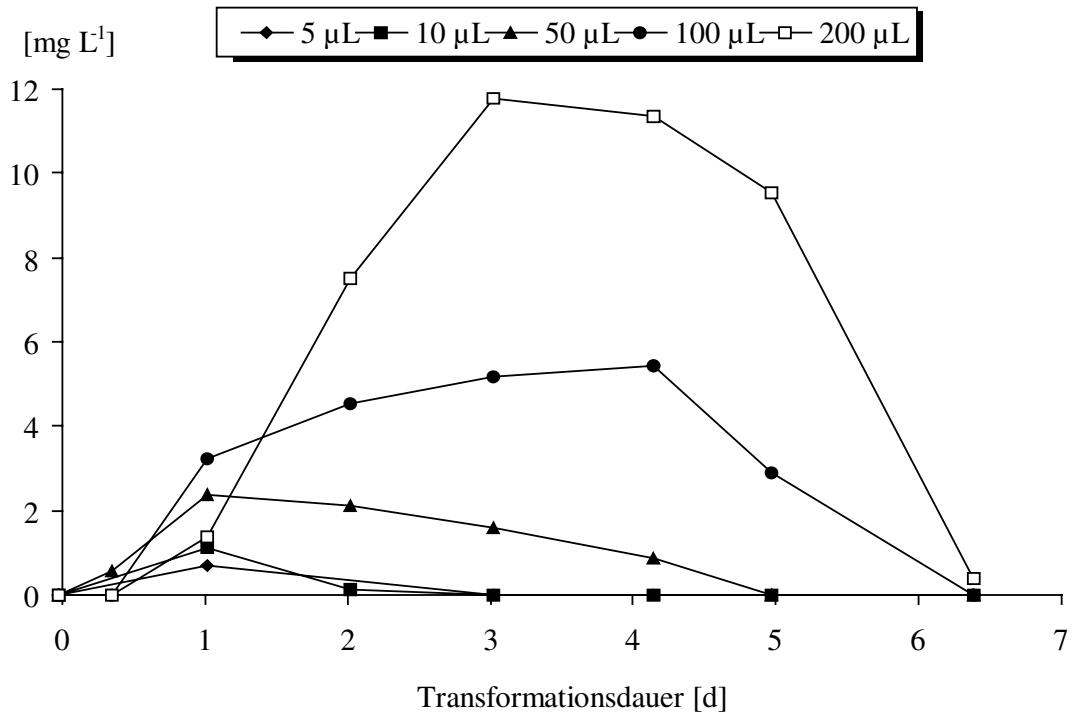
Wie in Abschnitt 2.1.7.1 dargestellt, spielt die Substrattoxizität bei Terpenttransformationen durch Basidiomyceten eine wichtige Rolle. Ziel der Transformationsoptimierung war es, möglichst große Substratmengen umzusetzen, d.h. einerseits eine für die effektive Umsetzung ausreichende Substratkonzentration bereitzustellen, andererseits aber die Membranschädigung durch Überdosierung der Terpene und damit einen schnellen Verlust an Transformationsaktivität zu verhindern.

Bei diesem Versuch wurde 3 Tage alten Kulturen von *P. sapidus*  $\alpha$ -Pinen viermal im Abstand von 24 Stunden (3, 4, 5 und 6 Tage nach Inokulation, entsprechend 0, 1, 2 und 3 Tagen Transformationsdauer) jeweils in Dosen von 5, 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{L}$  pro 100 mL Kulturvolumen zugegeben (entsprechend 43, 86, 430, 860 und 1720  $\text{mg L}^{-1}$  pro Zugabezeitpunkt). Die chemischen Blindwerte wurden entsprechend den hier eingesetzten Terpenmengen von den gemessenen Werten subtrahiert.

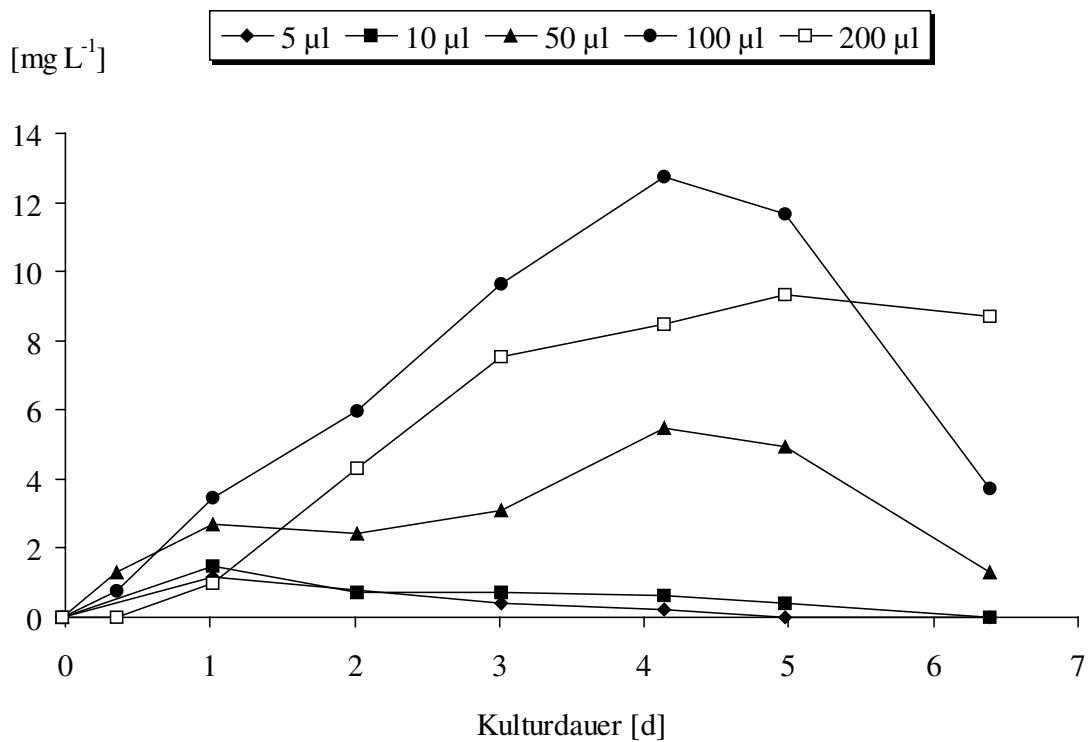
Abb. 2-49 und 2-50 zeigen, daß bei den beiden niedrigen Dosierungen (5 und 10  $\mu\text{L}$ ) kaum Produktbildung auftrat, während sie bei 50, 100 und 200  $\mu\text{L}$  zu einer Steigerung der gebildeten Verbenolmengen führte. Bezüglich der Verbenolbildung war die Dosierung von 100  $\mu\text{L}$  optimal. Addiert man die Produktmengen von Verbenol und Verbenon, so stimmen die Produktsummen der 100 und der 200  $\mu\text{L}$ -Dosierung mit maximal ca. 20  $\text{mg L}^{-1}$  annähernd überein.

Da für die Oxidation von Verbenol zu Verbenon neben der Hydroxylierung ein zweiter enzymatischer Schritt notwendig ist, kann man aus diesem Ergebnis schließen, daß bei der höchsten Dosierung das Verbenol-oxidierende Enzym inaktiviert war (daher der höhere Verbenolgehalt), während bei der zweithöchsten Dosierung die Oxidation zum Verbenon effektiver war.





**Abb. 2-49:** Stufenzugabe von  $\alpha$ -Pinen (Tag 0, 1, 2 und 3) zu Kulturen von *P. sapidus*: Verbenolgehalte



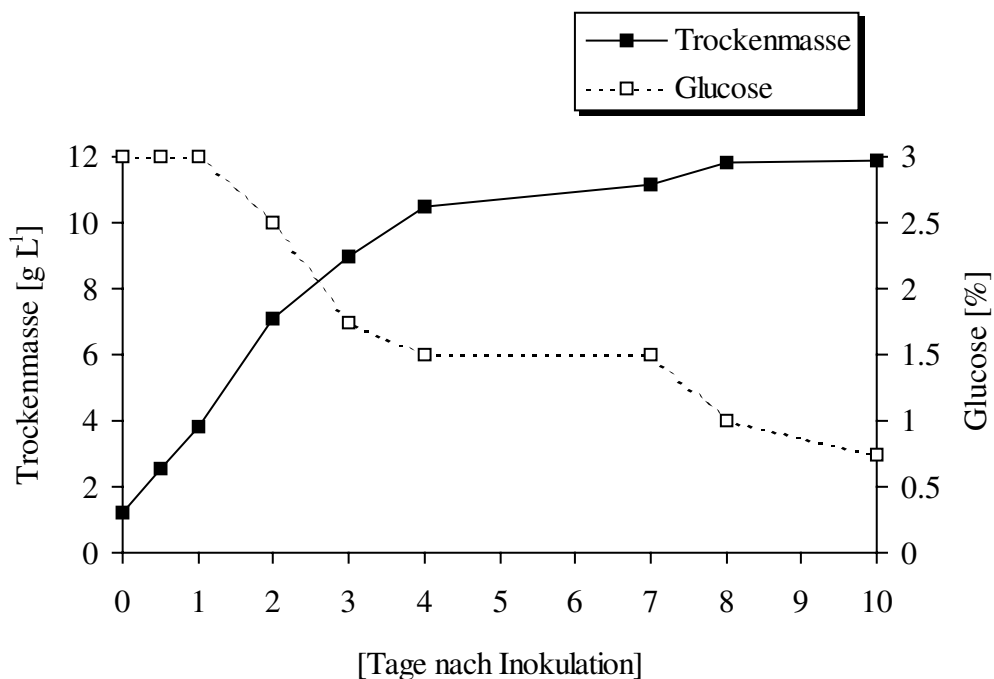
**Abb. 2-50:** Stufenzugabe von  $\alpha$ -Pinen (Tag 0, 1, 2 und 3) zu Kulturen von *P. sapidus*: Verbenongehalte

### 2.1.9.1.2 Variation des Zeitpunktes der Substratzugabe

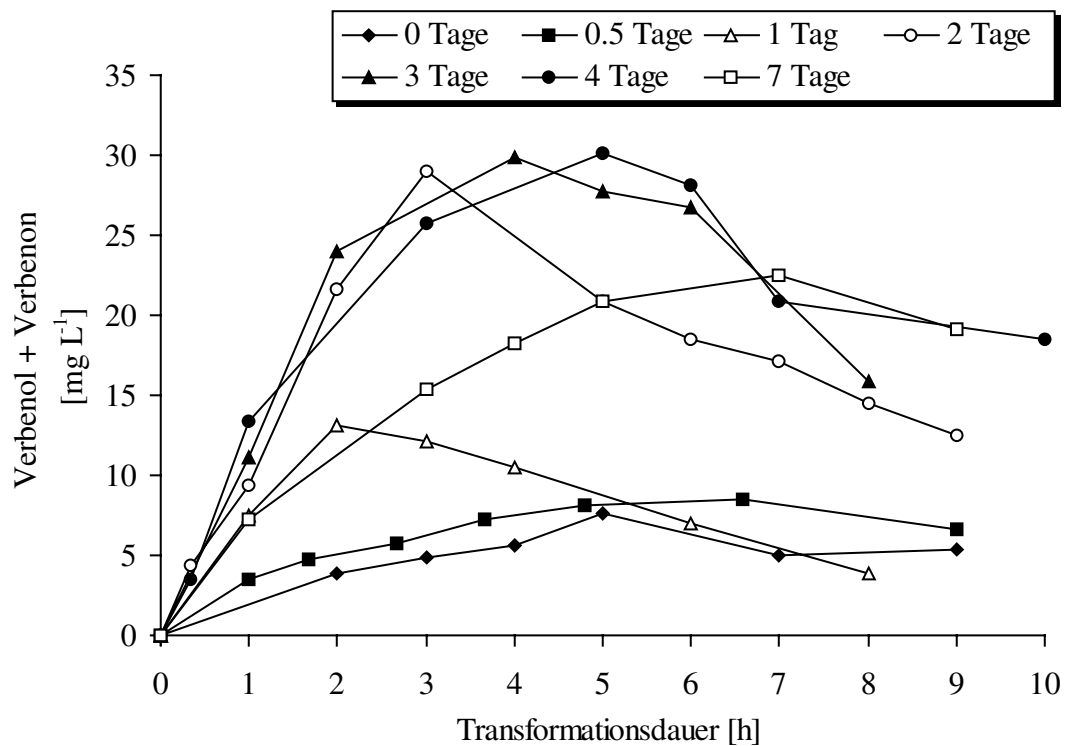
In bisherigen Untersuchungen von Terpententransformationen wurde festgestellt, daß die meisten Umsetzungen durch Mikroorganismen bevorzugt zum Zeitpunkt des Überganges von der Wachstums- in die stationäre Phase stattfinden. Die Wachstumsphase (Trophophase) verläuft bei myzelbildenden Pilzen aufgrund des in erster Linie zweidimensionalen Hyphenwachstums im Gegensatz zu Bakterien nicht exponentiell, sondern eher linear.

Bei *P. sapidus* erstreckte sie sich im SNLH-Medium (100 mL-Kultur, 10% v/v Inokulum) auf die ersten 4 Tage nach Inokulation (vgl. Abb. 2-51). Trotz ausreichenden Glucosegehaltes nahm danach die Trockenmasse kaum noch zu.

Wurde das Terpensubstrat zu verschiedenen Zeitpunkten dieser Wachstumsphase zudosiert (vgl. Abb. 2-52), so zeigte sich, daß eine Zugabe innerhalb des ersten Tages nach Inokulation mit zunehmender Inkubationsszeit (0, 0,5 oder 1 Tag) der Kulturen zu einer höheren Biotransformationsleistung führte, daß aber die Transformation insgesamt langsam verlief und die Produktmaxima deutlich niedriger lagen als bei späteren Substratzugaben.



**Abb. 2-51:** Wachstumsverlauf von *P. sapidus* in Submerskultur



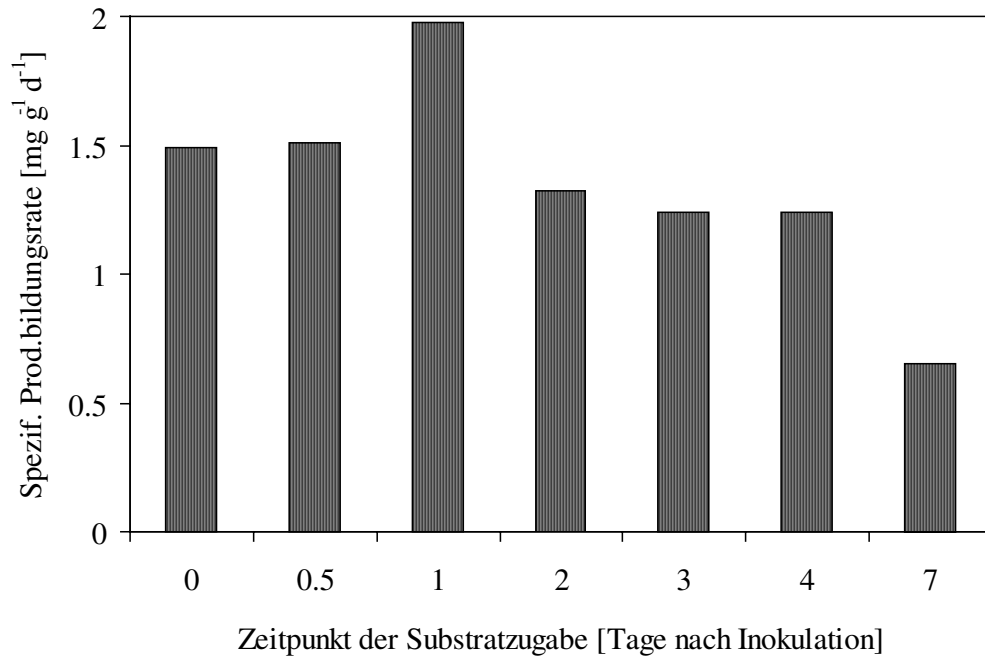
**Abb. 2-52:**  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus* bei Substratzusatz zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation

Die Vergleichbarkeit von Kulturen verschiedenen Alters konnte durch eine Normierung auf die Trockenmasse verbessert werden. Da aufgrund der Substrattoxizität eine Trockenmassebestimmung zu späteren Zeitpunkten der Transformation nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen führte, erschien die Trockenmasse vor Substratzugabe als sinnvollste Bezugsgröße. Da diese Trockenmasse die realen Bedingungen in der Kultur nur während der ersten Phase der Transformation annähernd wiedergibt, wurde die Normierung auf die ersten 24 Stunden der Transformationsdauer bezogen und folglich als Produktbildungsrate [ $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ] angegeben.

Abb. 2-53 zeigt, daß die spezifische Produktbildungsrate einen Tag nach der Inokulation maximal war, während sie nach 2, 3 und 4 Tagen wieder um ca. 20-30% abnahm. 7 Tage nach der Inokulation lag die Rate nur noch bei etwa 50% des anfänglichen Durchschnittswertes.

Aus einer Gegenüberstellung des Wachstumsverlaufes (Abb. 2-51), des Transformationsverlaufes (Abb. 2-52) und der spezifischen Produktbildungsrate (Abb. 2-53) wird deutlich, daß eine Substratzugabe nach 2-4 Tagen am günstigsten war. Nach einem Tag

war zwar die spezifische Produktbildungsrate am größten, aufgrund der geringen Trockenmasse zu diesem Zeitpunkt war aber die Gesamtproduktmenge hier im Vergleich zu späteren Substratzugabezeitpunkten deutlich geringer.



**Abb. 2-53:** Trockenmassespezifische Produktbildungsraten (1. Tag nach Substratzugabe) in Abhängigkeit vom Substratzugabezeitpunkt

#### 2.1.9.1.3 Substratzugabe über die Gasphase des Kulturkolbens

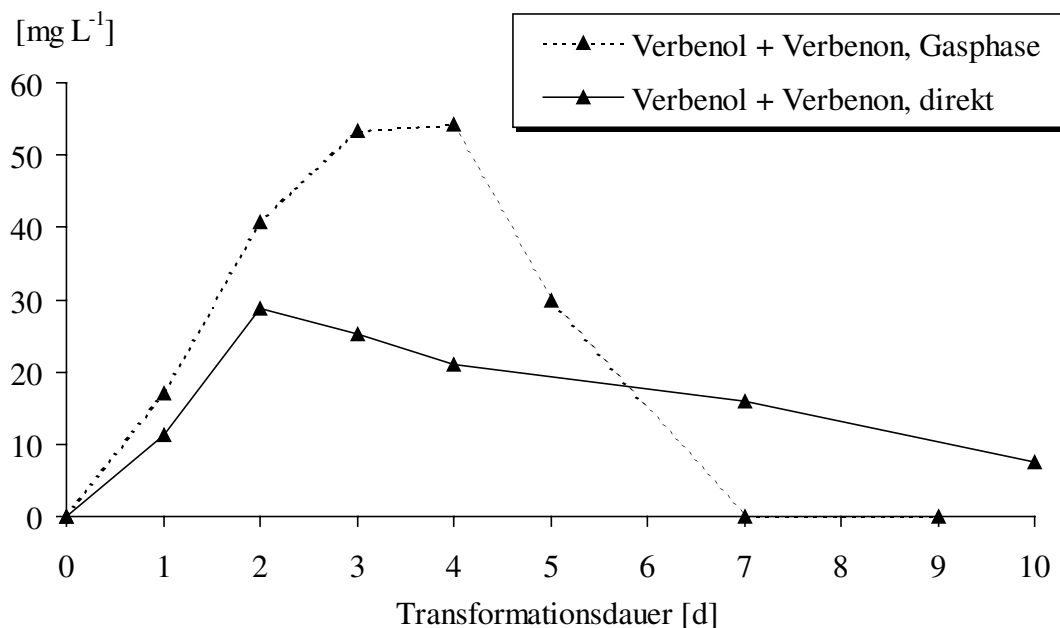
Für die Untersuchung der Gasphasendosierung wurden den 2,5 Tage alten Kulturen unter Verwendung eines Reservoirs (mit 500  $\mu\text{L}$  Terpen) die Substrate  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen bzw. Limonen über die Gasphase durch kontinuierliche Sättigung der Gasphase zudosiert.

Wie Abb. 2-54 und 2-55 zu entnehmen ist, führte die Gasphasendosierung bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen zwar zu einem in der Summe etwa doppelt so hohen Produktmaximum wie die direkte Dosierung, die Dauer der Produktbildungsphase wurde bei diesem Pilz jedoch nicht verlängert.

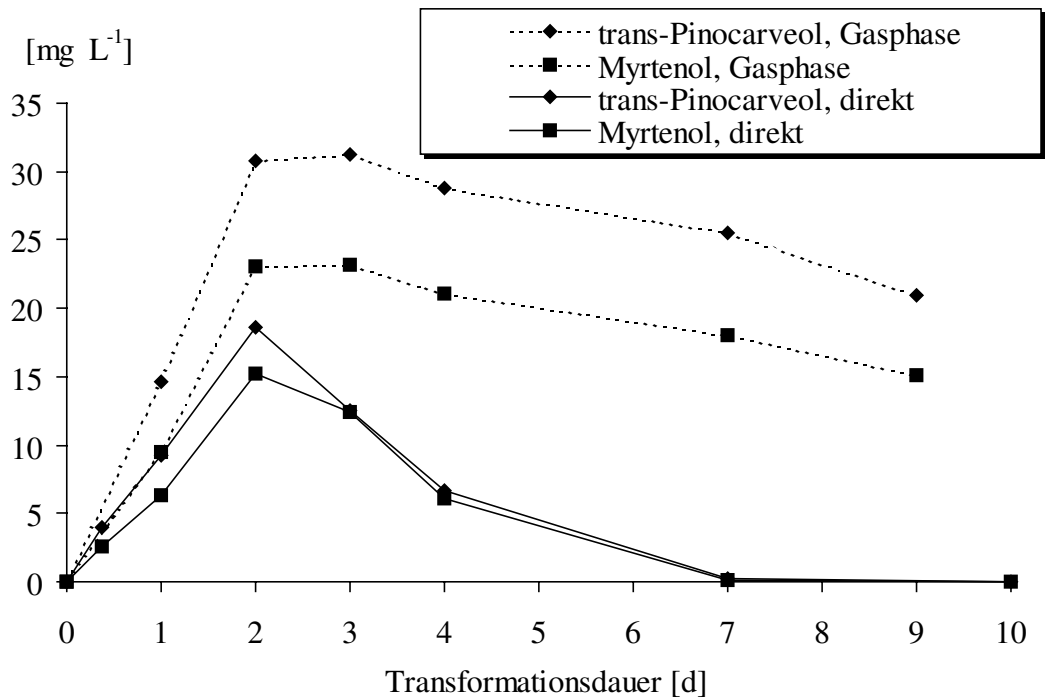
Anders wirkte sich die Gasphasenzugabe beim Limonen aus (Abb. 2-56): Während die Produktbildungsphase bei der direkten Fütterung – ähnlich wie bei den Pinenen – nur 4 Tage nach der ersten Substratdosierung andauerte, hielt sie bei Einsatz der Gasphasen-

dosierung bis zum 12. Transformationstag an. Der geänderte Dosierungsmodus führte also zu einer dreimal so langen Produktionsphase, die bis zum letzten Transformationstag eine Produktbildungsrate von ca.  $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  aufwies. Die Produktkonzentration war Maximum etwa 2,5 mal höher als bei direkter Substratzugabe.

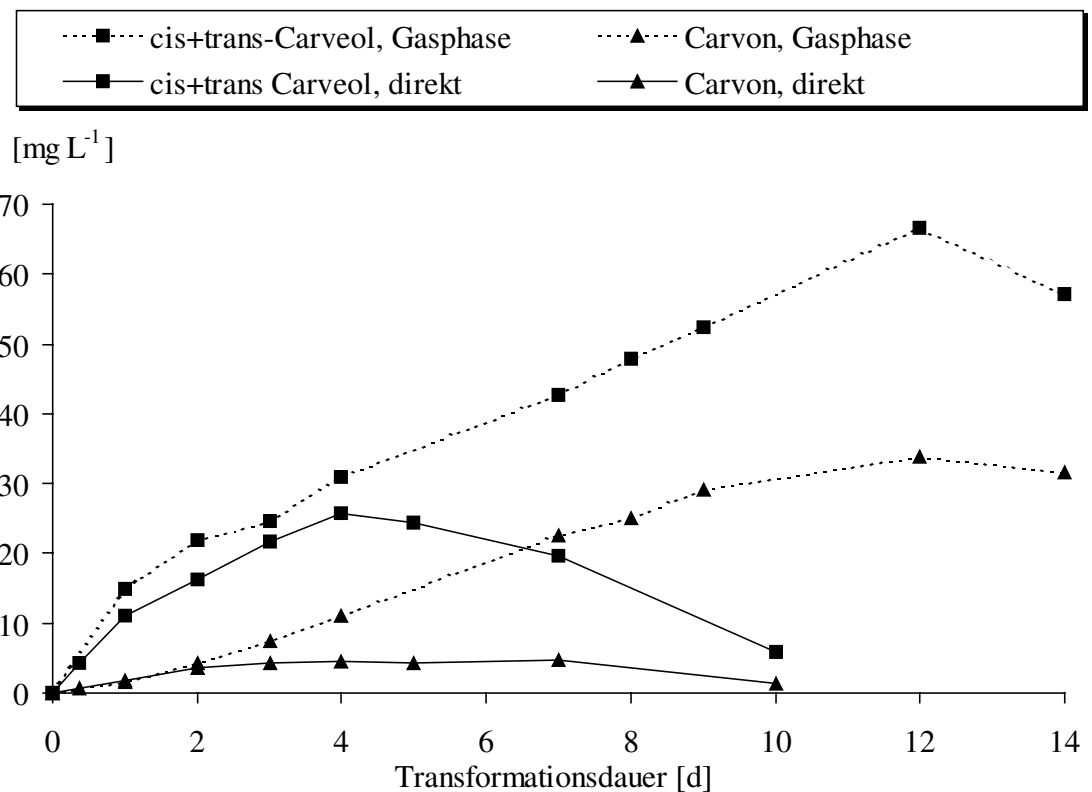
Auffällig war bei allen Kulturen, daß ein Wachstum trotz der Gasphasendosierung nicht festgestellt werden konnte (Wachstumsverläufe nicht dargestellt). Im Gegensatz zur direkten Dosierung, die jeweils an den Transformationstagen 0 und 1 durchgeführt wurde, war bei der Gasphasendosierung während der gesamten Transformationsdauer der Luftraum des Kolbens mit Substrat gesättigt. Während die Kulturen bei direkter Dosierung meist 2-3 Tage nach Transformationsbeginn wieder anwuchsen, war dies bei der Gasphasendosierung nicht zu beobachten.



**Abb. 2-54:** Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*



**Abb. 2-55:** Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der  $\beta$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*



**Abb. 2-56:** Vergleich der direkten und der Gasphasendosierung des Substrates bei der Limonen-Transformation durch *P. sapidus*

#### 2.1.9.1.4 Substratzugabe durch organisch-wäßrige Zweiphasensysteme

Die Untersuchung der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten in organisch-wäßrigen Zweiphasensystemen wurde mit *P. sapidus* und *G. applanatum* durchgeführt. Als organische Phasen wurden dünnflüssiges Paraffinöl und Miglyol® 812 S, eine Kokosölfraction mit mittelkettigen Fettsäuren (56% Octansäure, 42% Decansäure, <2% Dodecansäure), verwendet.

100  $\mu$ L (=0,63 mmol)  $\alpha$ -Pinen wurden in 5 mL dieser organischen Phasen gelöst und zu Beginn der Transformation zu den Kulturen (100 mL) gegeben.

Beide verwendeten Lösungsmittel zeichnen sich durch eine vergleichsweise geringe Toxizität, eine nicht zu hohe Viskosität und eine geringe Flüchtigkeit aus. Der letzte Punkt ist im Hinblick auf die Quantifizierung der oxyfunktionalisierten Terpene wichtig: Die Abtrennung der Produkte von der organischen Phase für die gaschromatographische Analyse einerseits und für einen biotechnologischen Prozeß andererseits ist am einfachsten mittels Wasserdampfdestillation möglich.

Um einen möglichst guten Stofftransport zwischen organischer und wäßriger Phase zu erreichen, wurde die Kultivierung außer in normalen Erlenmeyerkolben auch in Kolben mit 1 bzw. 4 Schikanen durchgeführt. Schikanekolben gewährleiten eine bessere Durchmischung der Phasen, können aber aufgrund der größeren mechanischen Belastung der Pellets auch zu einer Schädigung der Kulturen führen.

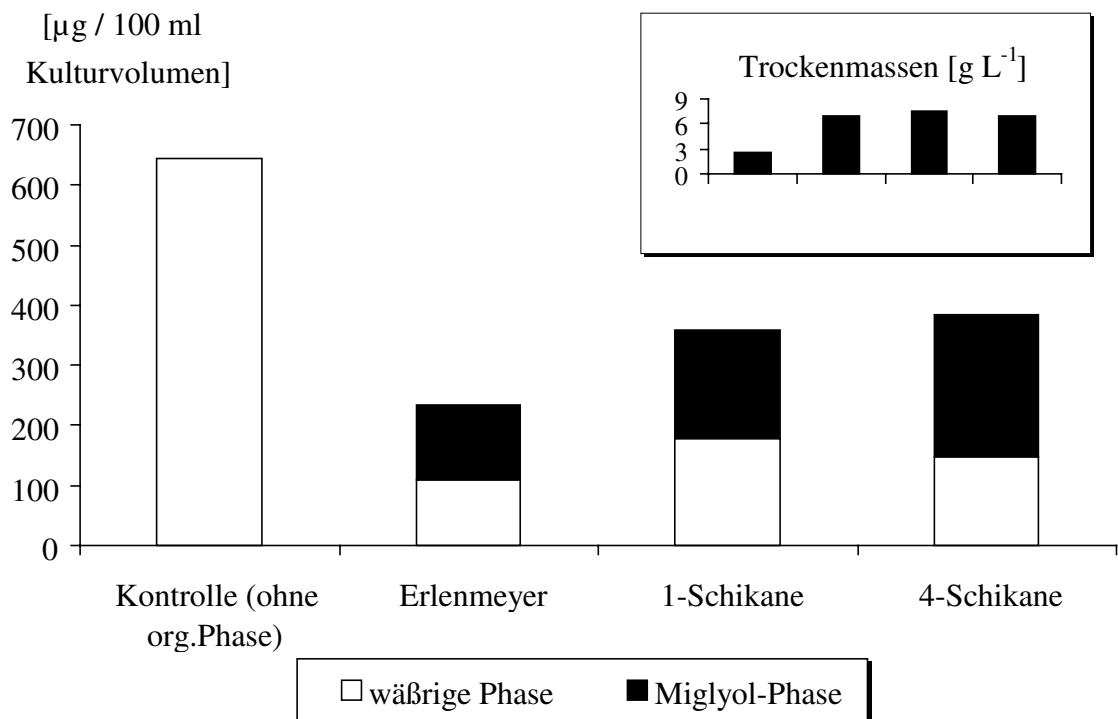
Hinsichtlich des Einflusses der Terpendosierung auf den Zusatz einer organischen Phase zeigen die Abb. 2-57 bis 2-59, daß die eingesetzten Pilze im Vergleich zum direkten Zusatz des  $\alpha$ -Pinens eine mehr als doppelt so große Trockenmasse aufwiesen.

Vergleicht man jedoch die Produktmengen bei Substratdosierung in einer zweiten organischen Phase mit der direkten Dosierung in die wäßrige Phase, so betrug beim Zweiphasensystem die Summe der Produkte nach 48 h Transformationsdauer in organischer und wäßriger Phase bei *P. sapidus* nur 30-50% und bei *G. applanatum* nur 10-15 %.

Bei der Transformation durch *P. sapidus* mit Paraffinöl als zweiter organischer Phase wurde das Paraffinöl so gut emulgiert und vom Pilzmyzel aufgenommen, daß eine Trennung der wäßrigen und der organischen Phase nicht mehr möglich war. Auch bei Miglyol und bei Verwendung von *G. applanatum* gingen 50-80% der eingesetzten organischen Phase durch Emulgierung im Medium bzw. Bindung im Myzel verloren.

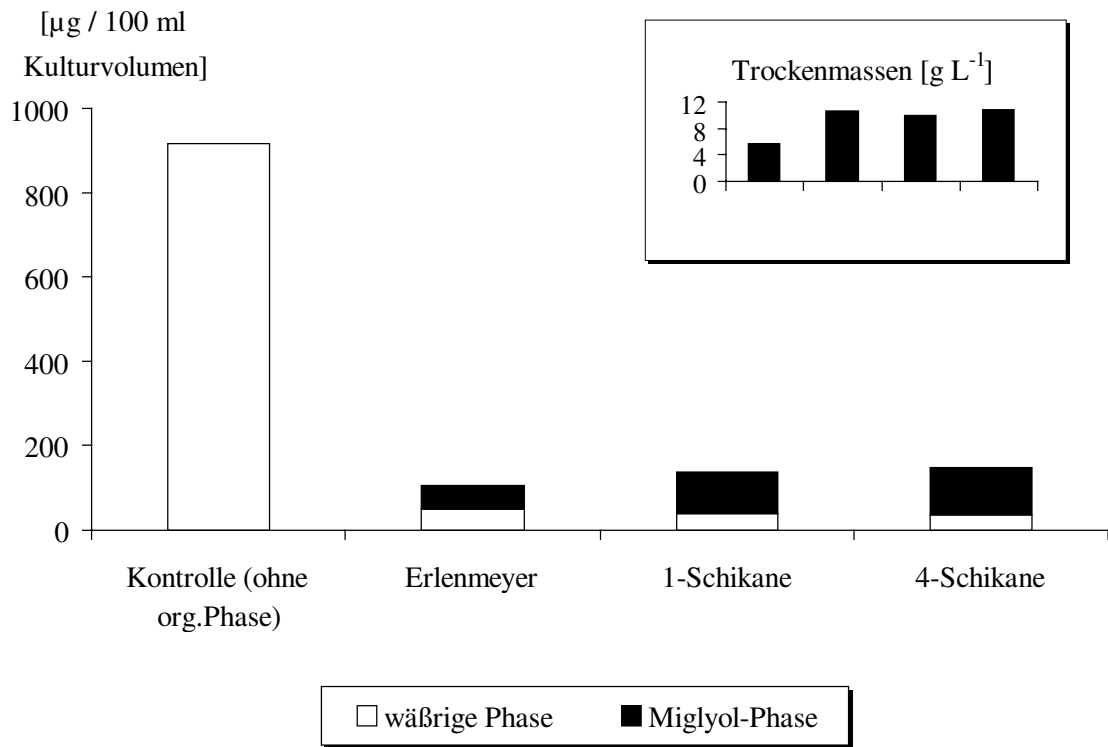
Die Bildung von stabilen Emulsionen wird durch die Abgabe oberflächenaktiver Substanzen in das Medium begünstigt. Solche Substanzen werden von sehr vielen Mikroorganismen produziert [21, 22] und stellen häufig ein Problem bei Biotransformationen in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen dar.

Da die Abtrennung der organischen Phase für die Produktgewinnung, aber auch für die Substratsupplementierung im Verlaufe eines kontinuierlichen Prozesses, notwendig ist, erschien die Verwendung von Zweiphasensystemen für Terpenttransformationen mit Pilzen nicht praktikabel. Weitergehende Untersuchungen von Zweiphasensystemen wurden aus diesem Grund und aufgrund der im Vergleich zum Kontrollwert ohne organische Phase stark verminderten Transformationsleistung nicht durchgeführt.

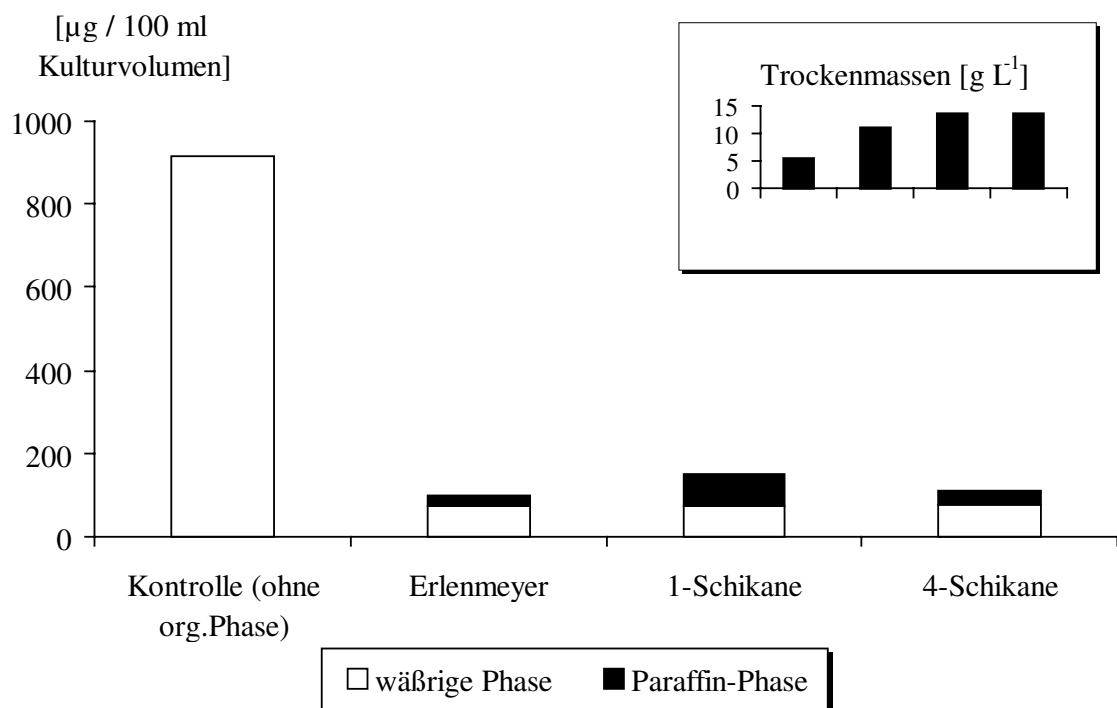


**Abb. 2-57:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (Summe Verbenol/Verbenon) von *P. sapidus* im Zweiphasensystem mit Miglyol als organischer Phase





**Abb. 2-58:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (Summe Verbenol/Verbenon) von *G. applanatum* im Zweiphasensystem mit Miglyol als org. Phase



**Abb. 2-59:**  $\alpha$ -Pinen-Transformationsprodukte (Summe Verbenol/Verbenon) von *G. applanatum* im Zweiphasensystem mit Paraffinöl als org. Phase

#### 2.1.9.1.5 Verbesserung der Substratverfügbarkeit durch Zusatz nichtionischer Tenside

Die geringen Umsatzraten bei Terpenttransformationen durch Basidiomyceten können unter anderem auf die schlechte Wasserlöslichkeit der Terpenkohlenwasserstoffe und auf eine limitierte Verfügbarkeit der Substrate am Wirkort der Enzyme (Zellmembran, Cytosol oder andere Zellkompartimente) zurückzuführen sein. Eine Verbesserungsmöglichkeit bietet die Emulgierung des Terpensubstrates in wäßrigen Tensidlösungen.

Ionische Tenside sind aufgrund ihrer bekannten antimikrobiellen Eigenschaften weniger geeignet. Daher wurden in den durchgeführten Versuchen nur nichtionische Tenside verwendet.

Emulsionen von  $\alpha$ -Pinen in wäßrigen Lösungen verschiedener nichtionischer Tenside wurden zu Kulturen von *P. sapidus* und *G. applanatum* dosiert. Als Tenside wurden Tween 80, Tween 65, Span 20, Triton X-100 und Brij 35 in Konzentrationen von 0,1 , 1,0 und 5,0 g L<sup>-1</sup> verwendet. Die  $\alpha$ -Pinenkonzentration betrug jeweils 500 mg L<sup>-1</sup> (=3,67 mmol L<sup>-1</sup>). Geringere Pinengehalte im Medium hatten in Vorversuchen nicht zu meßbarer Produktbildung geführt, daher wurde diese relativ hohe Konzentration gewählt.

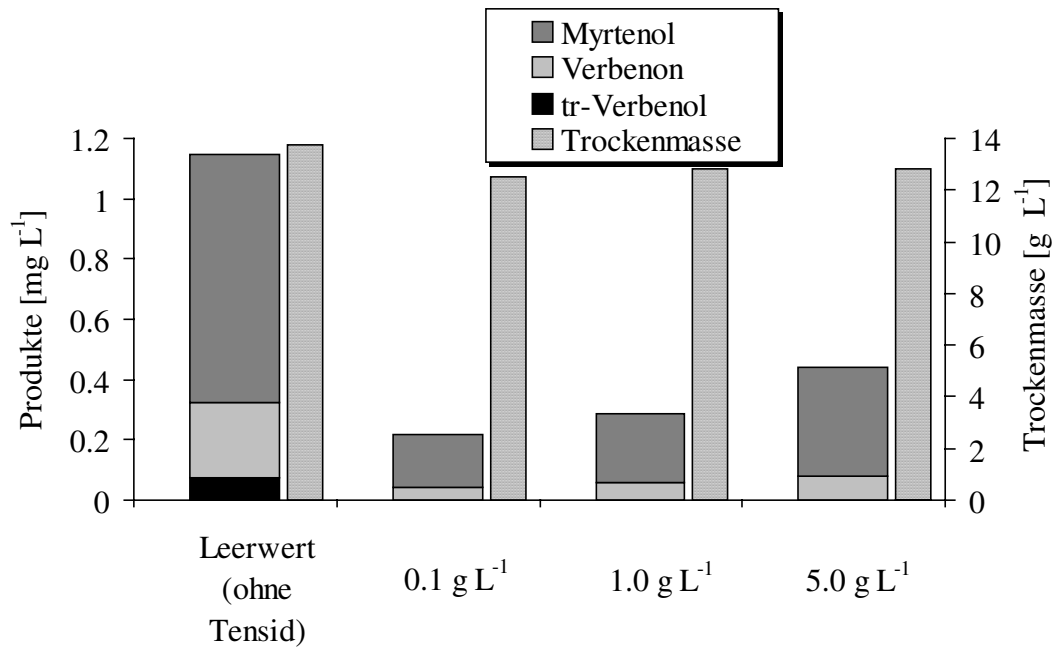
Zunächst ist wieder der Einfluß des Tensidzusatzes auf das Kulturwachstum zu beachten: Die Abb. 2-60 bis 2-64 zeigen für *P. sapidus* und die Abb. 2-65 bis 2-69 für *G. applanatum*, daß mit wenigen Ausnahmen die Trockenmasse im Vergleich zum tensidfreien Kontrollwert abnahm, je höher die Tensidkonzentration war.

Ausnahmen bildeten die Kulturen mit 5,0 g L<sup>-1</sup> Tween 80 bzw. Tween 65 bei *P. sapidus* und mit 5,0 g L<sup>-1</sup> Tween 65 bei *G. applanatum*: Hier entsprach die Trockenmasse in etwa dem tensidfreien Kontrollwert.

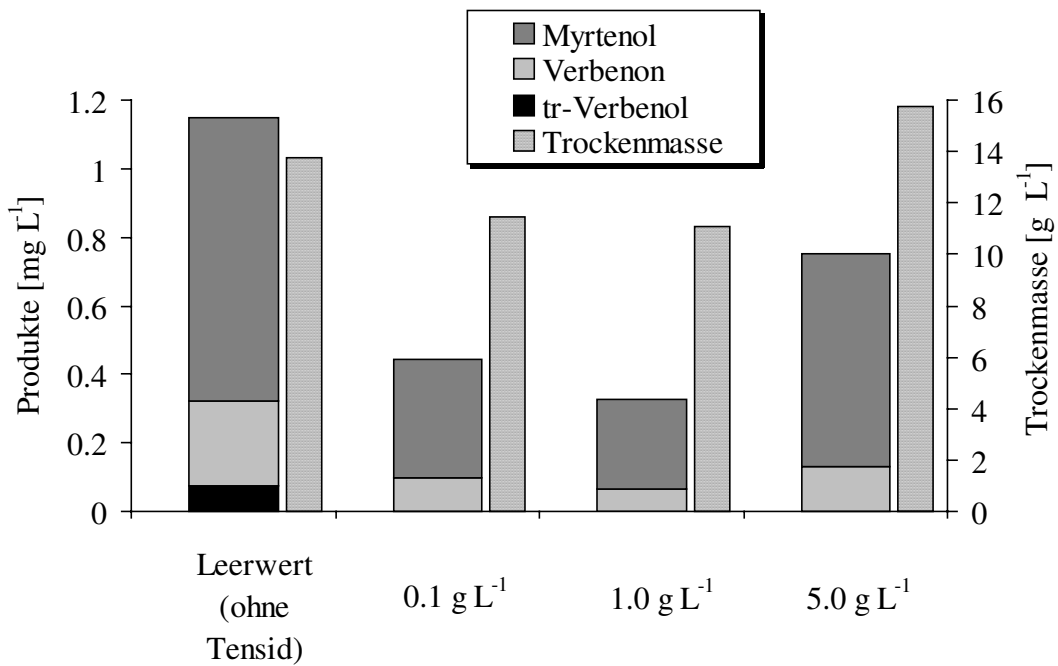
Die Menge der gebildeten Transformationsprodukte nahm bei Tensidzusatz im Vergleich zum tensidfreien Kontrollwert fast ausnahmslos deutlich ab.

Nur bei 0,1 g L<sup>-1</sup> Span 20 (Abb. 2-62 und 2-67) war bei beiden Pilzen die Produktmenge geringfügig höher als im Kontrollwert. Bei den höheren Span 20-Konzentrationen entsprach die abnehmende Produktmenge jedoch der Tendenz bei den anderen Tensiden.

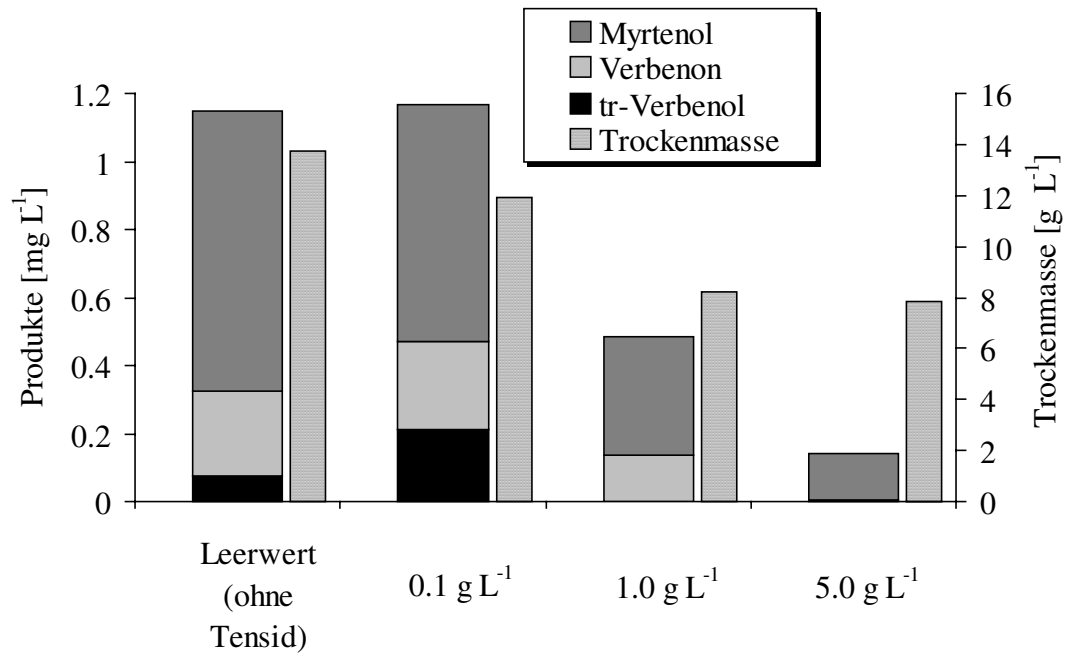
Tensidzusätze führten also bei den hier eingesetzten Pilzen und unter den gewählten Bedingungen unabhängig von der Tensidkonzentration zu keiner Verbesserung der Bio-transformation, in den meisten Fällen sogar zu einer Verschlechterung.



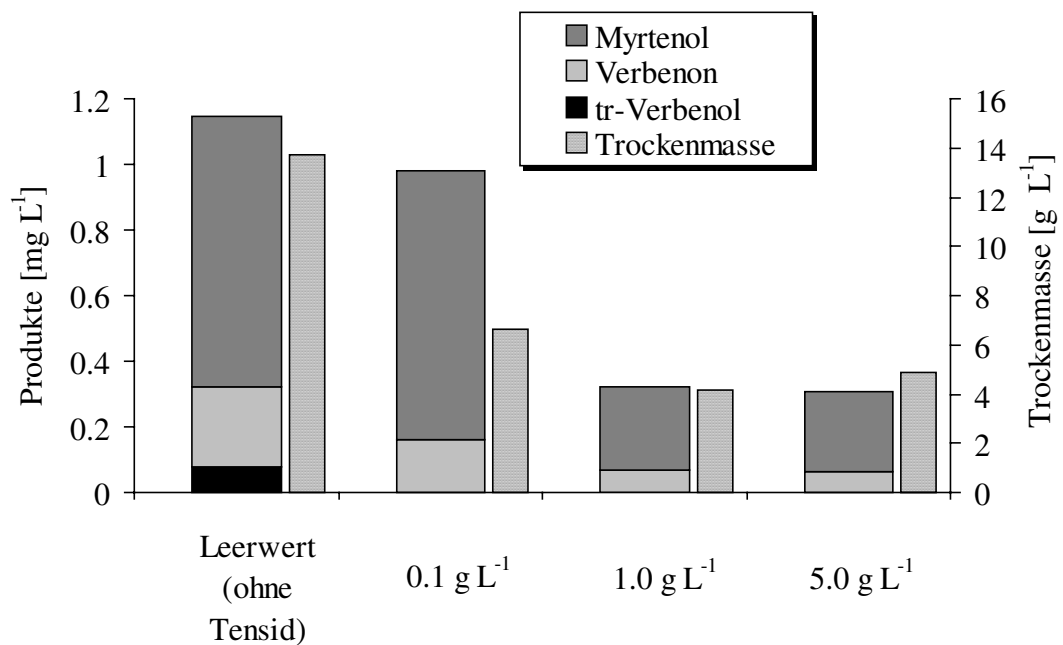
**Abb. 2-60:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *P. sapidus* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Tween 80



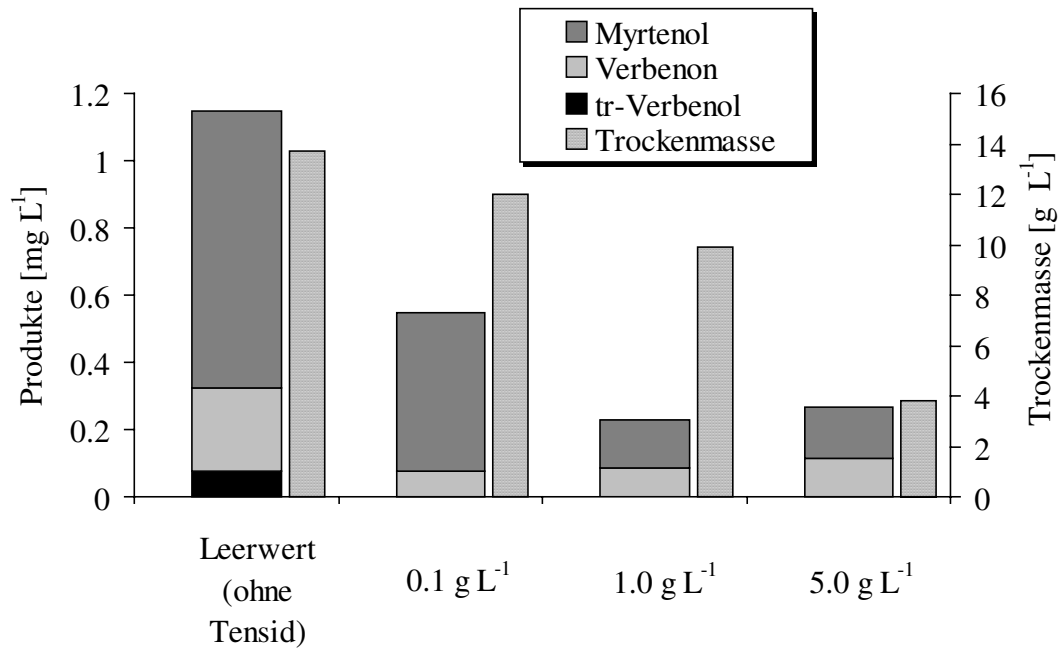
**Abb. 2-61:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *P. sapidus* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Tween 65



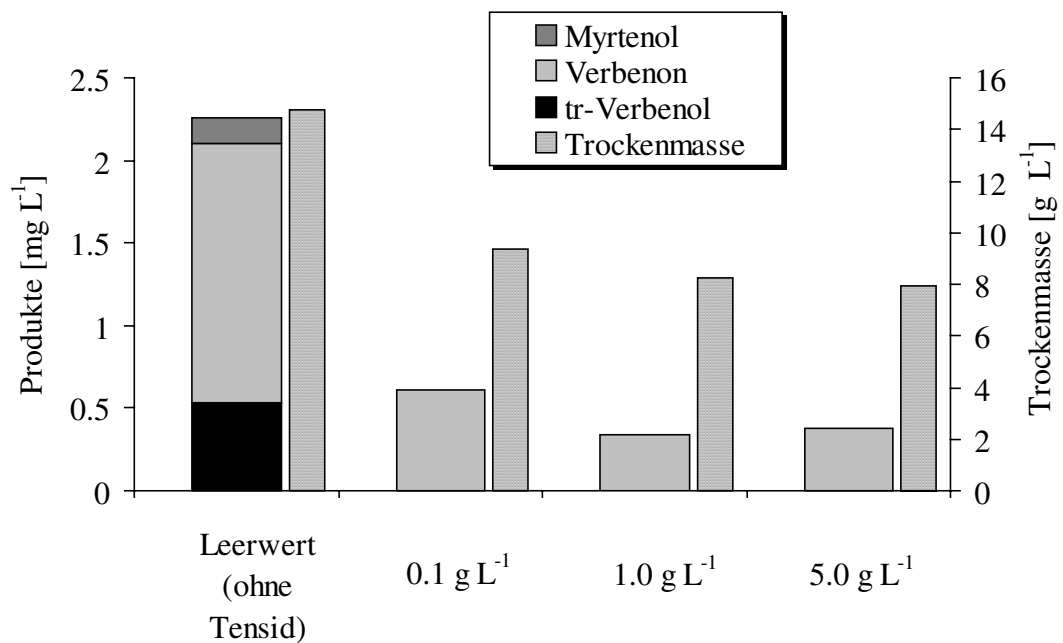
**Abb. 2-62:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *P. sapidus* bei Substratzusatz in wäbri ger Emulsion von Span 20



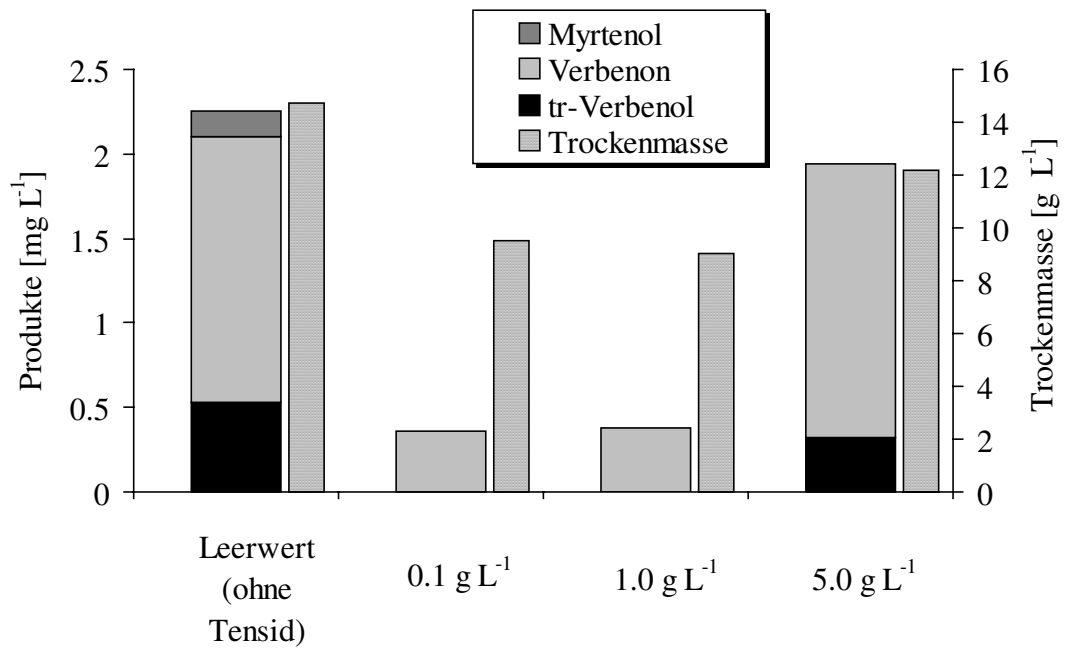
**Abb. 2-63:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *P. sapidus* bei Substratzusatz in wäbri ger Emulsion von Triton X-100



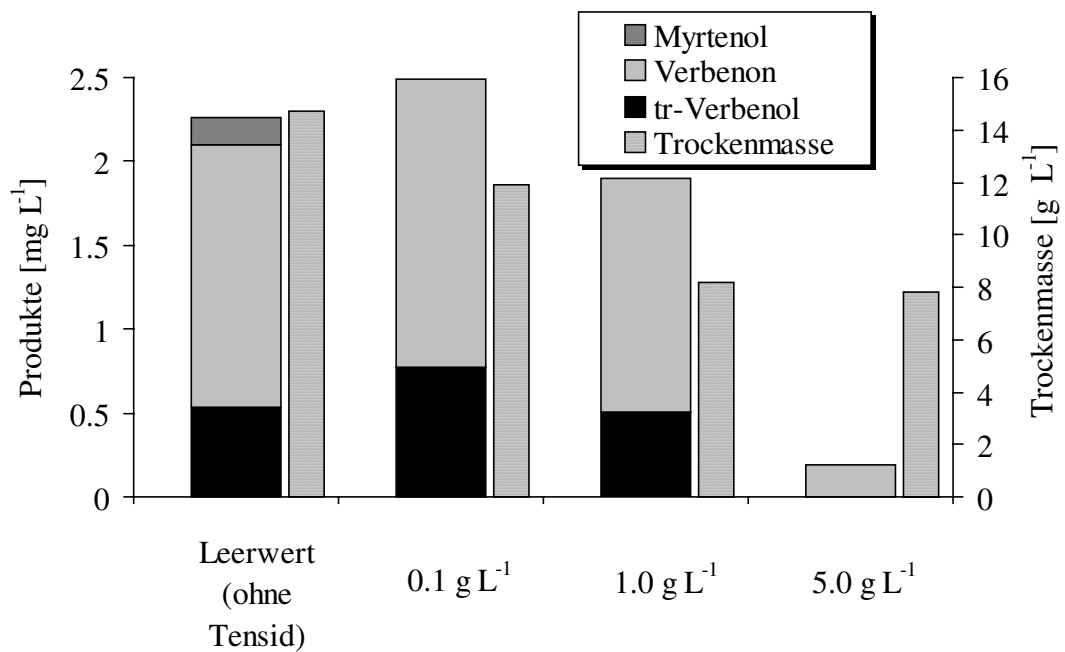
**Abb. 2-64:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *P. sapidus* bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Brij 35



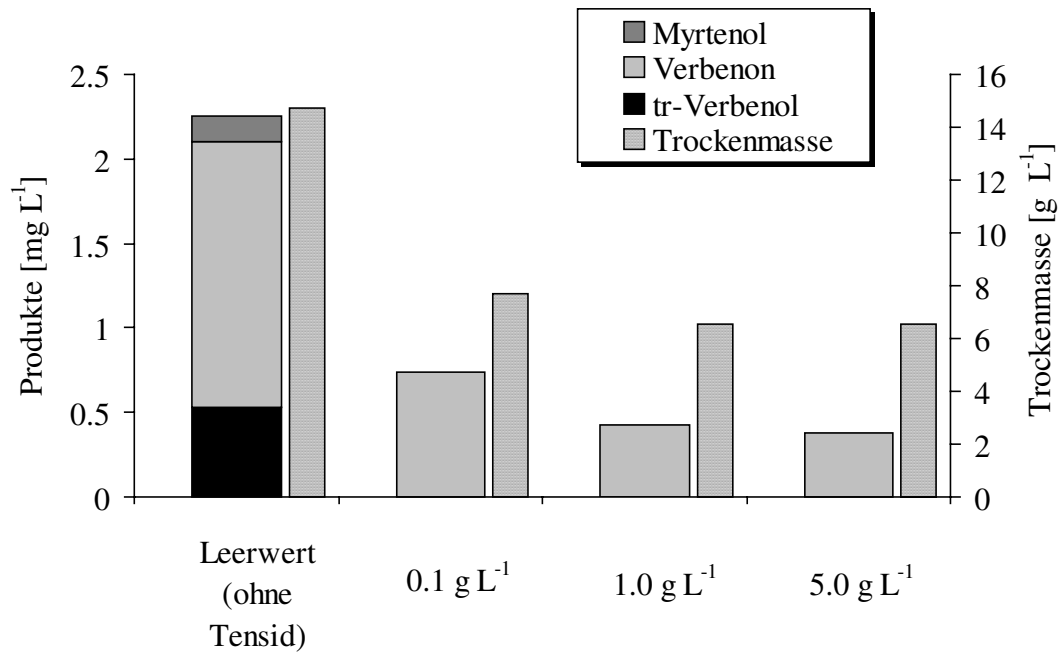
**Abb. 2-65:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *G. applanatum* bei Substratzusatz in wäßriger Emulsion von Tween 80



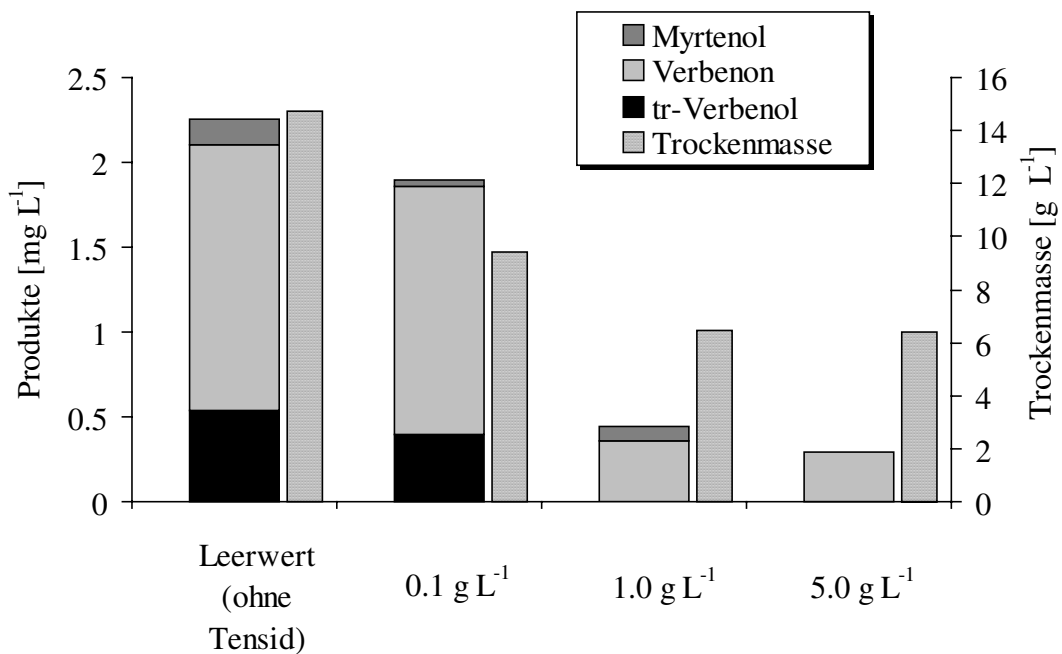
**Abb. 2-66:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *G. applanatum* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Tween 65



**Abb. 2-67:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *G. applanatum* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Span 20



**Abb. 2-68:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *G. applanatum* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Triton X-100



**Abb. 2-69:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *G. applanatum* bei Substratzusatz in wässriger Emulsion von Brij 35

### 2.1.9.1.6 Substratzugabe in liposomaler Lösung

Für die Substratzugabe in liposomaler Lösung wurden kleine unilamellare Liposomen (small unilamellar vesicles, SUVs) hergestellt.

Als Lipide wurden Ei- bzw. Sojaphosphatidylcholin gewählt, da Phospholipide sich gut und schnell in Lipiddoppelschichten anordnen und daher für die Herstellung von Liposomen besonders geeignet sind.

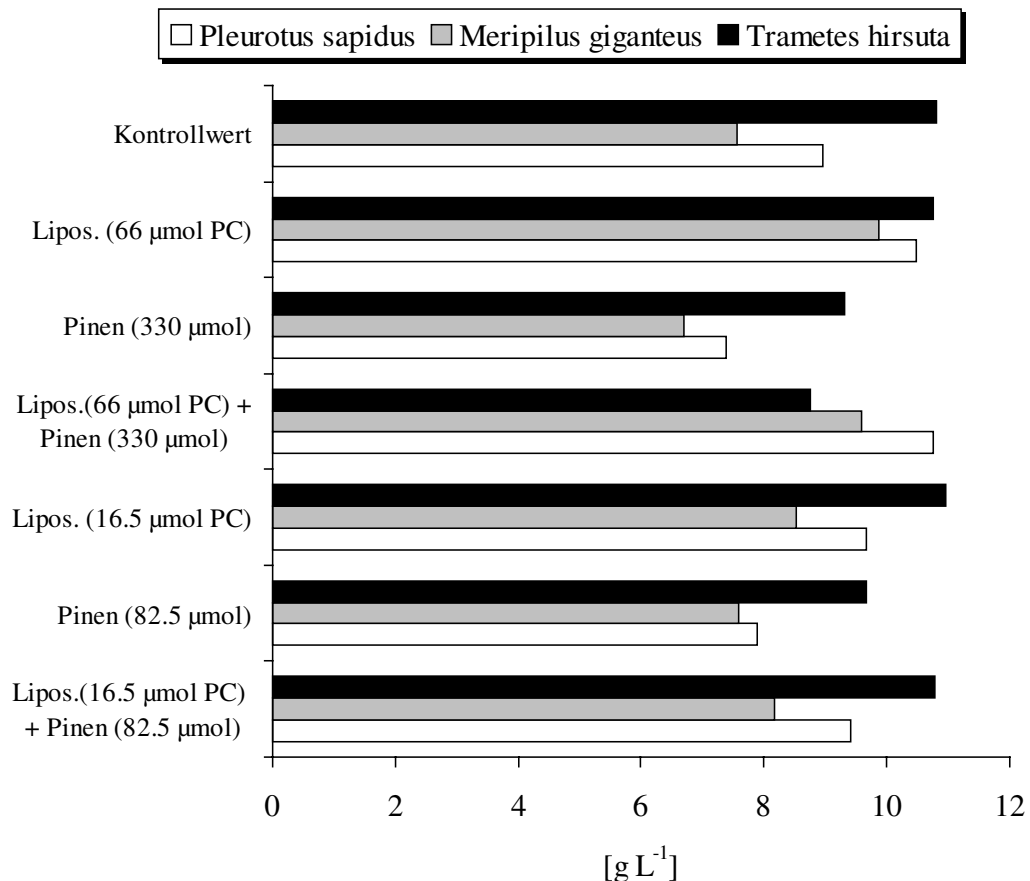
Das molare Verhältnis von 5 Teilen  $\alpha$ -Pinen und 1 Teil Phosphatidylcholin wurde aufgrund von Vorversuchen ausgewählt, weil dadurch eine möglichst große Menge an Substrat pro Lipideinheit in die Kultur eingebracht werden konnte und außerdem das Substrat vollständig in den lipophilen Intramembranraum eingeschlossen wurde. Bei größeren Substrat/Phosphatidylcholin-Verhältnissen waren ungelöste  $\alpha$ -Pinen-Tröpfchen in der wässrigen Phase erkennbar.

Betrachtet man das **Kulturwachstum** der drei eingesetzten Pilzstämmen *P. sapidus*, *M. giganteus*, *T. hirsuta* nach zwei Tagen Transformationszeit (=4,5 Tage Gesamtkulturzeit), so ergibt sich aus Abb. 2-70 folgendes Bild:

- *P. sapidus* und *M. giganteus* wuchsen bei Liposomenzusatz deutlich besser: Bei Zugabe von 16,5  $\mu\text{mol}$  Phosphatidylcholin pro 100 mL Kulturvolumen war die Trockenmasse nach 4,5 Kulturtagen um ca. 0,5  $\text{g L}^{-1}$  größer als im liposomenfreien SNLH-Medium (= Kontrollwert). Bei Zugabe von 66  $\mu\text{mol}$  Phospholipid war sie um ca. 1  $\text{g L}^{-1}$  größer.
- Dies gilt ebenso für die mit  $\alpha$ -Pinen beladenen Liposomen: Der Terpenzusatz hatte hier im Gegensatz zu den Kulturen mit direkter Pinenzugabe, unabhängig von der zugesetzten Terpenmenge (82,5 bzw. 330  $\mu\text{mol}$ ), keine Auswirkungen auf das Kulturwachstum.
- *T. hirsuta* unterschied sich in seinem Wachstumsverhalten etwas von den beiden anderen Pilzen: Bei der niedrigeren Liposomenmenge bildete dieser Pilz ohne und mit Pinenzusatz ebenfalls eine im Vergleich zum Kontrollwert größere Trockenmasse. Bei der höheren Menge nahm das Wachstum jedoch im Vergleich zur niedrigeren Konzentration nicht mehr zu, wahrscheinlich aufgrund einer Limitierung durch einen anderen Medienbestandteil.



- Die Zugabe einer größeren Substratmenge in liposomaler Lösung führte bei *T. hirsuta* zu einer geringeren Trockenmasse als bei der direkten Dosierung. Das lässt auf eine Membranschädigung schließen, die durch einen im Vergleich zur direkten Substratzugabe effektiveren Eintrag von Pinen in die Zellmembran bedingt ist.

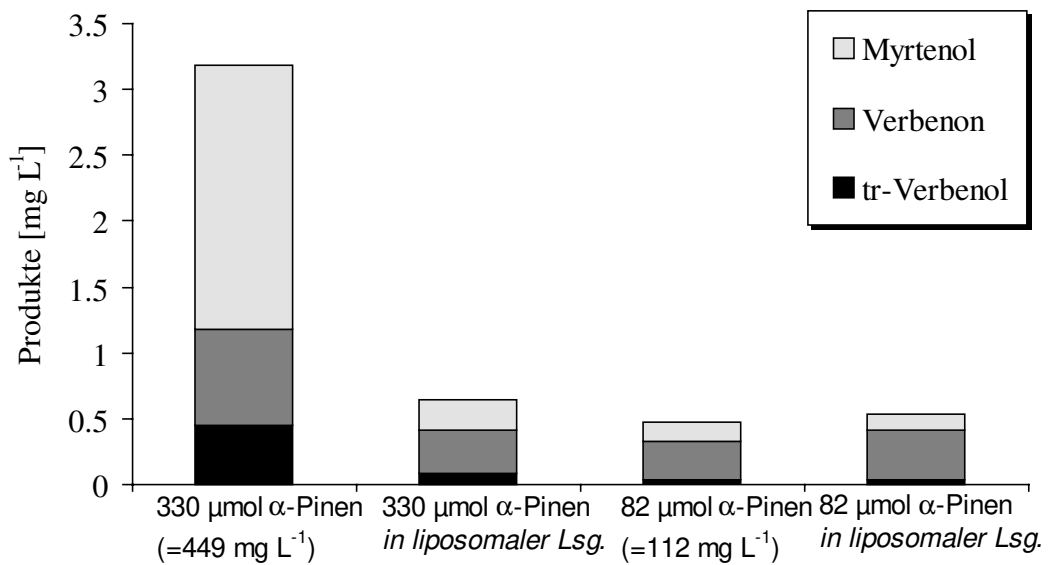


**Abb. 2-70:** Vergleich der Trockenmassen von *P. sapidus*, *M. giganteus* und *T. hirsuta* nach 2 Tagen Transformationszeit bei Zusatz von liposomalen Lösungen (Substratmengen je 100 mL Kulturvolumen)

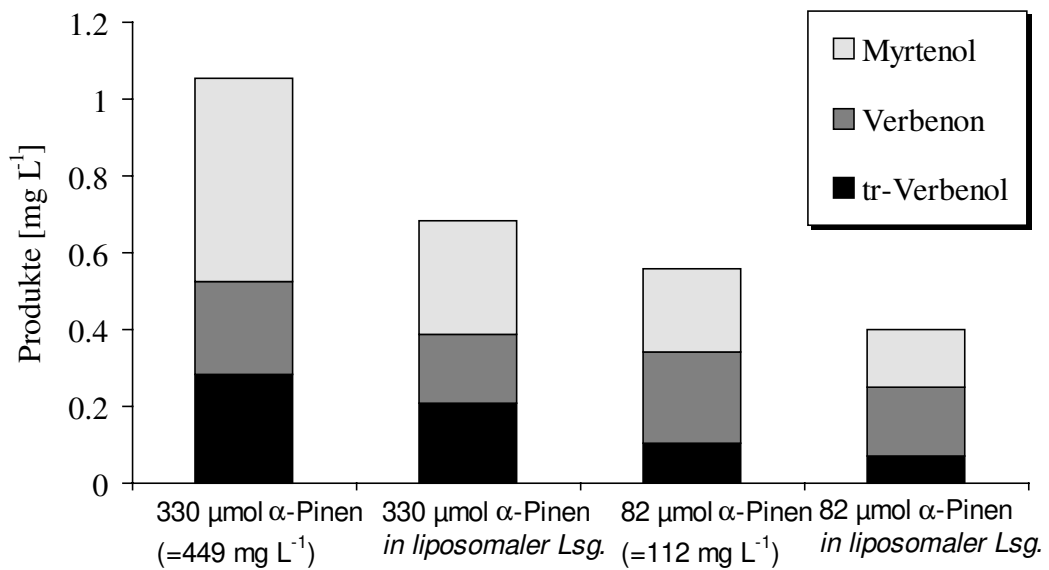
Bezüglich der **Transformationsleistung** ergab sich folgendes:

- Bei *P. sapidus* (Abb. 2-71) wurde sie durch den Zusatz von liposomal gelöstem  $\alpha$ -Pinen im Vergleich zur direkten Substratzugabe bei der niedrigeren Zugabemenge geringfügig verbessert, bei der höheren Menge jedoch deutlich verschlechtert.
- Bei *M. giganteus* (Abb. 2-72) bewirkten die Liposomen bei beiden Konzentrationen eine Verringerung der gebildeten Produktmenge.

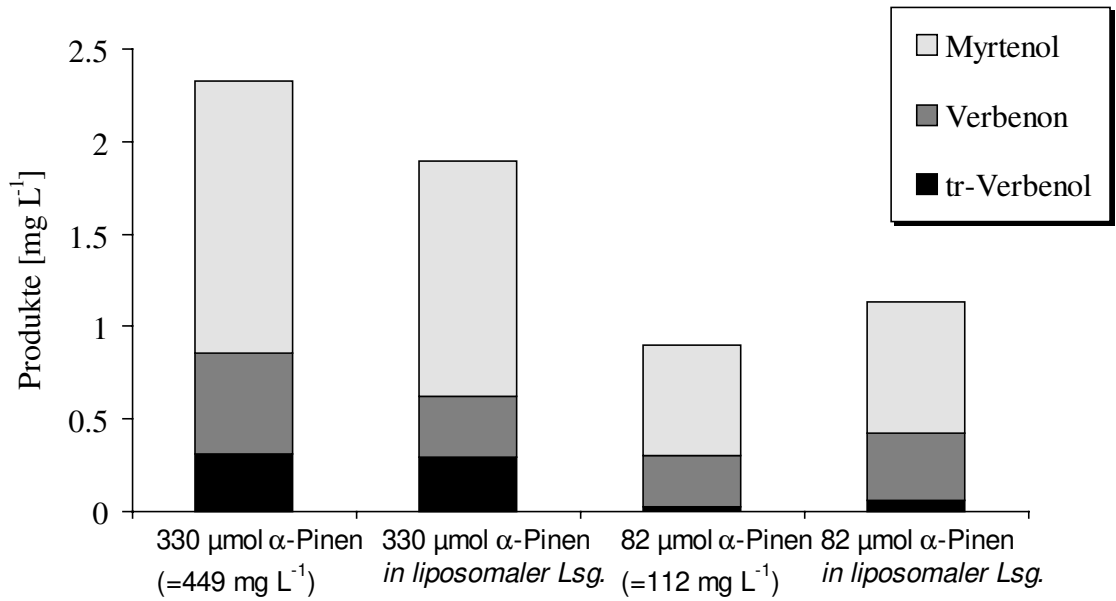
- Bei *T. hirsuta* wurden Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin (Abb. 2-73) und aus Sojaphosphatidylcholin (Abb. 2-74) miteinander verglichen. Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Art des verwendeten Phospholipid keinen Einfluß auf die Transformation von  $\alpha$ -Pinen in liposomaler Lösung hatte. *T. hirsuta* zeigte für Ei-Phosphatidylcholin bei der niedrigeren Liposomen- und Substratmenge eine um 26% höhere Produktmenge im Vergleich zur direkten Substratzugabe, die absolute Konzentration an Produkt blieb mit  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$  niedrig. Zur Erzielung größerer Produktmengen müßte mehr Substrat zudosiert werden. Das wiederum führte, ebenso wie bei den anderen beiden Pilzstämmen, zu einer geringeren Produktbildung.



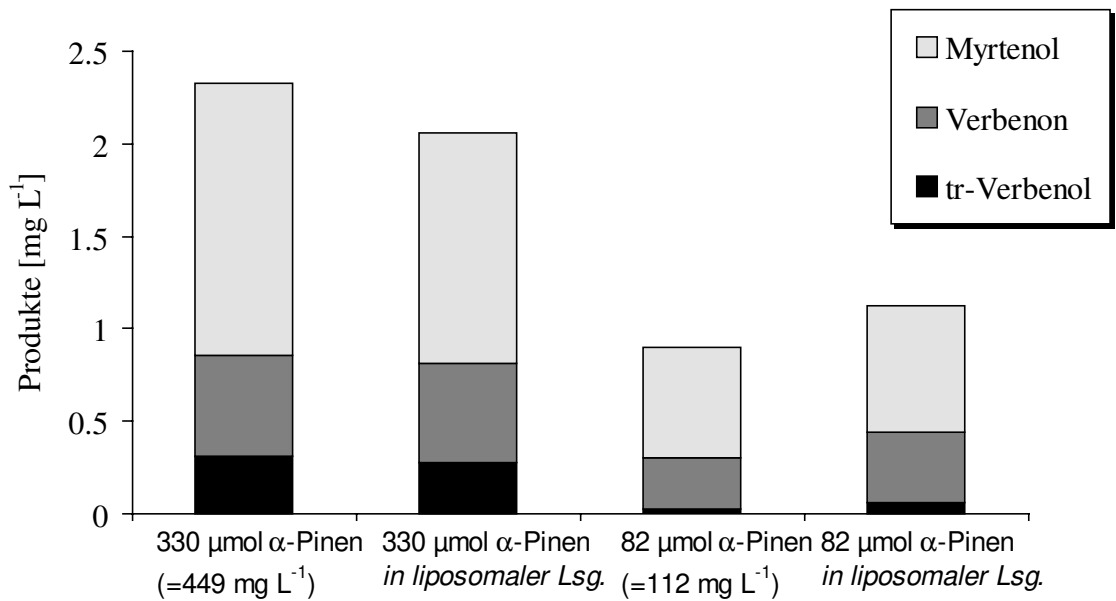
**Abb. 2-71:** Substratzugabe direkt und in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin:  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus*



**Abb. 2-72:** Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin:  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *M. giganteus*



**Abb. 2-73:** Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Ei-Phosphatidylcholin:  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *T. hirsuta*



**Abb. 2-74:** Substratzugabe in liposomalen Lösungen aus Soja-Phosphatidylcholin:  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *T. hirsuta*

### 2.1.9.2 Optimierung der Sauerstoffversorgung

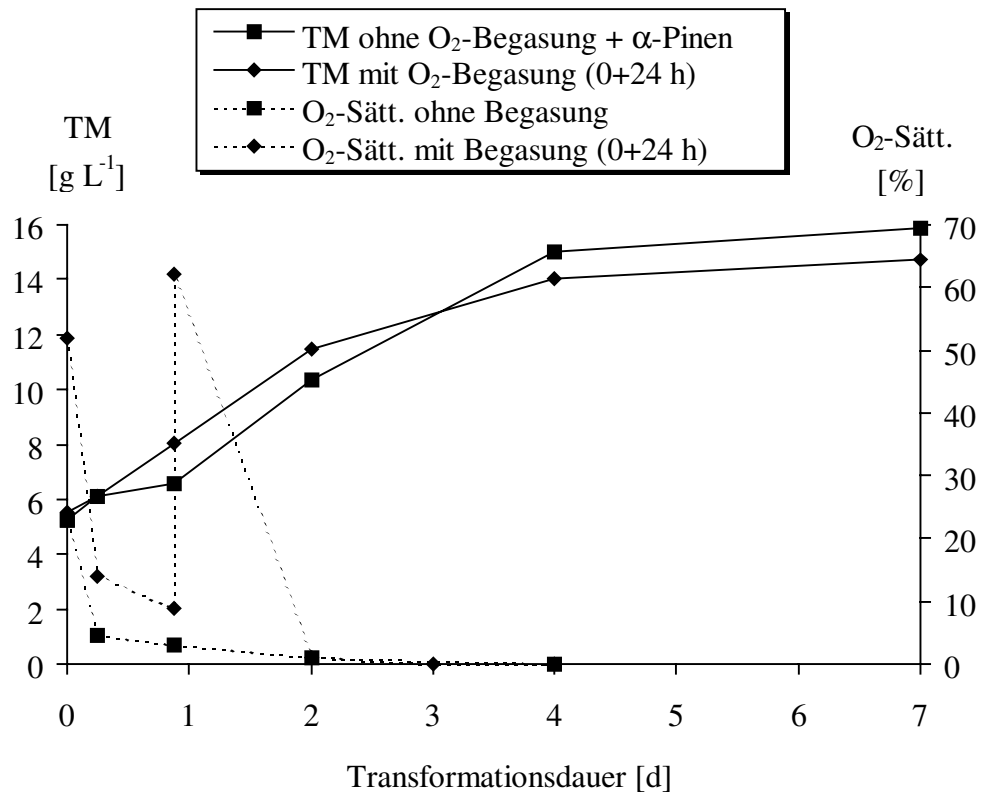
Nach den Versuchen zu einer Verbesserung der Dosiermethode für das Terpensubstrat blieb als weitere Möglichkeit für die geringen Transformationsraten neben zu geringer Enzymaktivität noch die Limitierung durch das zweite Substrat bei der Oxyfunktionalisierung: Den Sauerstoff.

Für den hier beschriebenen Versuch in Kulturkolben wurde eine diskontinuierliche Begasung mit reinem Sauerstoff vorgenommen. Dazu wurde direkt vor der 1. und 2. Substratzugabe (0 und 24 h Transformationsdauer) jeweils 5 min begast, um die Gasphase im Kolbeninneren vollständig mit Sauerstoff zu füllen.

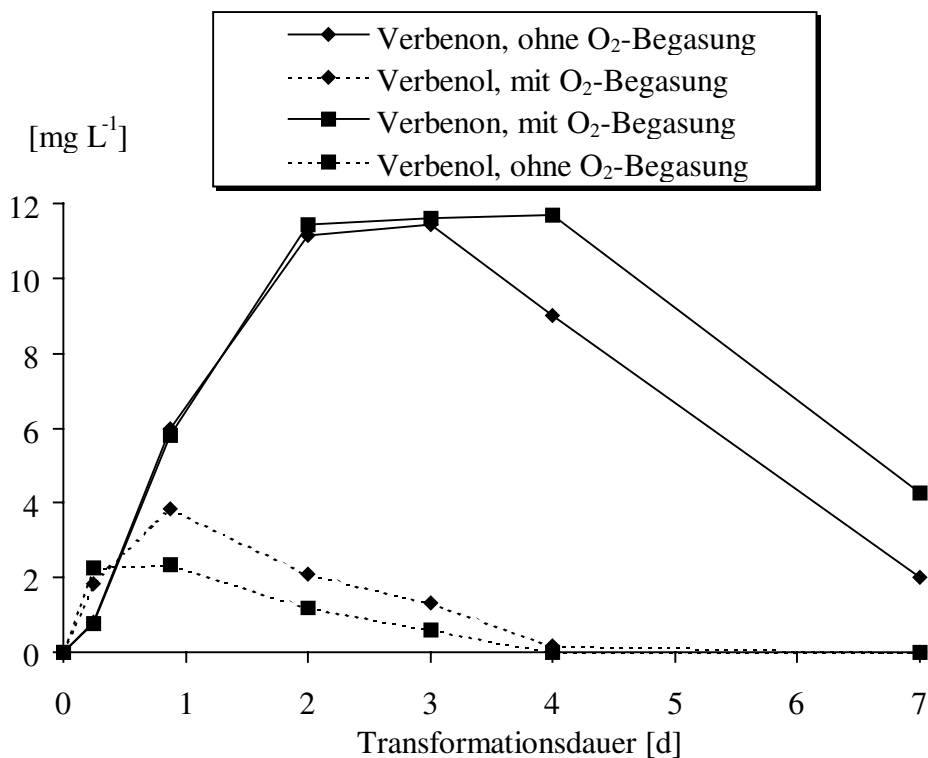
Gemäß Abb. 2-75 wurde das Kulturwachstum durch die zusätzliche Sauerstoffzufuhr nicht beeinflusst. Die im Kulturverlauf gemessene Sauerstoffsättigung lag in den zusätzlich begasten Kulturen deutlich über den normalen Kulturen, eine gute Sauerstoffsättigung (mind. 50%) war jedoch nur direkt nach der Begasung gewährleistet.

Bei der Produktbildung war ein positiver Einfluß auf die Verbenolbildung festzustellen. Sie nahm um 50-60% zu, blieb aber auf niedrigem Niveau von max. 3-4 mg L<sup>-1</sup>. Die Bildung des Hauptproduktes –Verbenon – wurde jedoch durch die zusätzliche Begasung nicht beeinflusst.

Insgesamt erwies sich die Begasung im Kulturkolben bei Biotransformationen flüchtiger Substrate als nicht praktikabel. Bessere Möglichkeiten sind nur unter kontrollierteren Bedingungen im Bioreaktor gegeben (vgl. 2.2.6).



**Abb. 2-75:** Trockenmasse und Sauerstoffsättigung im Verlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus* mit und ohne zusätzliche Sauerstoffbegasung



**Abb. 2-76:** Produktbildung im Verlauf der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus* mit und ohne zusätzliche Sauerstoffzuführung

### **Teilzusammenfassung 2.1.9**

- Die direkte Zugabe von Monoterpenkohlenwasserstoffen führte erst bei Mengen von 100 µL oder mehr je 100 mL Kultur zu nennenswerten Transformationsleistungen.
  - Die kontinuierliche Dosierung des Substrates über ein Gasphasenreservoir bewirkte bei der Limonentransformation eine Verlängerung der Produktionsphase (ca. um Faktor 3) und eine Erhöhung der Produktkonzentration (ca. um Faktor 2,5). Für die weiteren durchgeführten Limonentransformationen wurde daher diese Methode angewendet.
  - Die Substratzugabe sollte in der Wachstumsphase des Pilzes liegen. Ein Kulturalter von 2-4 Tagen erwies sich für *P. sapidus* als günstigster Zeitpunkt.
  - Organisch-wäßrige Zweiphasensysteme, Tensidemulsionen und liposomale Substratlösungen führten bei den untersuchten Pilzen zu keiner Verbesserung der Transformationsleistung. Vielmehr wurden im Vergleich zu der direkten Dosierung meist geringere Produktmengen gebildet. Auf eine Anwendung und weitere Untersuchung dieser Methoden wurde daher verzichtet.
  - Eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung im Kulturkolben erwies sich als schwierig. Bessere Möglichkeiten sind in Bioreaktoren gegeben.
- ⇒ Fazit: Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß die Ursachen für die geringen Transformationsraten nicht in den Kulturbedingungen und auch nicht in einer limitierten Verfügbarkeit der Terpensubstrate am Wirkort der Enzyme zu suchen sind.

### **2.1.10 Langzeitverhalten von Basidiomyceten bei Kultivierung in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen**

#### **2.1.10.1 Adaptionverhalten verschiedener Basidiomyceten in Gegenwart von $\alpha$ -Pinen**

Die übliche Vorkulturführung beinhaltete eine 17-tägige Submerskultivierung ohne Terpensubstrat. Nun war von Interesse, wie sich eine längerfristige Submerskultivierung auf die Transformationsleistung verschiedener Basidiomycetenstämme auswirken wür-

de, und ob eine Vorkulturführung in Gegenwart von  $\alpha$ -Pinen zu einer Adaption der Kulturen und dadurch zu einer verbesserten Transformationsleistung führen würde.

Dazu wurden Vorkulturen von *P. sapidus*, *G. applanatum*, *T. hirsuta*, *M. giganteus* und *G. frondosa* über einen Zeitraum von insgesamt 14 Wochen submers kultiviert. Von jedem Stamm wurden Vorkulturen mit und ohne  $\alpha$ -Pinenzusatz geführt. Die Adaption erfolgte dabei hauptsächlich in den *Vorkulturen 1*, d.h. im SNLB-Medium (ohne komplexe Zusätze), während die *Vorkulturen 2* (SNLH-Medium) jeweils nur eine Woche alt waren. Die adaptierten Kulturen wuchsen im Vergleich zu den nicht-adaptierten Kulturen deutlich schlechter (Trockenmassen nicht dargestellt).

Nach 1, 6, 10 und 14 Wochen Vorkulturalter wurden experimentelle Kulturen angesetzt und die Biotransformationsleistung der adaptierten und nichtadaptierten Pilze anhand der Produktmengen nach 48 h Transformationszeit verglichen. Nach 6 Wochen Vorkulturalter wurde außerdem der zeitliche Verlauf der Biotransformation in allen Kulturen näher untersucht.

*P. sapidus*: Eine Woche Adaptionszeit (Abb. 2-77) führte zu einer etwas größeren Produktmenge als in den nichtadaptierten Kulturen. Nach 6 Wochen Adaption war der Unterschied deutlicher: Die Produktkonzentration war in den adaptierten Kulturen etwa 4 mal so groß wie in den nichtadaptierten.

Dieser positive Effekt ließ sich nach 10 und 14 Wochen jedoch nicht bestätigen. Nach dieser längeren Kultivierungszeit nahm die Transformationsleistung der adaptierten relativ zu den nichtadaptierten Kulturen deutlich ab.

In den nichtadaptierten Kulturen wurden zu diesen Zeitpunkten die höchsten Produktmengen für diesen Pilz im Verlauf der gesamten Langzeitkultivierung erreicht.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes nach 6 Wochen Adaptionszeit (Abb. 2-78) zeigte, daß der Haupteffekt der Adaption auf die erhöhte Bildung von Myrtenol zurückging, während der Effekt auf die Verbenol- und Verbenonbildung geringer war. Der Grund für die im Vergleich zu den bisher beschriebenen Versuchen erhöhte Bildung von Myrtenol bei *P. sapidus* konnte nicht eindeutig geklärt werden. Auffällig bei den Kulturen war jedoch, daß neben schnallenlosem Myzel eine Abscheidung von Sporen ins Medium feststellbar war, während dieser Pilz normalerweise Schnallenmyzel bildet und keine Sporenbildung zeigt. Dies trat im Verlauf der gesamten Arbeit nur bei diesem Versuch auf.



G. applanatum: Dieser Pilz zeigte nur nach 6-wöchiger Adaptionzeit einen deutlichen Unterschied zwischen den adaptierten und nichtadaptierten Kulturen (Abb. 2-79): In der nichtadaptierten Kultur fand kaum noch Produktbildung statt (Produktsumme  $<1 \text{ mg L}^{-1}$ ), während in der adaptierten Kultur fast  $12 \text{ mg L}^{-1}$  gebildet wurden. Abb. 2-80 verdeutlicht, daß der Unterschied zwischen den Kulturen auf die sehr viel stärkere Bildung von Verbenon in der adaptierten Kultur zurückzuführen war.

Auch bei diesem Pilz ließ sich ein positiver Effekt der Adaption nach 10 und 14 Wochen nicht bestätigen.

T. hirsuta: Bezüglich der Adaption war hier ein indifferentes Verhalten festzustellen (Abb. 2-81). Nach 6 und 10 Wochen war zwar die Produktbildung in den adaptierten Kulturen deutlich erhöht, nach 14 Wochen war ein solcher Effekt jedoch nicht mehr vorhanden.

Betrachtet man dazu den zeitlichen Verlauf nach 6 Wochen Adaption (Abb. 2-82), so wird deutlich, daß in den adaptierten Kulturen die Produktbildungsrate von Myrtenol und Verbenon in den ersten beiden Transformationstagen etwas erhöht war. Die Produktmaxima unterschieden sich jedoch kaum und die Produktgehalte glichen sich nach drei Tagen weitgehend an.

M. giganteus: Nach 6 Wochen führte die Adaption zu einer um etwa Faktor 2 verbesserten Produktbildung, während nach 10 und 14 Wochen die Produktbildung in den nichtadaptierten Kulturen besser war (Abb. 2-83).

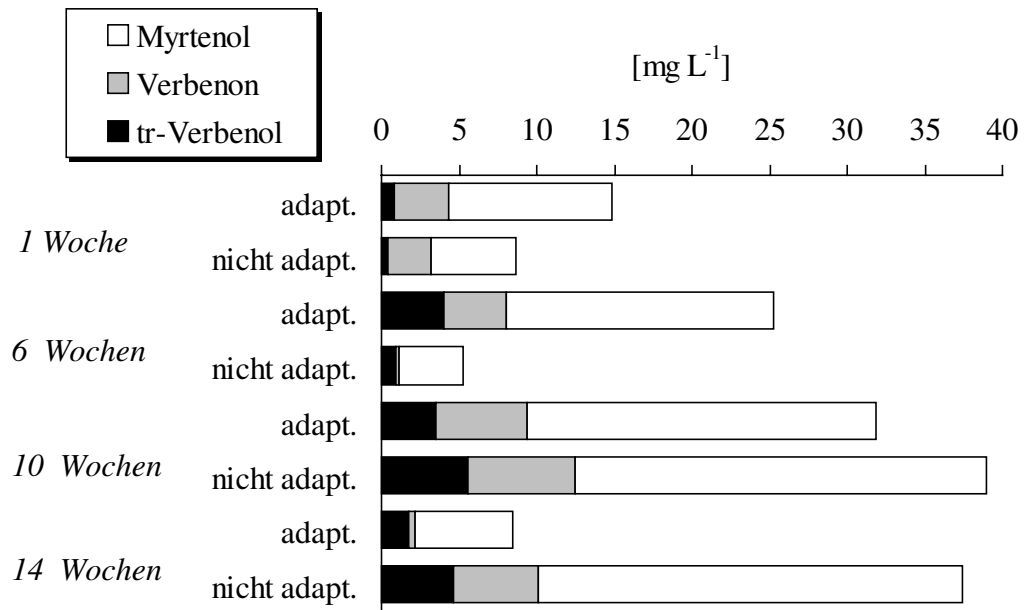
Die Verdoppelung der Produktbildungsrate und der Produktmaxima von Myrtenol und Verbenon in den 6 Wochen adaptierten Kulturen wurde auch bei der Untersuchung des Zeitverlaufes deutlich (Abb. 2-84).

G. frondosa (Abb. 2-85) bildete insgesamt nur geringe Produktmengen, nach 1 und 6 Wochen war ein positiver Effekt der Adaption festzustellen, der nach 10 Wochen deutlicher wurde. Nach 14 Wochen trat jedoch der gegenteilige Effekt auf, d.h. die nichtadaptierten Kulturen waren aktiver.

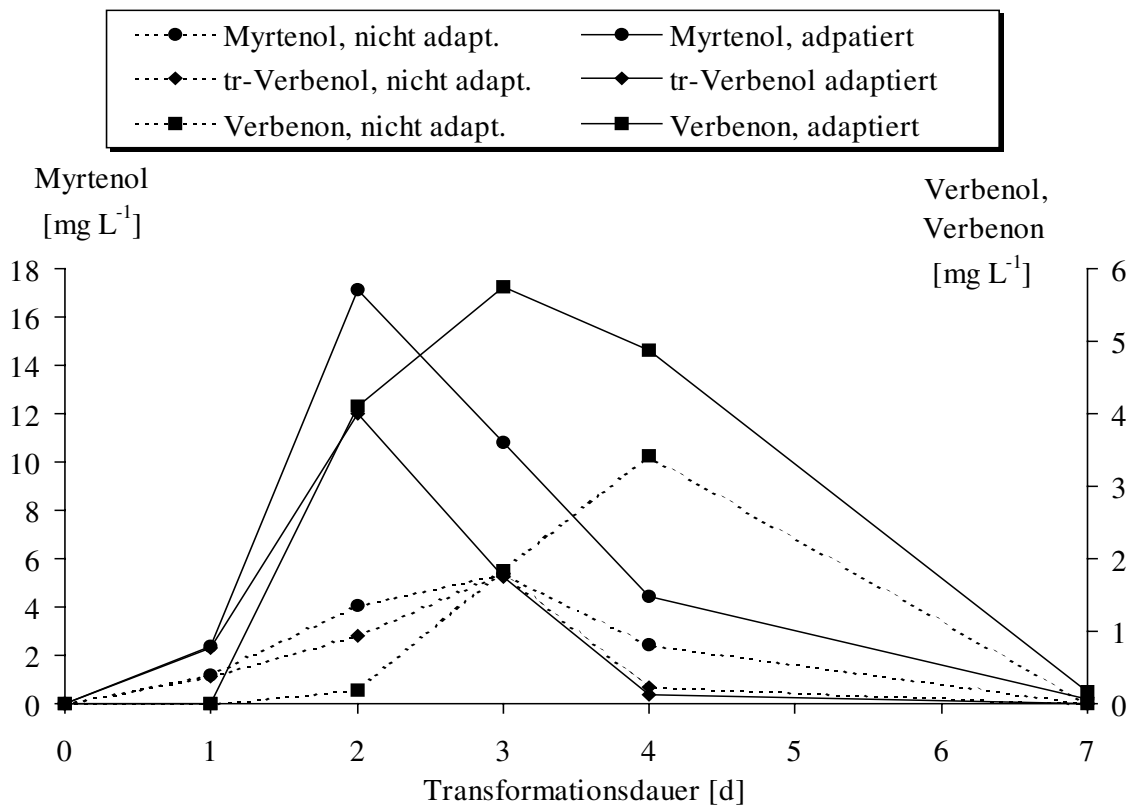
Insgesamt läßt sich festhalten, daß besonders nach 6 Wochen Adaptionzeit positive Effekte auf die  $\alpha$ -Pinen-Transformation festzustellen waren, die sich nach 10 Wochen Submerskultivierung nur für *G. frondosa* und *T. hirsuta* bestätigten. Nach 14 Wochen Adaption wirkte sich auch bei diesen beiden Pilzen die Langzeitadaption negativ auf die gebildete Produktmenge aus.

Es wird deutlich, daß eine langzeitige Kultivierung unter Einfluß von  $\alpha$ -Pinen schwierig ist, da möglicherweise aufgrund der Dauerbelastung der Vorkulturen ein Schädigung der Pilze auftritt und daher bei längerer Kultivierung die Produktbildung in den nichtadaptierten Kulturen besser ist als in den adaptierten.

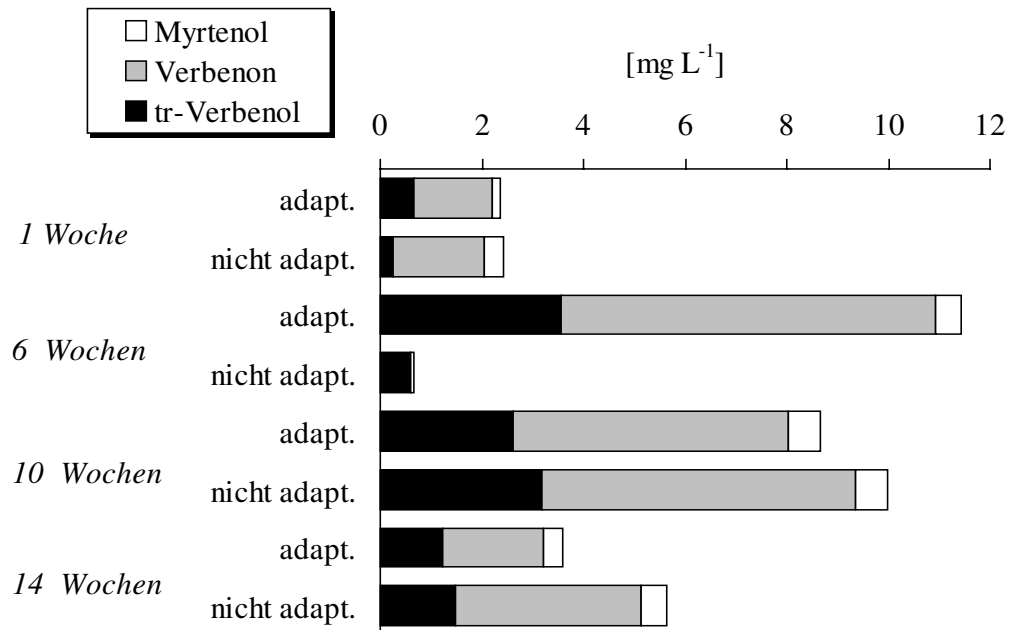
Zudem ist ein direkter Vergleich von adaptierten und nichtadaptierten Vorkulturen, auch bei paralleler Führung von jeweils 2 Kulturen, schwierig, da sie sich unterschiedlich entwickeln, d.h. vor allem unterschiedlich starkes Wachstum zeigen, wenn die einen Vorkulturen in Gegenwart eines wachstumshemmenden Monoterpens kultiviert werden, während die anderen normal wachsen können. Durch Überimpfen in experimentelle Kulturen, die vor Beginn der Biotransformation nicht mehr mit Substrat belastet wurden, konnte dieser Unterschied so weit wie möglich aufgehoben werden, vollständig äquivalente Kulturen konnten auf diese Weise jedoch nicht erhalten werden.



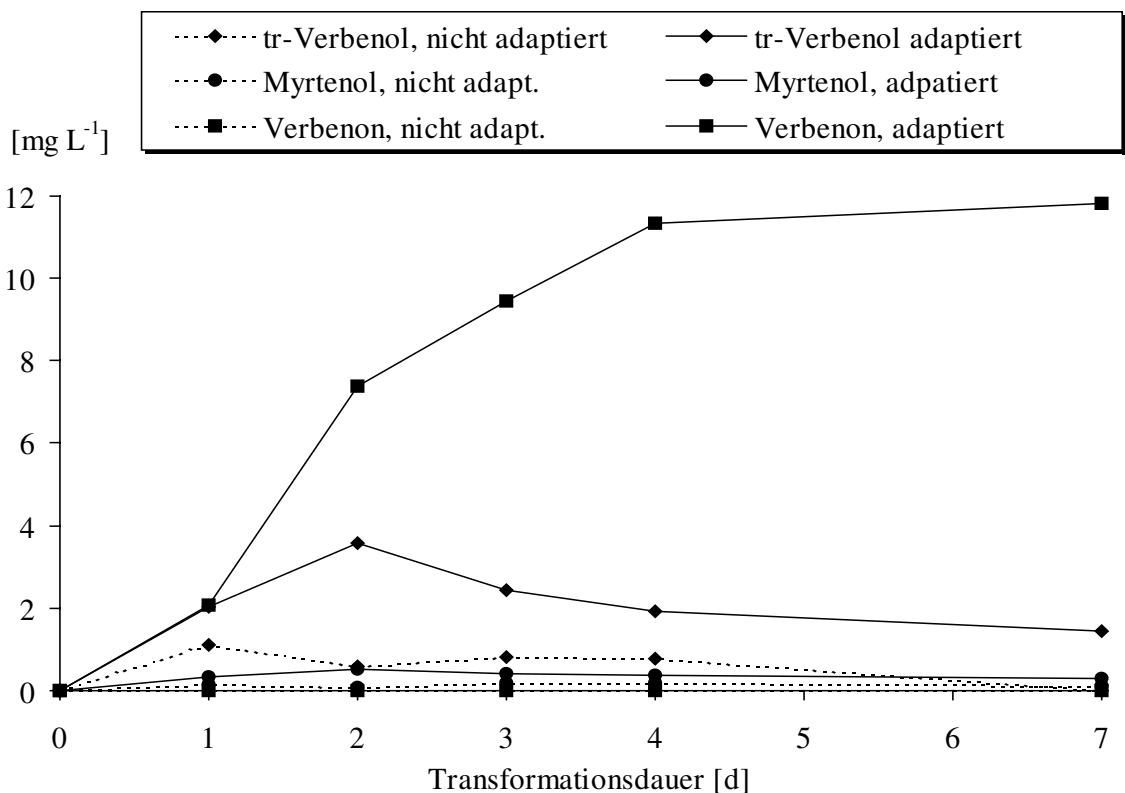
**Abb. 2-77:** Vergleich der Transformationsleistung von  $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *P. sapidus* bei Langzeit-Submerskultivierung (nach 48 h Transformationsdauer)



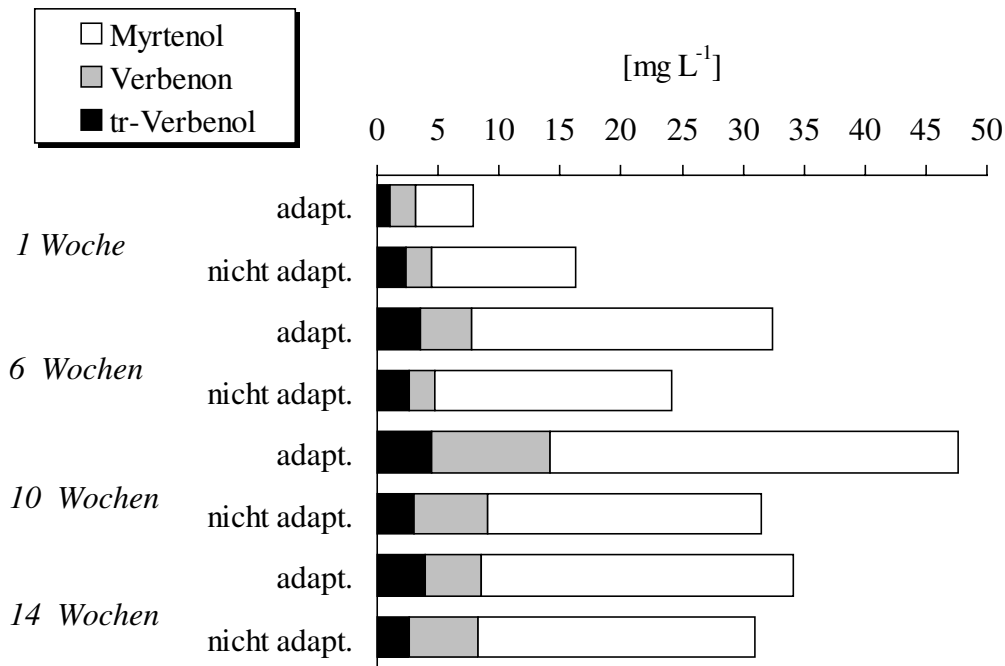
**Abb. 2-78:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *Pleurotus sapidus* nach 6 Wochen Adaptionszeit



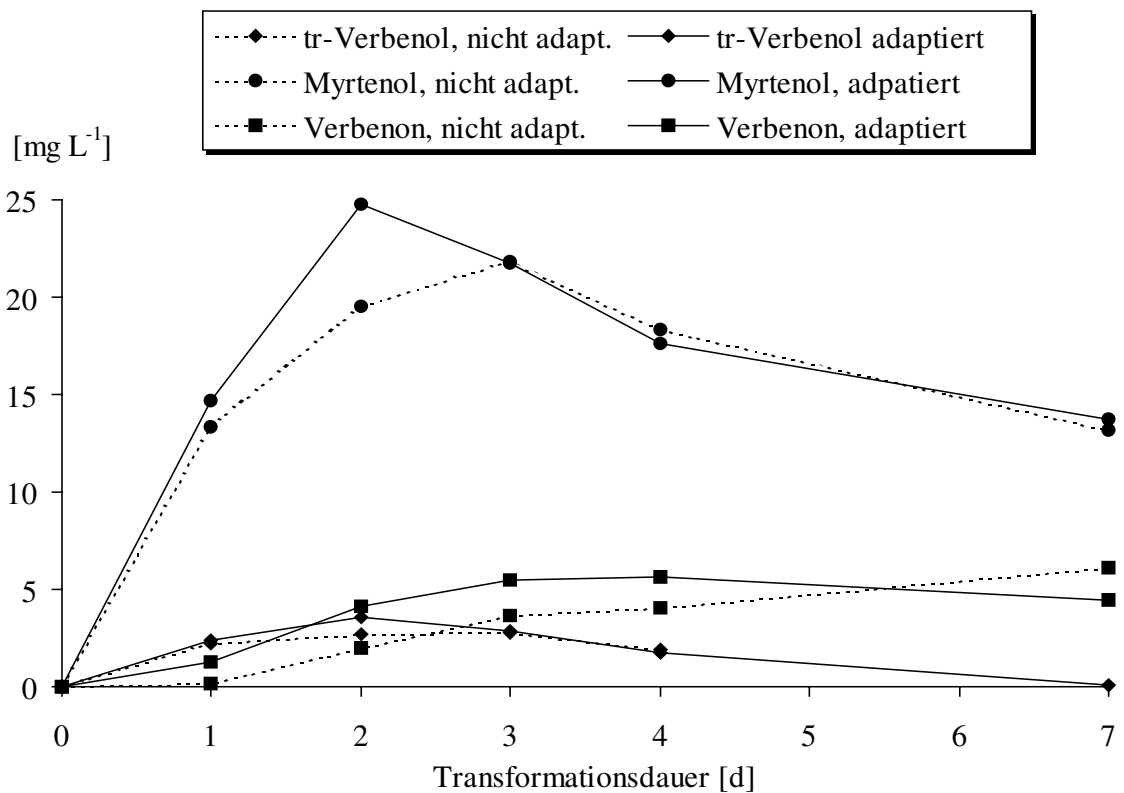
**Abb. 2-79:** Vergleich der Biotransformationsleistung von  $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *G. applanatum* bei Langzeit-Submerskultivierung (nach 48 h Transformationsdauer)



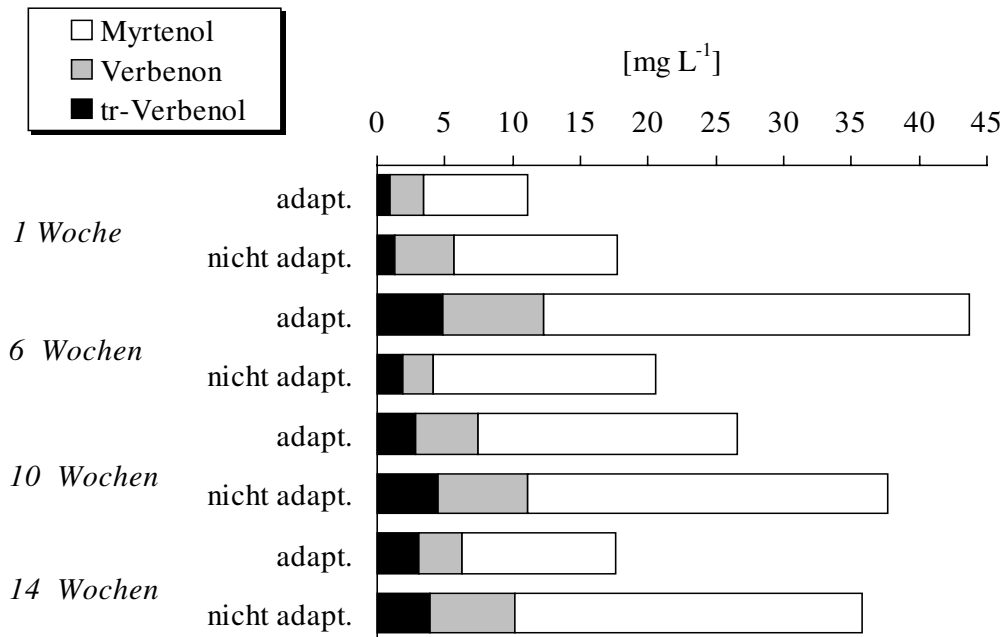
**Abb. 2-80:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *G. applanatum* nach 6 Wochen Adaptionszeit



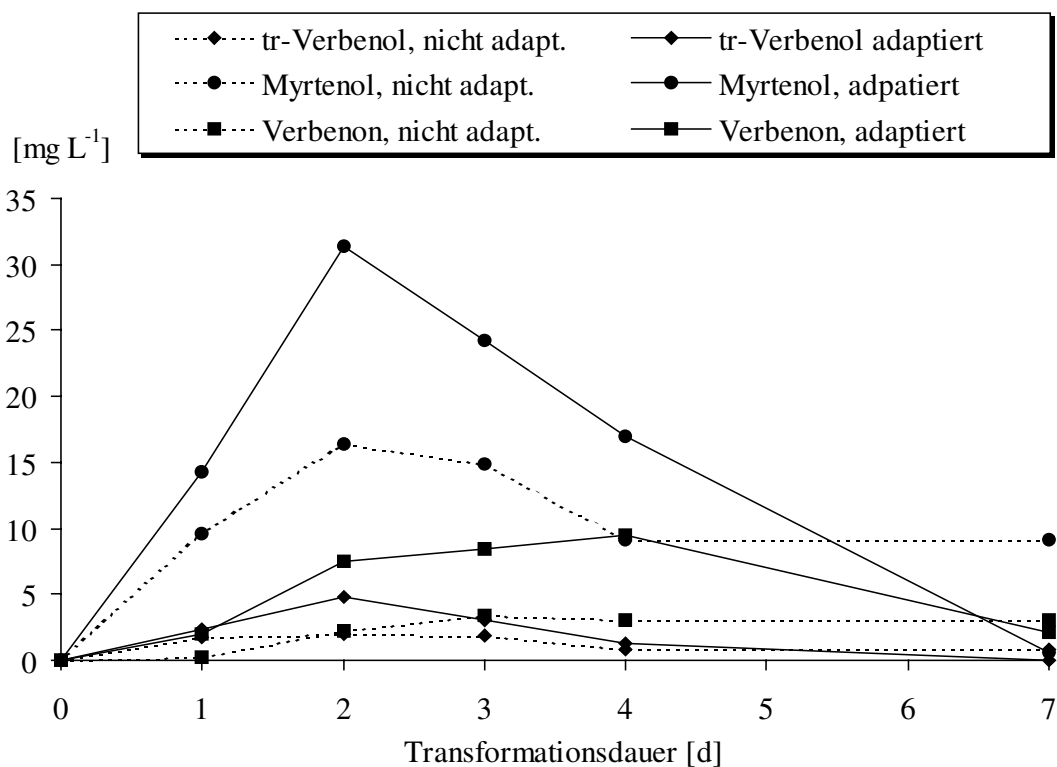
**Abb. 2-81:** Vergleich der Biotransformationsleistung von  $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *T. hirsuta* bei Langzeit-Submerskultivierung (nach 48 h Transformationsdauer)



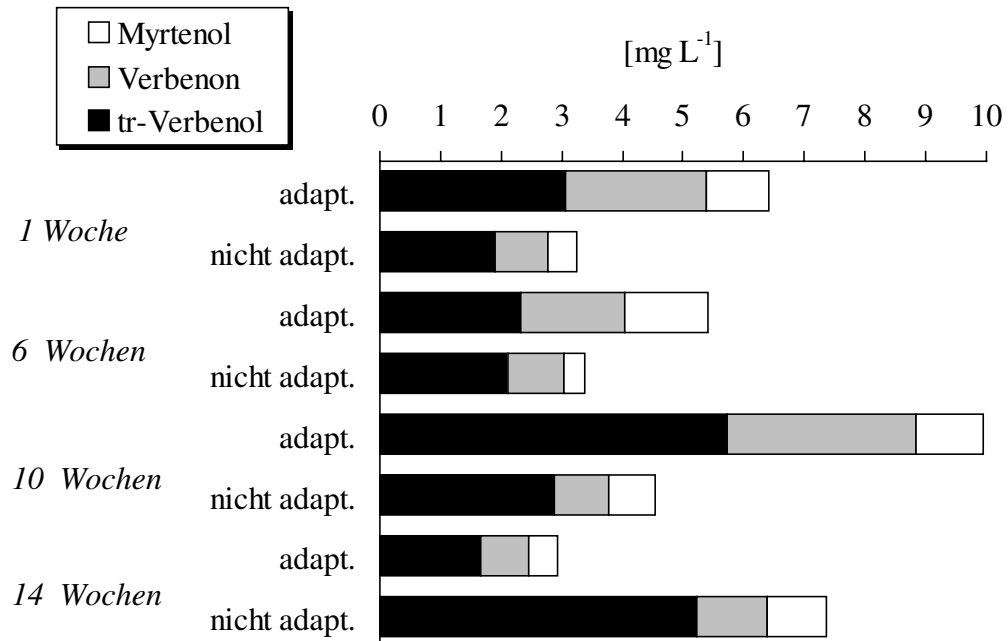
**Abb. 2-82:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *T. hirsuta* nach 6 Wochen Adaptionszeit



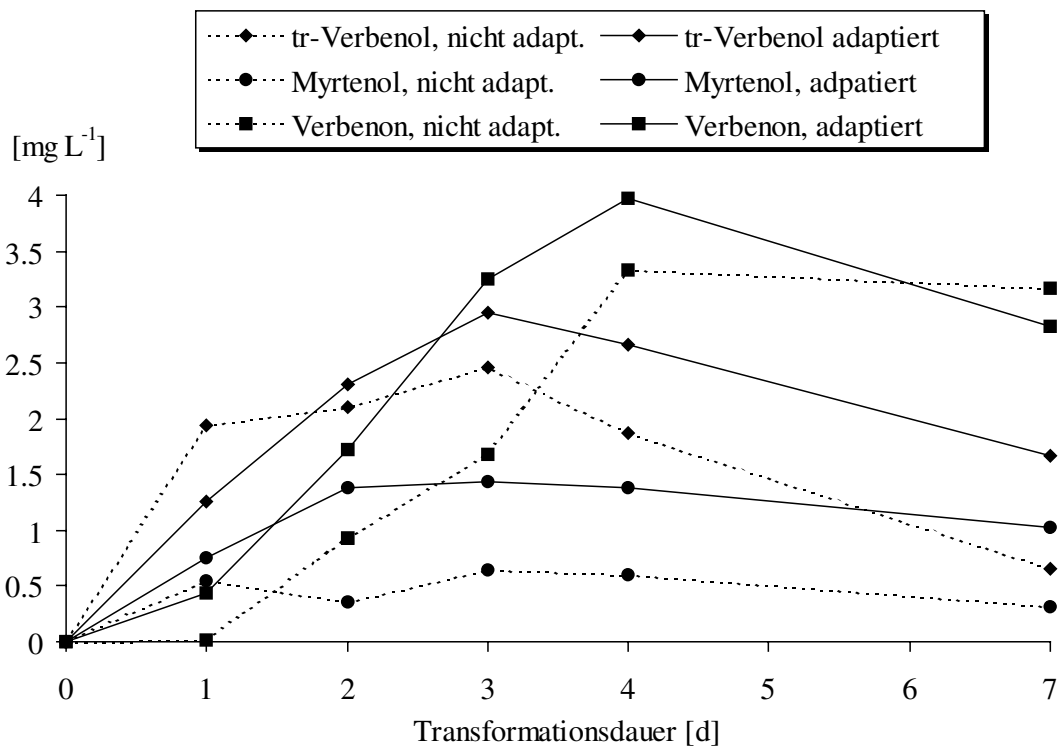
**Abb. 2-83:** Vergleich der Biotransformationsleistung von  $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *M. giganteus* bei Langzeit-Submerskultivierung (nach 48 h Transformationsdauer)



**Abb. 2-84:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *M. giganteus* nach 6 Wochen Adaptionzeit



**Abb. 2-85:** Vergleich der Biotransformationsleistung von  $\alpha$ -Pinen-adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *G. frondosa* bei Langzeit-Submerskultivierung (nach 48 h Transformationsdauer)



**Abb. 2-86:** Zeitverlauf der  $\alpha$ -Pinen-Biotransformation in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen von *G. frondosa* nach 6 Wochen Adaptionszeit

### 2.1.10.2 Adaptionverhalten von *P. sapidus* in Gegenwart von Limonen

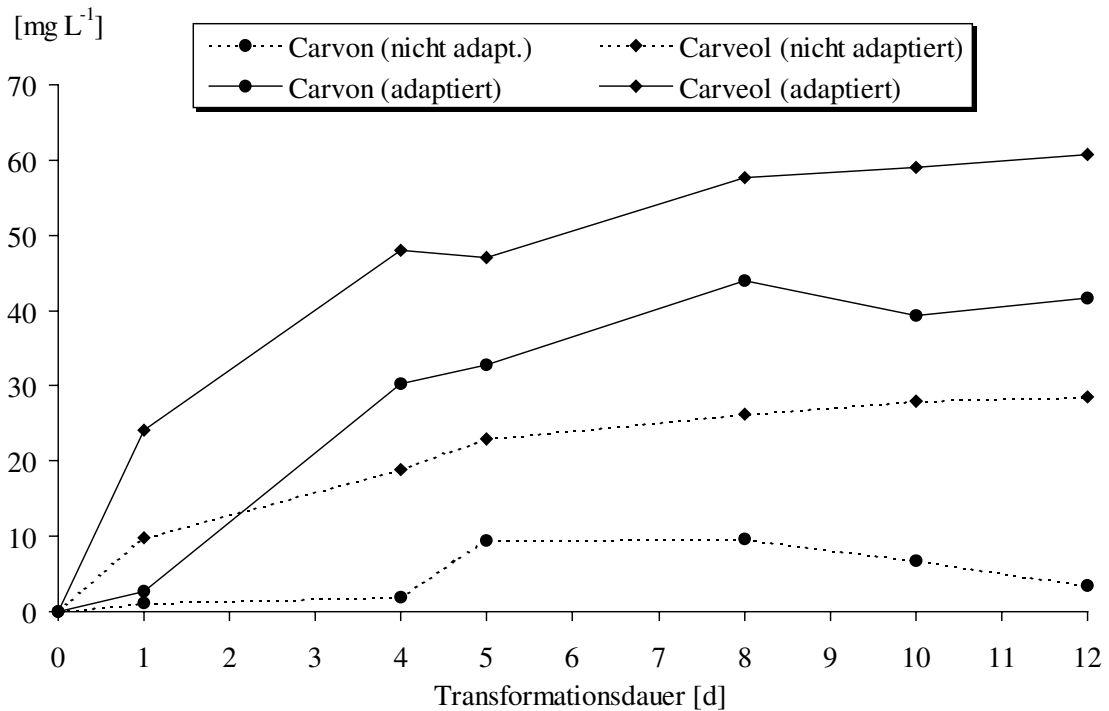
Limonen war aufgrund seiner geringeren Flüchtigkeit und der besseren chemischen Beständigkeit in wäßrigen Lösungen als Substrat einfacher zu handhaben als die bicyclischen Pinene und es erwies sich bei der Transformation durch *P. sapidus* als gutes Transformationssubstrat (vgl. Abb. 2-56). Deshalb wurden mit diesem Substrat ebenfalls Adaptionversuche durchgeführt, wobei die Adaption auf die *Vorkulturen 2*, die im halbkomplexen SNLH-Medium kultiviert wurden, beschränkt war. In den experimentellen Kulturen wurde vor Transformationsbeginn keine Adaption durchgeführt. Durch diese Kulturführung wurden vergleichbare Wachstumsergebnisse in den adaptierten und nichtadaptierten Kulturen erhalten.

Abb. 2-87 zeigt, daß nach einer Woche Adaptionszeit sehr deutliche Unterschiede auftraten: Beim Carveol lag über den gesamten Transformationsverlauf die Konzentration in den adaptierten Kulturen um mehr als das Doppelte über der Konzentration in den nichtadaptierten Kulturen. Beim Carvon wiesen die adaptierten Kulturen sogar eine 3-4 mal höhere Konzentration auf. Um sicherzustellen, daß die Unterschiede nicht durch aus den Vorkulturen in die experimentellen Kulturen gelangte Produkte bedingt waren, wurden die adaptierten Kulturen vor Transformationsbeginn (d.h. vor Substratzugabe) auf ihren Produktgehalt hin untersucht. Weder Carveol noch Carvon waren nachweisbar.

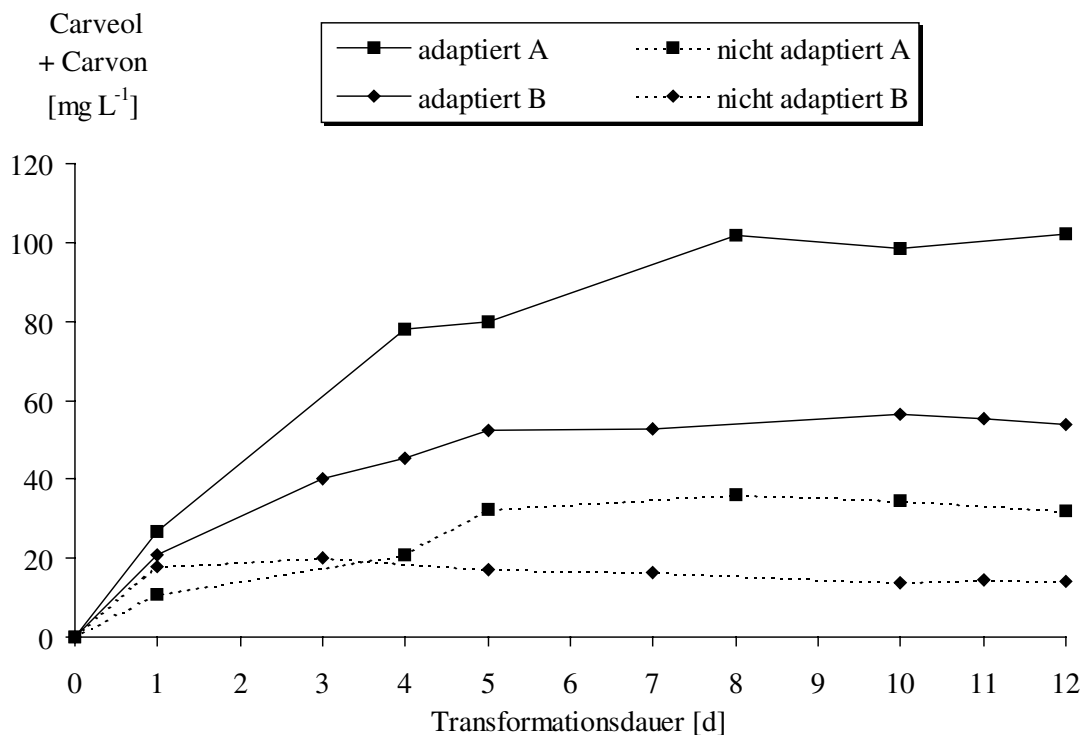
In weiteren Adaptionversuchen wurden zwei unabhängig voneinander kultivierte Versuchsreihen A und B (aus getrennt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten angesetzten *Vorkulturen 1* und 2) durchgeführt. Abb. 2-88 ist zu entnehmen, daß die Produktsumme (Carveol + Carvon) sowohl bei Reihe A als auch bei Reihe B in den adaptierten Kulturen ca. dreimal so groß war wie in den nichtadaptierten Kulturen. Die absolute Konzentration der Produkte war jedoch bei Reihe B in den adaptierten wie in den nichtadaptierten Kulturen nur etwa halb so groß wie bei Reihe A.

Die Reproduzierbarkeit der Adaption konnte somit bestätigt werden – sie führte etwa zu einer Verdreifachung der Transformationsaktivität. Die Grundaktivität der Vorkulturen schien jedoch zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst zu werden, die durch eine Adaption nicht nivelliert werden konnten.



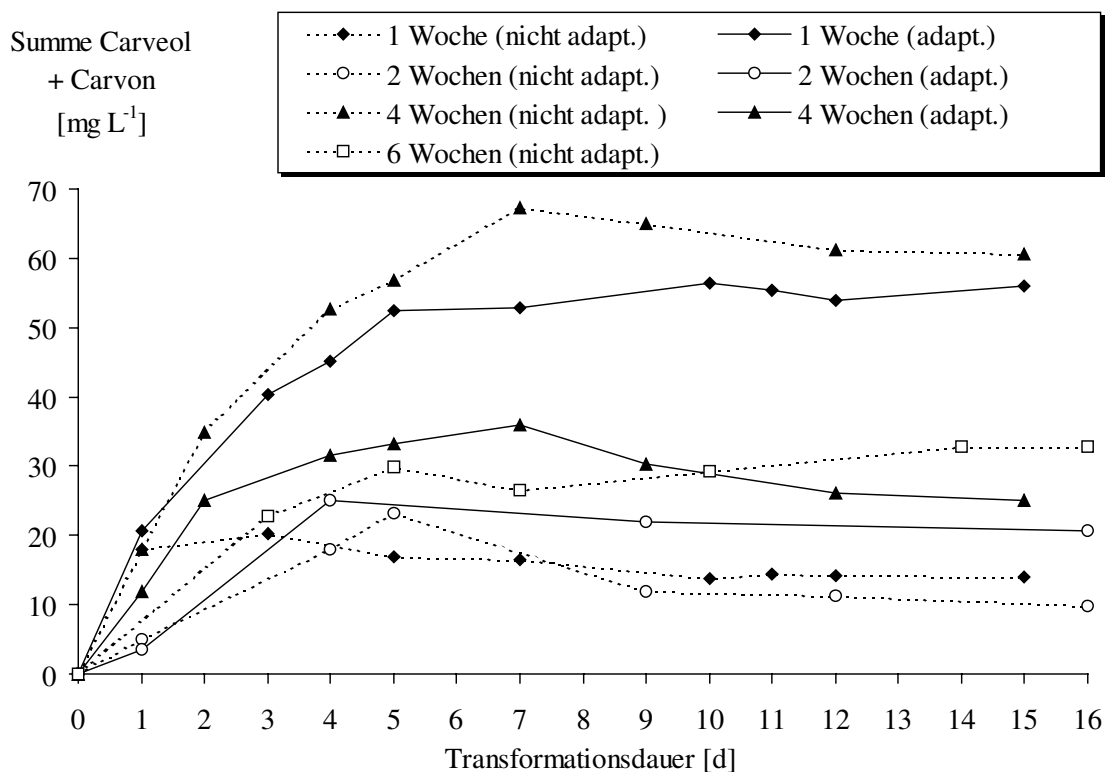


**Abb. 2-87:** Limonenadaptation von *P. sapidus*: Limonentransformation durch adaptierte und nichtadaptierte Kulturen (1 Woche Adaptionszeit)



**Abb. 2-88:** Limonenadaptation von *P. sapidus*: Vergleich zweier unabhängig geführter Versuchsreihen A und B (1 Woche Adaptionszeit)

Ähnlich wie bei den Langzeitversuchen mit  $\alpha$ -Pinen, wurde auch für Limonen das Langzeitverhalten adaptierter und nichtadaptierter Kulturen von *P. sapidus* untersucht. Abb. 2-89 zeigt ein ähnlich komplexes Bild wie es beim  $\alpha$ -Pinen erhalten wurde. Nach einwöchiger Adaption traten o.g. deutliche Effekte auf. Nach 2 Wochen lagen die Produktmengen in den adaptierten nur geringfügig über denen der nichtadaptierten Kulturen. Nach 4 Wochen kehrte sich das Bild um und die Produktbildung war in den nichtadaptierten Kulturen mehr als doppelt so hoch wie in den adaptierten. Nach 6 Wochen Submerskultivierung wuchsen die adaptierten experimentellen Kulturen nicht mehr an, wahrscheinlich aufgrund einer Schädigung durch die permanente Limonenpräsenz. Die nichtadaptierten Kulturen zeigten noch gutes Wachstum, die Produktbildung war jedoch mit max.  $30 \text{ mg L}^{-1}$  wieder sehr viel niedriger als nach 4 Wochen. Eine einwöchige Adaptionszeit der Vorkulturen 2 erschien bei diesem Pilz für die Limonentransformation daher sinnvoll, während längere Adaptionszeiten lediglich schlechtere Transformationsleistungen bewirkten.



**Abb. 2-89:** Limonenadaptation von *P. sapidus*: Vergleich von adaptierten und nichtadaptierten Kulturen nach 1, 2, 4 und 6 Wochen Kulturzeit (6 Wochen: adaptierte Kulturen wuchsen nicht mehr an)

**Teilzusammenfassung 2.1.10:**

- Die Langzeitkultivierung der 5 Basidiomyceten *P. sapidus*, *G. applanatum*, *T. hirsuta*, *M. giganteus* und *G. frondosa* in Gegenwart geringer Mengen  $\alpha$ -Pinen ergab ein indifferentes Adaptionsverhalten. Während eine 6-wöchige Adaption für alle Stämme eine Verbesserung der Transformationsleistung mit sich brachte, ließ sich der Effekt bei längerer Kultivierung nicht bestätigen. Die längere Submerskultivierung brachte tendenziell eher für die nichtadaptierten Kulturen verbesserte Transformationsergebnisse.
- Bei *P. sapidus* führte die einwöchige Limonenadaption zu einer Verdreifachung der Produktmengen. Dabei erwies sich die Adaption in den *Vorkulturen 2* (halbkomplexes Hefeextrakt-Medium = SNLH) gegenüber der für die  $\alpha$ -Pinen-Versuche durchgeführten Adaption in den *Vorkulturen 1* (synthetisches Medium = SNLB) als vorteilhaft.
- Der relative Effekt der einwöchigen Adaption erwies sich als reproduzierbar, die absolute Produktkonzentration unabhängig voneinander durchgeführter Kultivierungen unterschied sich jedoch deutlich.
- Eine Verlängerung der Adaptionszeit führte auch hier nicht zu einer Verbesserung. Vielmehr trat dabei eine Schädigung der Kulturen auf, und die nichtadaptierten Kulturen zeigten, wie auch schon beim  $\alpha$ -Pinen, eine bessere Produktbildung.

### 2.1.11 Möglichkeiten zur Produktgewinnung und Substratzuführung mit Hohlfasermembranmodulen

Hydrophobe Hohlfasermembranmodule sind aufgrund ihrer großen Membranoberfläche geeignet, einen schnellen Stoffaustausch zwischen zwei Phasen (flüssig/flüssig, gasförmig/flüssig) herbeizuführen. Auch organisch-wässrige Flüssig/flüssig-Extraktionen können auf diese Weise durchgeführt werden.

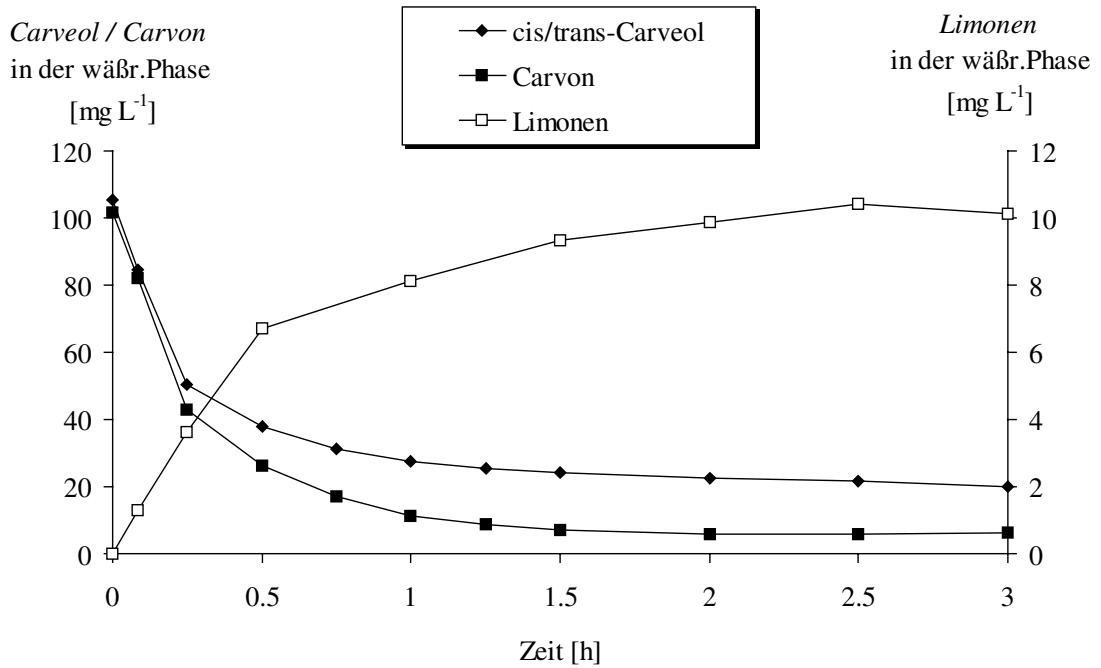
Als Modellsystem wurde ein 2L-Bioreaktor mit einer Anfangskonzentration von je  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Carveol und Carvon untersucht, dessen wässrige Phase durch den Extrakapillarraum eines Polypropylen-Hohlfasermoduls im Kreislauf geführt wurde. Durch den Intrakapillarraum wurde Limonen als Extraktionsmittel ebenfalls im Kreislauf geführt. Vor Eintritt in das Modul wurde das Limonen zur Adsorption der oxyfunktionalisierten Terpene durch eine Kieselgelsäule gepumpt.

Wie Abb. 2-90 zeigt, war eine Extraktion der eingesetzten Produkte auf diese Weise möglich: Nach 1,5 h waren mehr als 90% des Carvons und etwa 80% des Carveols extrahiert. Die Limonensättigungskonzentration lag in diesem System bei  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

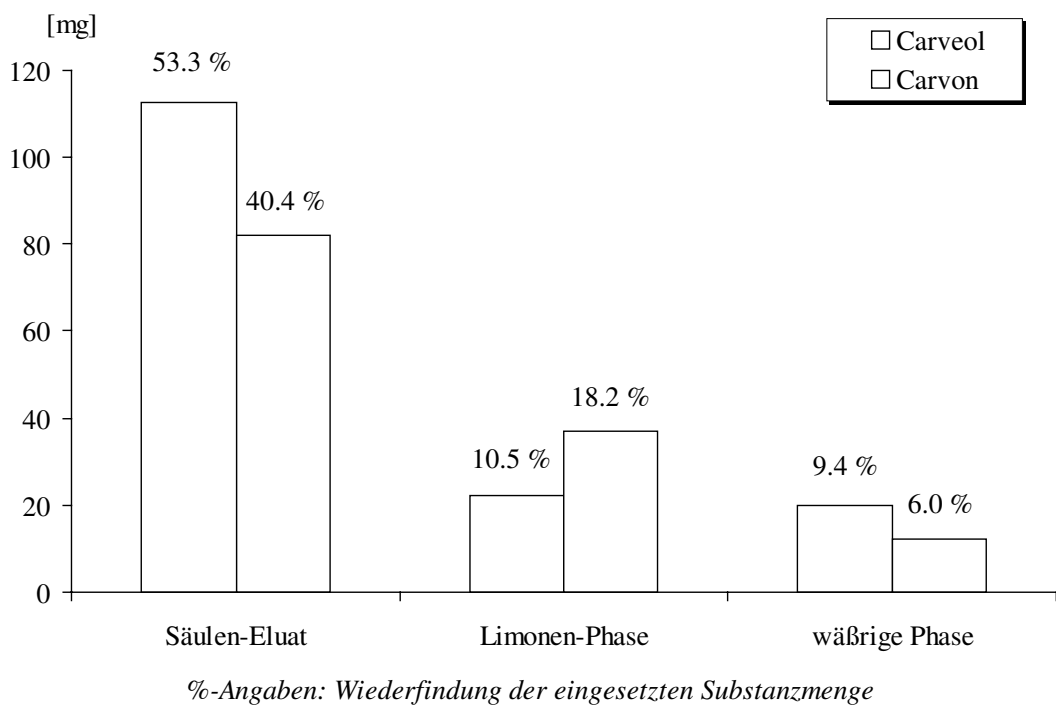
Die Adsorption der oxyfunktionalisierten Terpene (Abb. 2-91) führte bei Carveol zu einer Wiederfindung im Säuleneluat von 53,3 %, während die Limonen- und die Wasserphase jeweils ca. 10% der eingesetzten Carveolmenge enthielten; die Gesamtwiederfindung betrug hier 73,2%.

Das Carvon wurde etwas schlechter adsorbiert und daher nur zu 40,4 % im Säuleneluat wiedergefunden. Ein entsprechend größerer Anteil von 18,2 % blieb in der Limonenphase gelöst. Mit dem in der wässrigen Phase verbleibenden Carvon betrug die Gesamtwiederfindung 64,6%.

26,8 bzw. 35,4% der eingesetzten Carveol- bzw. Carvonmengen gingen bei dieser Art der Produktgewinnung verloren. Ursache könnten einerseits Verluste durch das verwendete Schlauch- und Membranmaterial sein, aber auch eine unvollständige Desorption vom eingesetzten Kieselgel wäre denkbar.



**Abb. 2-90:** Zeitverlauf der Carveol/Carvon-Extraktion und Limonensättigung mittels Hohlfasermodul aus einem 2L-Reaktor



**Abb. 2-91:** Wiederfindung des Substrates und der Produkte im Säuleneluat, der Limonenphase und der wäßrigen Phase

## 2.2 Biotransformation des Monoterpenalkohols Citronellol durch Pilze

Die Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen hatten nur zu geringen Umsatzraten geführt. Daher sollte durch den Einsatz des Monoterpenalkohols Citronellol untersucht werden, ob dieses weniger lipophile, einfach oxyfunktionalisierte Substrat zu besseren Ergebnissen führt. Da die Transformationsfähigkeit von Basidiomyceten für dieses Substrat bis dahin noch nicht untersucht worden war, mußte zunächst eine Auswahl geeigneter Stämme getroffen werden.

### 2.2.1 Screening der Citronellol-Transformationsleistung von 21 Pilzstämmen

#### 2.2.1.1 Auswahl der Stämme und Screening

Um aus der Vielzahl der möglichen kommerziell erhältlichen Pilzstämmen eine Vorauswahl zu treffen, wurden 21 Stämme ausgewählt (s. Tab. 2-9), die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllten:

- a) *Stamm* wurde von terpenhaltigen Substraten – z.B. Nadelhölzern – isoliert,
- b) *Stamm* ist zur Terpenbiosynthese fähig,
- c) Eine Pilz-*Gattung* ist aufgrund bisher durchgeführter Terpentransformationen für ihre Transformationsleistungen bekannt,
- d) Eine Pilz-*Gattung* ist aufgrund bisheriger Untersuchungen für ihre Fähigkeit zur Metabolisierung von Xenobiotika bekannt.

Von terpenhaltigen Substraten isolierte Basidiomyceten sind in größerer Zahl bei den kommerziellen Kultursammlungen erhältlich. 5 Stämme (Nr. 7, 8, 11, 12 und 13) wurden nach diesem Kriterium ausgewählt.

Von Basidiomyceten, die zur Terpenbiosynthese fähig sind [23, 24], wurden 2 Stämme der Gattung *Cyathus* und 4 Stämme aus verschiedenen Gattungen (Nr. 1, 5, 9, 10) untersucht.

Die Gattung *Pleurotus* war aufgrund bisher bekannter Terpentransformationsleistungen [10, 11] und bekannter Fähigkeiten zur Metabolisierung von Xenobiotika [25] interessant. Aus dieser Gattung wurden 8 Stämme (Nr. 15-21) in das Screening aufgenommen. Neben 19 Basidiomycetenstämmen wurden die Deuteromycetenstämme *Corynespora cassiicola* (Nr. 2) und *Diplodia gossypina* (Nr. 6) als Referenzorganismen für das

Screening ausgewählt, da ihre Fähigkeit zur effektiven Transformation von Terpenen bekannt war [26-29].

Von den so ausgewählten Pilzen wurden nach dem üblichen Verfahren Vorkulturen und experimentelle Kulturen in SNLH-Medium inokuliert.

Zu den 2,5 Tage alten experimentellen Kulturen wurden 50 µl (+/-)-Citronellol (=0,27 mmol) je 100 mL Kulturvolumen gegeben. Nach 2, 4 und 7 Transformationstagen wurden Proben genommen und als Sammelproben extraktiv aufgearbeitet, um das Produktspektrum über einen längeren Zeitraum zu erfassen.

**Tab. 2-9:** Pilzstämme für das Citronellol-Screening

| Nr. | Stamm-Name                    | Kultur-samml. | Stamm-Nr. | Anmerkung                |
|-----|-------------------------------|---------------|-----------|--------------------------|
| 1   | <i>Boletus luridus</i>        | CBS           | 115.42    | Monoterpensynthese       |
| 2   | <i>Corynespora cassiicola</i> | CBS           | 624.75    | Terpentransformation     |
| 3   | <i>Cyathus africanus</i>      | DSM           | 1593      | Monoterpensynthese       |
| 4   | <i>Cyathus striatus</i>       | DSM           | 1652      | Terpensynthese           |
| 5   | <i>Cystoderma carcharias</i>  | CBS           | 157.47    | Terpensynthese           |
| 6   | <i>Diplodia gossypina</i>     | ATCC          | 10936     | Terpentransformation     |
| 7   | <i>Fomitopsis pinicola</i>    | DSM           | 4957      | von Fichtenholz isoliert |
| 8   | <i>Ischnoderma benzoinum</i>  | CBS           | 311.29    | von Nadelholz isoliert   |
| 9   | <i>Lepista nuda</i>           | DSM           | 8620      | Monoterpensynthese       |
| 10  | <i>Paxillus involutus</i>     | CBS           | 477.89    | Monoterpensynthese       |
| 11  | <i>Phaeolus schweinitzii</i>  | DSM           | 5136      | von Kiefernholz isoliert |
| 12  | <i>Phellinus pini</i>         | DSM           | 5238      | von Kiefernholz isoliert |
| 13  | <i>Pholiota squarrosa</i>     | DSM           | 5127      | von Nadelholz isoliert   |
| 14  | <i>Pleurotus columbinus</i>   | DSM           | 3371      | Gattung                  |
| 15  | <i>Pleurotus cornucopiae</i>  | DSM           | 8298      | Gattung                  |
|     |                               | (Hübsch)      | (P 125-7) |                          |
| 16  | <i>Pleurotus flabellatus</i>  | DSM           | 8299      | Gattung                  |
|     |                               | (Hübsch)      | (P 127-2) |                          |
| 17  | <i>Pleurotus lampas</i>       | CBS           | 323.49    | Gattung                  |
| 18  | <i>Pleurotus ostreatus</i>    | DSM           | 1020      | Gattung                  |
| 19  | <i>Pleurotus pulmonarius</i>  | DSM           | 9558      | Gattung                  |
| 20  | <i>Pleurotus sajor-caju</i>   | DSM           | 5339      | Gattung                  |
|     |                               | (Hübsch)      | (P 225-1) |                          |
| 21  | <i>Pleurotus sapidus</i>      | DSM           | 8266      | Gattung                  |
|     |                               | (Hübsch)      | (P 226-1) |                          |

### 2.2.1.2 Identifizierung der Transformationsprodukte

Die Identifizierung der Produkte, deren genaue Durchführung in den folgenden Abschnitten dargestellt werden soll, ist Tab. 2-10 zu entnehmen.

Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich mit Referenzmassenspektren (Kennzeichnung „MS“ in Tab. 2-10), über den Vergleich mit Literatur-Kovats-Indices (Kennzeichnung „KI“), über den Vergleich mit Massenspektren und Retentionszeiten von Standards (Kennzeichnung „Std.“) oder über die NMR-Spektren von synthetisierten Referenzsubstanzen (Kennzeichnung „NMR“).

Die Doppelbindung im Citronellol (s. Abb. 2-90) wird zum Epoxid (**4a/b**) oxidiert. Das 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) kann daraus durch Hydratisierung entstehen.

Die Oxidation der primären OH-Gruppe des Citronellols führt zum Citronellal (**2**), durch Hydrierung der Doppelbindung entsteht 3,7-Dimethyl-1-octanol (**3**).

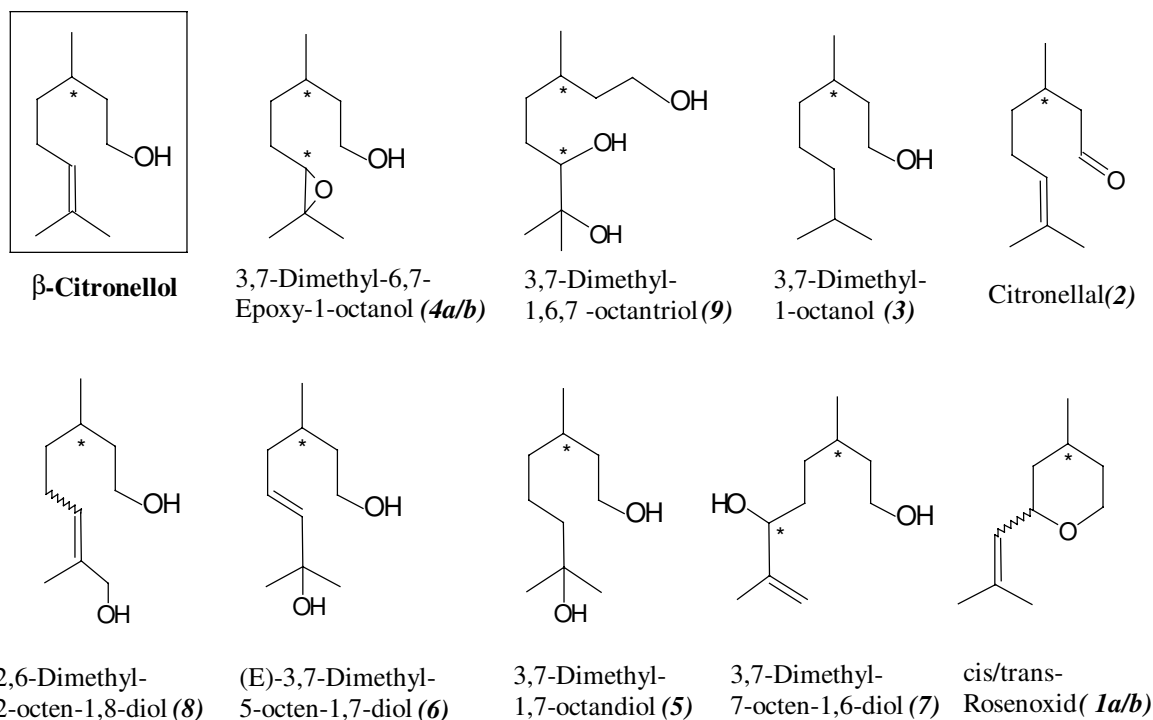
Daneben treten Hydroxylierungen in Allylposition auf. Dies kann ohne oder mit Umlagerung der Doppelbindung durch Hydroxylierung einer der terminalen CH<sub>3</sub>-Gruppen geschehen.

2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol (**8**) entsteht ohne Umlagerung. Bei 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) und 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (**7**) ist dagegen die Doppelbindung des Citronellols zum C-5 bzw. zur terminalen Methylgruppe hin umgelagert. (**7**) ist direkter Precursor des Rosenoxids (**1a/b**), das durch Wasserabspaltung daraus entsteht.

3,7-Dimethyl-1,7-octandiol (**5**) kann entweder durch Hydratisierung von Citronellol oder durch Hydrierung der Doppelbindung des ungesättigten Diols (**6**) gebildet werden.

Neben dem bekannten blumigen Duft des Rosenoxids wurden bei den identifizierten allylischen Diolen (**6**), (**7**) und (**8**) sowie dem Epoxid (**4**) citrusartig-blumige Geruchseindrücke festgestellt. Das Triol (**9**) erwies sich aufgrund seiner weitaus größeren Hydrophilie und dadurch geringen Flüchtigkeit als geruchlos. Auch eine Erhöhung der Lipophilie dieser Verbindung (M<sub>r</sub>=190) durch Acetylierung zum Triacetat (M<sub>r</sub>=316) erbrachte keine verbesserten sensorischen Eigenschaften des Produktes.



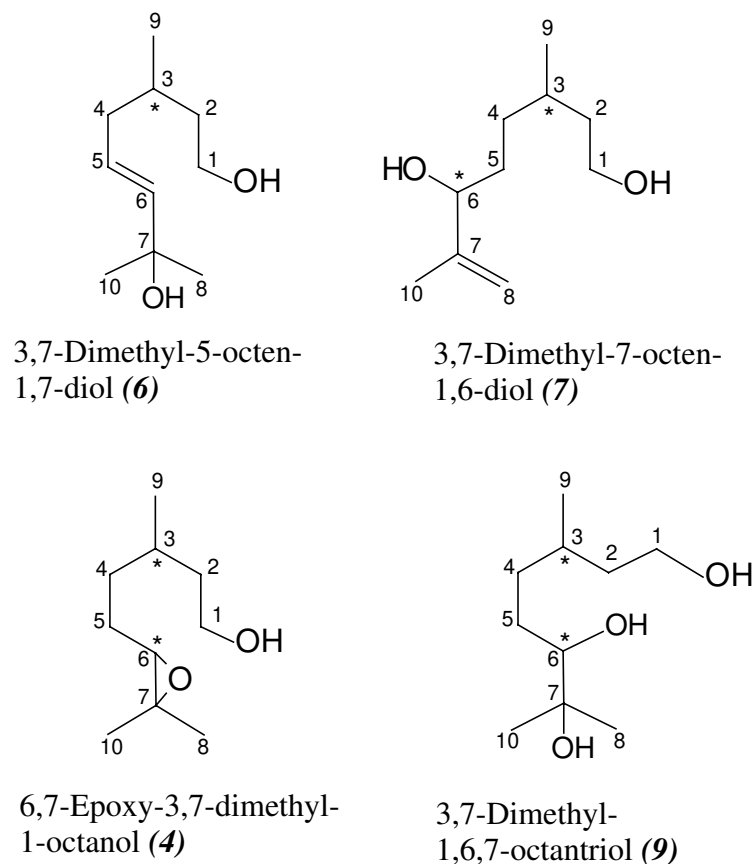
**Abb. 2-92:** Produkte der Citronellol-Transformation durch Pilze**Tab. 2-10:** Identifizierte Produkte der Citronellol-Transformation durch Pilze

| Nr.       | Substanz                                     | Identifizierung | Kovats-Index (CW) | Lit.-Kovats-Index (CW) [15, 16, 17] |
|-----------|--|-----------------|-------------------|-------------------------------------|
| <b>1a</b> | cis-Rosenoxid                                | Std., KI, MS    | 1336              | 1354                                |
| <b>1b</b> | trans-Rosenoxid                              | Std., KI, MS    | 1350              | 1370                                |
| <b>2</b>  | Citronellal                                  | Std., MS, KI    | 1465              | 1465, 1474                          |
| <b>3</b>  | 3,7-Dimethyl-1-octanol                       | Std., MS        | 1660              | -                                   |
| <b>4a</b> | 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (1. Isomer) | NMR             | 2026              | -                                   |
| <b>4b</b> | 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (2. Isomer) | NMR             | 2038              | -                                   |
| <b>5</b>  | 3,7-Dimethyl-octan-1,7-diol                  | MS, KI          | 2200              | 2202                                |
| <b>6</b>  | 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol                | NMR             | 2203              | -                                   |
| <b>7</b>  | 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol                | NMR             | 2346              | -                                   |
| <b>8</b>  | 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol                | MS              | 2496              | -                                   |
| <b>9</b>  | 3,7-Dimethyl-1,6,7-octanetriol               | NMR, MS         | 2800              | -                                   |

2.2.1.2.1  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Von den Diolen (6) und (7), vom Epoxid (4) und vom Triol (9) waren keine Vergleichsmassenspektren verfügbar. Diese Substanzen wurden deshalb aus Citronellol synthetisiert und NMR-spektroskopisch identifiziert.

Durch Vergleich der Massenspektren dieser Produkte mit den Massenspektren der Kulturmedienextrakte wurde dann die endgültige Identifizierung der Transformationsprodukte vorgenommen.



**Abb. 2-93:** Strukturen der mittels NMR identifizierten Substanzen

2.2.1.2.1.1  $^1\text{H}$ -NMR

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren waren vor allem zur Festlegung der Doppelbindungen in den Diolen hilfreich. Die Meßergebnisse sind in Tab. 2-11 dargestellt.

Bei (6) liegt ein Multipllett bei 5,54 ppm vor, daß auf 2 Protonen am doppelt gebundenen C-5 und C-6 hinweist. Die Methylgruppen an C-8 und C-10 sind anhand des

Singulett bei 1,31 ppm und die Methylgruppe an C-9 anhand des Dubletts bei 0,90 ppm zu erkennen.

Bei (7) sind 2 Protonen mit  $\delta=4,92$  und 4,81 ppm vorhanden. In diesem Spektrum sind nur die Methyl-Protonen von 2 Methylgruppen sichtbar (C-9, C-10), so daß die genannten 2 Protonen mit hoher chemischer Verschiebung den cis- und trans-Protonen am  $sp^2$ -hybridisierten C-8 zugeordnet werden können. In diesem Spektrum wurden auch die zwei OH-Protonen des Diols detektiert.

Im Spektrum von (4) sind die Protonen von 3 Methylgruppen sichtbar (C-8, C-9, C-10). Wichtig ist daneben das Proton am C-6, dessen chemische Verschiebung von 2,72 ppm einen Hinweis auf den Epoxidring gibt.

(9) zeigt nur wenige Charakteristika im  $^1\text{H}$ -Spektrum. Die Methylprotonen (C-8, C-9, C-10) sind jedoch ebenso vorhanden wie die 3 OH-Protonen.

**Tab. 2-11:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, interner Standard: TMS)

| <b>(6)</b>                              |      |              | <b>(7)</b>                 |      |              |
|---|------|--------------|----------------------------|------|--------------|
| $\delta$ (ppm)                          |      |              | $\delta$ (ppm)             |      |              |
| <b>1-H<sub>2</sub></b>                  | 3,67 | m            | <b>1-H<sub>2</sub></b>     | 3,63 | m            |
| <b>5-H+6-H</b>                          | 5,54 | m            | <b>6-H</b>                 | 4,00 | m            |
| <b>8-H<sub>3</sub>,10-H<sub>3</sub></b> | 1,31 | s            | <b>8-H<sub>cis</sub></b>   | 4,81 | m            |
|   |      |              | <b>8-H<sub>trans</sub></b> | 4,92 | m            |
| <b>9-H<sub>3</sub></b>                  | 0,90 | d (J=6,2 Hz) | <b>9-H<sub>3</sub></b>     | 0,89 | d (J=6,0 Hz) |
|   |      |              | <b>10-H<sub>3</sub></b>    | 1,71 | s            |
|   |      |              | <b>2 x OH</b>              | 2,93 | br s         |

| <b>(4)</b>                              |      |              | <b>(9)</b>                              |      |              |
|---|------|--------------|---|------|--------------|
| $\delta$ (ppm)                          |      |              | $\delta$ (ppm)                          |      |              |
| <b>1-H<sub>2</sub></b>                  | 3,65 | m            | <b>1-H<sub>2</sub></b>                  | 3,68 | m            |
| <b>2-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub></b> | 1,55 | m            |   |      |              |
| <b>3-H, 4-H<sub>2</sub></b>             | 1,40 | m            |   |      |              |
| <b>6-H</b>                              | 2,72 | t (J=6,0 Hz) | <b>6-H</b>                              | 3,33 | m            |
| <b>8-H<sub>3</sub>,10-H<sub>3</sub></b> | 1,27 | s            | <b>8-H<sub>3</sub>,10-H<sub>3</sub></b> | 1,15 | s            |
|   | 1,31 | s            |   | 1,21 | s            |
| <b>9-H<sub>3</sub></b>                  | 0,92 | d (J=6,1 Hz) | <b>9-H<sub>3</sub></b>                  | 0,92 | d (J=6,0 Hz) |
| <b>1 x OH</b>                           | 2,75 | s            | <b>3 x OH</b>                           | 2,80 | br s         |

### 2.2.1.2.1.2 $^{13}\text{C}$ -NMR

Durch die Auswertung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zusätzlich zu den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren konnten die Strukturen der 4 Verbindungen abgesichert werden (Tab. 2-12).

Bei allen Substanzen ist die OH-Gruppe am C-1 aus dem Citronellol, erkennbar am Signal bei 60,6-60,9 ppm, vorhanden. Die Verbindungen (**4**), (**7**) und (**9**) liegen aufgrund der jeweils 2 chiralen Zentren als Diastereomeren-Paare vor, wodurch Doppelpeaks im C-NMR mit Differenzen von bis zu 0,7 ppm auftreten.

C-2, C-3, C-9 und C-10 weisen in allen 4 Spektren in etwa die gleiche chemische Verschiebung auf, da sich hier Strukturunterschiede der untersuchten Substanzen nicht bemerkbar machen.

Am C-4 unterscheidet sich nur (**6**) von den anderen 3 Substanzen, da es sich nur in diesem Fall um ein allylisches C-Atom handelt. Außerdem deuten bei (**6**) die Signale bei 125,3 und 139,6 ppm, die C-5 und C-6 zugeordnet werden können, auf eine Doppelbindung hin.

Bei (**7**) ist aufgrund der Absorptionen bei 147,6/147,7 und 110,9/111,1 ppm ebenfalls eine Doppelbindung vorhanden, die C-7 und C-8 zugeordnet werden kann.

(**9**) hat keine Doppelbindung, denn das Spektrum zeigt keine Signale mit  $\delta > 90$  ppm.

Die Lokalisierung der zusätzlich zum C-1 in die untersuchten Verbindungen eingeführten OH-Gruppen ist anhand der chemischen Verschiebungen, kombiniert mit den Ergebnissen des APT-Experimentes (attached proton test), eindeutig möglich.

Bei (**6**) ist das OH-substituierte C-Atom ( $\delta=70,7$  ppm) quartär oder ein Methylenkohlenstoff ( $\text{CH}_2$ ). Letzterer könnte nur entstehen, wenn eine der 3 Methylgruppen hydroxyliert würde. Da die 3 Methyl-C-Atome (C-8, C-9, C-10) jedoch vorhanden sind, kommt nur eine Hydroxylierung an C-3 oder C-7 in Frage, weil nur das zu einem nicht H-substituierten C-Atom führt. Die OH-Gruppe muß an C-7 gebunden sein, da die beiden benachbarten Methyl-C-Atome (C-8 und C-10) im Vergleich zum C-9 zu tieferem Feld verschoben sind. Wäre die OH-Gruppe an C-3 gebunden, dürfte nur ein Methyl-C (C-9) verschoben sein.

Bei (**7**) konnte die Lage der Doppelbindung anhand des H-NMR bereits zwischen C-7 und C-8 lokalisiert werden. Neben der OH-Gruppe am C-1 ist bei dieser Verbindung noch ein weiteres OH-substituiertes C mit  $\delta=75,8/76,2$  ppm vorhanden. Da es sich gemäß APT-Spektrum um ein einfach H-substituiertes C handeln muß ( $\text{CH}_3$  scheidet bei

OH-Substitution aus), können C-1, C-2, C-4, C-5 oder C-6 diese zweite OH-Gruppe tragen. Die gute Übereinstimmung von C-1, C-2, C-4 und C-5 von (7) mit den gleichen C-Atomen von (4) und (9) läßt darauf schließen, daß dieser Teil des Moleküls bei allen 3 Substanzen gleich sein muß und daß die zweite OH-Gruppe von (7) deshalb an C-6 gebunden sein muß.

Auch der Vergleich mit einem vorhandenen Referenzspektrum [30] ergab gute Übereinstimmung mit dem gemessenen Spektrum von (7).

Bei (4) ist keine Doppelbindung vorhanden (vgl. H-NMR-Auswertung), C-8 und C-10 der Methylgruppen weisen jedoch deutlich unterschiedliche  $\delta$ -Werte auf. Dies deutet auf eine Fixierung der C-6 - C-7 - Bindung z.B. durch einen Epoxidring hin. Dies wird durch die hohen chemischen Verschiebungen an C-6 und C-7 bestätigt. Die Struktur wird außerdem durch die Tatsache gestützt, daß die Hydrolyse von (4) zu (9) führt.

(9) weist keine sterische Fixierung und keine Doppelbindungen auf. Dafür sind zusätzlich zum C-1 zwei weitere C-Atome mit  $\delta=70-80$  ppm vorhanden. Dies deutet auf 2 weitere OH-Gruppen hin. C-8 und C-10 sind zu tieferem Feld verschoben und das APT-Experiment ergibt, daß C-7 kein Proton trägt. Daraus läßt sich schließen, daß eine OH-Gruppe an C-7 gebunden ist.

Die gute Übereinstimmung der C-1 bis C-5 zugeordneten Absorptionen bei (7), (4) und (9) bestätigt, daß die dritte OH-Gruppe von (9) an C-6 gebunden ist. Vorhandene Referenzdaten [31] ergaben auch für (9) eine gute Übereinstimmung.

**Tab. 2-12:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz, interner Standard: TMS, APT-Experiment)

|             | (6)                   | (7) <sup>a</sup> | (4) <sup>a</sup> | (9) <sup>a</sup> |
|-------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
|             | $\delta$ (ppm)        | $\delta$ (ppm)   | $\delta$ (ppm)   | $\delta$ (ppm)   |
| <b>C-1</b>  | 60,9 (+)              | 60,6 (+)         | 60,6 (+)         | 60,7 (+)         |
| <b>C-2</b>  | 39,7 (+)              | 39,6/39,7 (+)    | 38,0 (+)         | 39,5/39,8 (+)    |
| <b>C-3</b>  | 29,7 <sup>b</sup> (-) | 29,2/29,5 (-)    | 29,2/29,4 (-)    | 28,7/29,7 (-)    |
| <b>C-4</b>  | 39,2 (+)              | 32,5/32,8 (+)    | 33,7 (+)         | 33,3/34,0 (+)    |
| <b>C-5</b>  | 125,3 (-)             | 32,0/32,2 (+)    | 26,2/26,4 (+)    | 28,5/29,2 (+)    |
| <b>C-6</b>  | 139,6 (-)             | 75,8/76,2 (-)    | 64,7/64,8 (-)    | 78,2/79,0 (-)    |
| <b>C-7</b>  | 70,7 (+)              | 147,6/147,7 (+)  | 58,5/58,6 (+)    | 73,2 (+)         |
| <b>C-8</b>  | 29,8 <sup>b</sup> (-) | 110,9/111,1 (+)  | 24,9 (-)         | 26,4 (-)         |
| <b>C-9</b>  | 19,6 (-)              | 19,7 (-)         | 19,5/19,6 (-)    | 19,6/19,9 (-)    |
| <b>C-10</b> | 29,9 <sup>b</sup> (-) | 17,3/17,6 (-)    | 18,6/18,7 (-)    | 23,2 (-)         |

<sup>a</sup>Diastereomeren-Gemische <sup>b</sup>Signalzuordnung kann vertauscht sein  
(+) = quart.C oder  $\text{CH}_2$ , (-) = CH oder  $\text{CH}_3$

### 2.2.1.2.2 GC-MS

Durch die NMR-Spektren konnte die Struktur der Verbindungen geklärt und den Massenspektren zugeordnet werden.

Die Abb 2-94 bis 2-101 zeigen die Massenspektren der Verbindungen: Das Molekülion ist nur beim Epoxid (**4**) ( $M_r=172$ , Abb. 2-98) zu sehen. Bei den Diolen sind  $m/z=157$  (M-15, Methylabspaltung) und  $m/z=154$  (M-18, Wasserabspaltung) die höchsten sichtbaren Massen. Auch mittels chemischer Ionisation konnten die Molekülionen von (**4**), (**7**) und (**9**) nicht detektiert werden.

Beim Diol (**6**) tritt als Basispeak  $m/z=139$  auf (Abb. 2-94), der durch Abspaltung von  $\text{CH}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}$  entsteht. Dieser, wie auch die weiteren Peaks im Spektrum von (**6**) geben keinen sicheren Aufschluß über die Struktur der Verbindung.

Durch den Austausch des Hydroxywasserstoffs gegen einen Trimethylsilylrest kann in einigen Fällen eine Stabilisierung dieser funktionellen Gruppe erreicht werden, so daß die Detektion des Molekülions möglich wird. Bei Diolen mit  $M_r=172$  ergibt die Silylierung der OH-Gruppen ein Molekulargewicht von  $M_r = 316$ .

Im Spektrum des silylierten Diols (**6**) (Abb. 2-95) ist das silylierte Molekülion zu erkennen. Weitere Fragmente sind  $m/z=301$  (= M-15, Methylabspaltung),  $m/z=226$  und  $136$  (=M-90 und M-180, Abspaltung von ein- bzw. zweimal Trimethylsilanol).

Das unsilylierte Diol (**7**) weist einen sehr deutlichen Basispeak mit  $m/z=71$  auf (Abb. 2-96). Dabei handelt es sich um das Produkt der Allylsplaltung. Das entstehende Allylkation ist sehr stabil und stellt daher das herausragende Fragment im Spektrum dar. Weitere strukturspezifische Fragmentationen treten nicht auf.

Im Spektrum der silylierten Verbindung (**7**) ist das Molekülion ( $m/z=316$ ) vorhanden (Abb. 2-97). Basispeak ist auch hier das Produkt der Allylsplaltung ( $m/z=143$ ).

Das Epoxid (**4**) unterliegt besonders leicht Umlagerungen. So entsteht der Basispeak  $m/z=59$  (Abb. 2-98) durch Abspaltung eines 2-Hydroxyisopropyl-Restes nach Umlagerung des Epoxids zum tertiären Alkohol. Bei (**6**) und (**9**) tritt diese Masse ebenfalls deutlich und bereits ohne Umlagerung auf.

Aufgrund der vielfältigen Umlagerungsmöglichkeiten ergeben sich sichere Strukturhinweise aus dem Epoxid-Spektrum nicht.

Nach Silylierung ist das Molekülion des Epoxids (**4**) mit  $m/z=244$  nicht meßbar (Abb. 2-99), wohl aber das Produkt der Methylabspaltung (M-15,  $m/z=229$ )

Bei (**9**) stellt die Abspaltung der Hydroxyisopropyl-Gruppe ( $m/z=59$ , Abb. 2-100) die wichtigste Fragmentierungsreaktion dar. Verbleibt die Ladung des Fragmentions am C-6-gebundenen Sauerstoff, so ergibt sich  $m/z=131$ . Daraus entstehen durch zweimalige Wasserabspaltung die weiteren charakteristischen Massen  $m/z=113$  und  $m/z=95$ .

Die Silylierung des Triols (Abb. 2-101) führt nicht zum Molekülion ( $m/z=406$ ), sondern die höchste Masse ( $m/z=301$ ) entsteht durch Abspaltung von 1 Trimethylsilanol und  $\text{CH}_3$ . Der Basispeak entsteht durch Abspaltung der silylierten tertiären OH-Gruppe mit  $m/z=131$ .

Das 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol (**8**) (Massenspektrum s. Anhang, Abb. 1) wurde anhand eines Literaturspektrums [32] identifiziert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Auswertung der Massenspektrometrie bei dieser Substanzklasse nicht zur Strukturaufklärung ausreicht, sofern keine Referenzspektren vorhanden sind. Daraus wird die Notwendigkeit zur Verwendung einer zerstörungsfreien Methode wie der Kernresonanzspektrometrie deutlich.

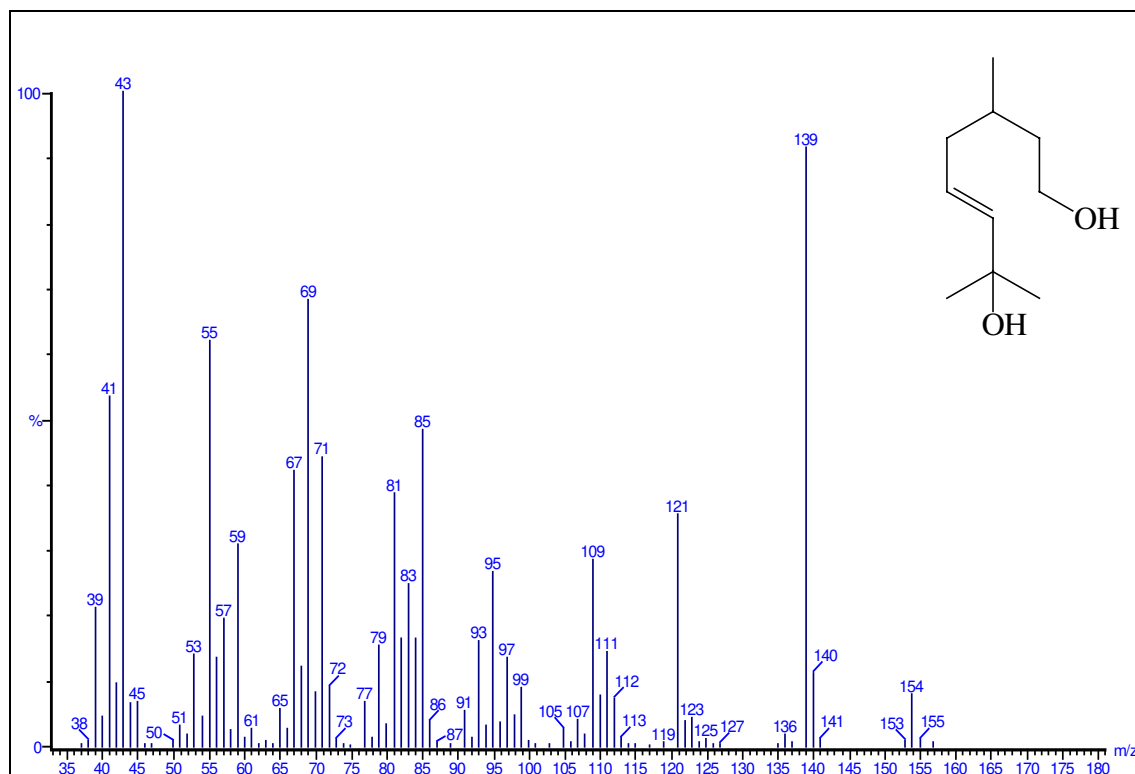


Abb. 2-94: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6)

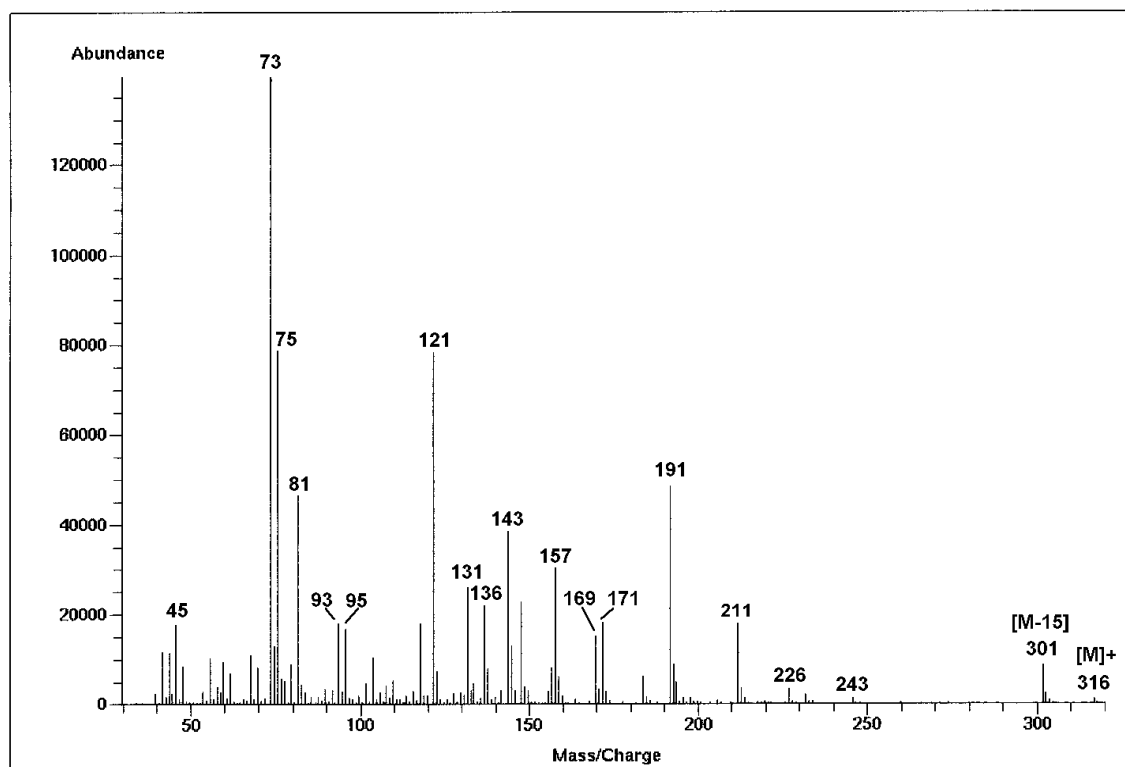


Abb. 2-95: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6) - silyliert



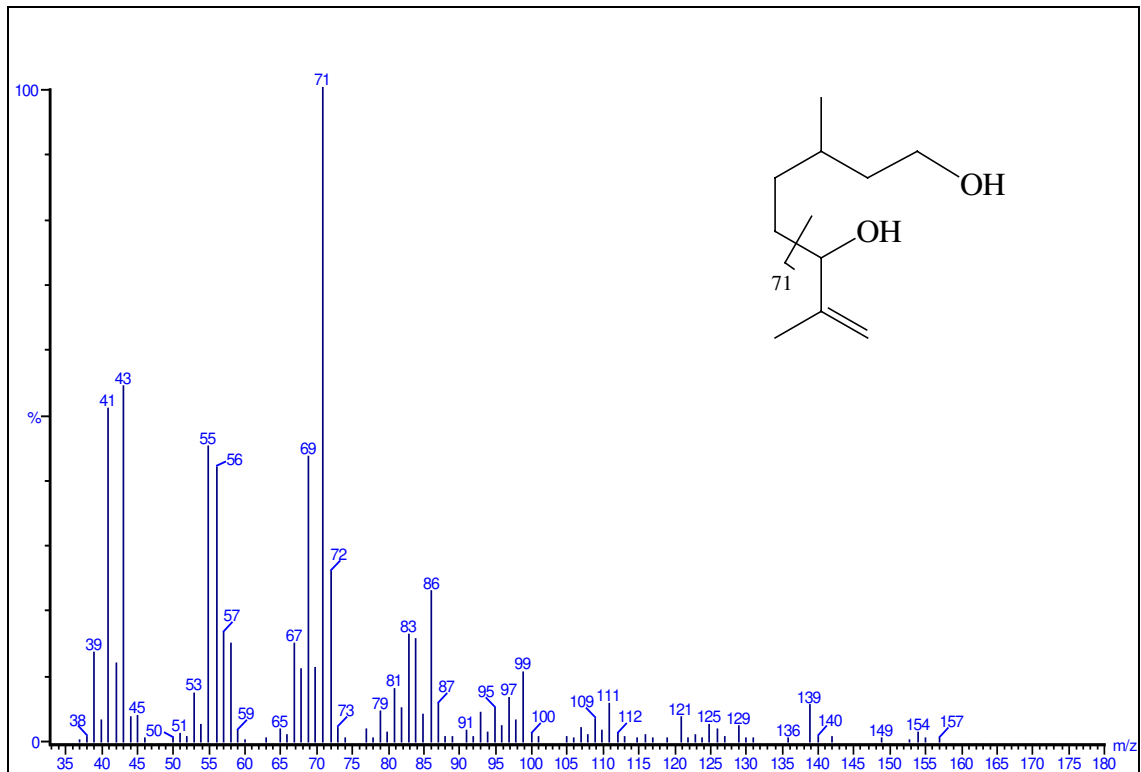


Abb. 2-96: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7)

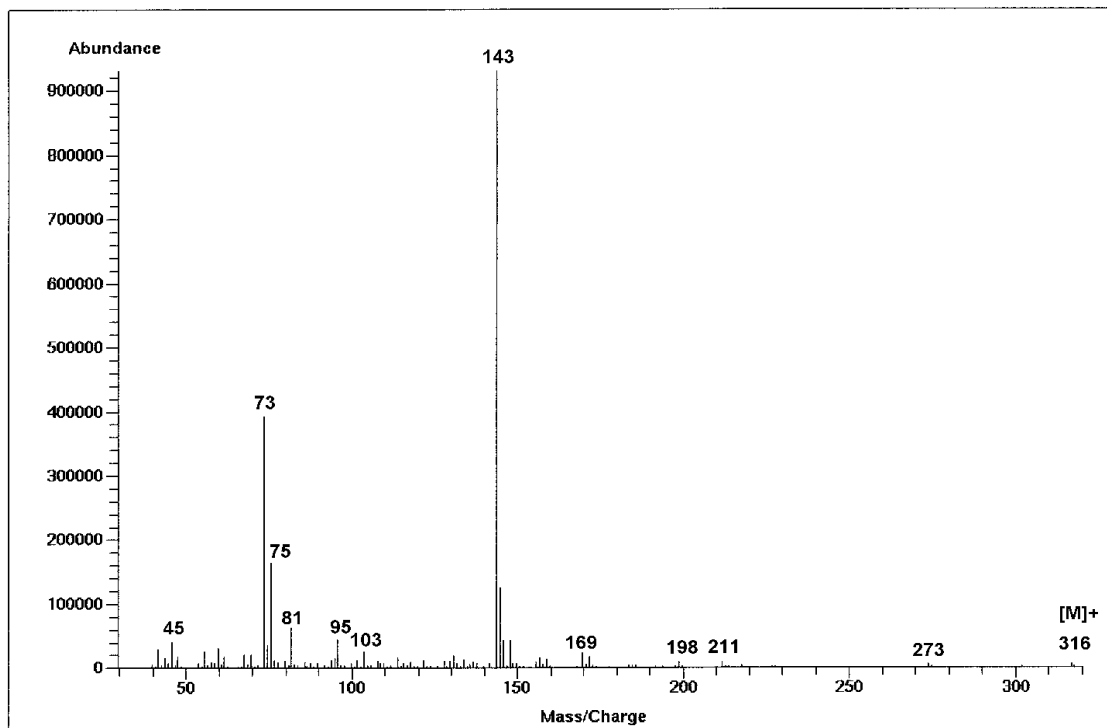


Abb. 2-97: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7) - silyliert

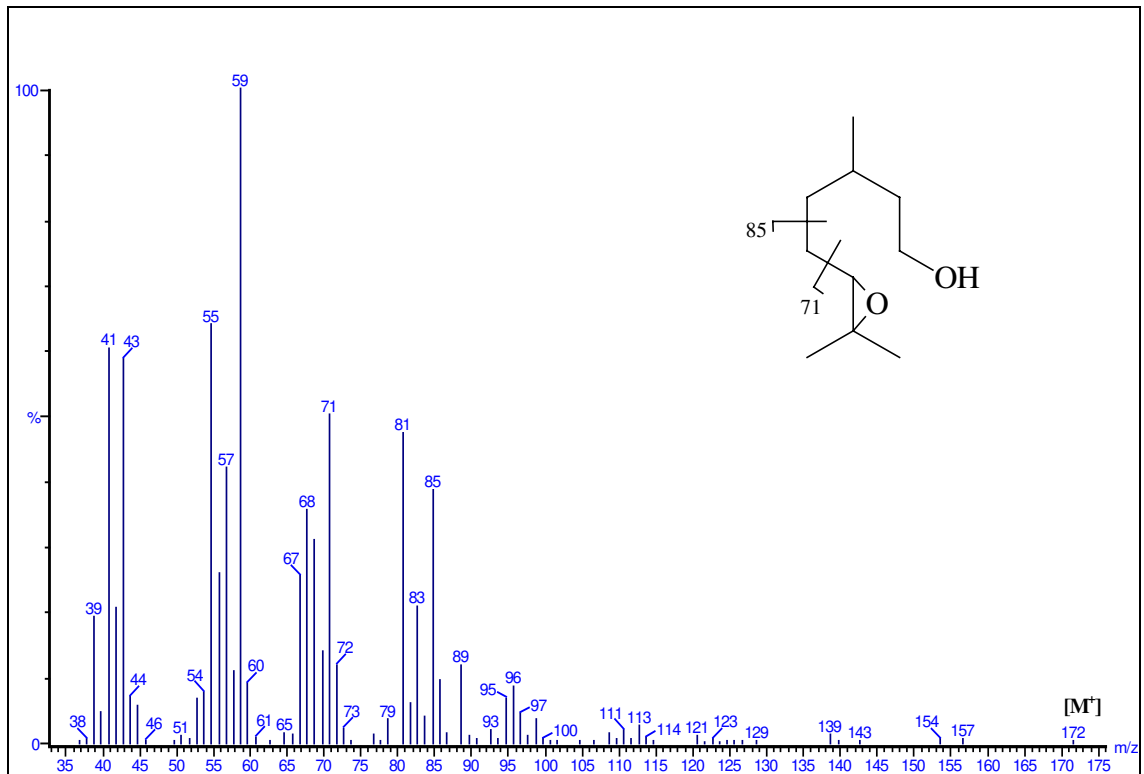


Abb. 2-98: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4)

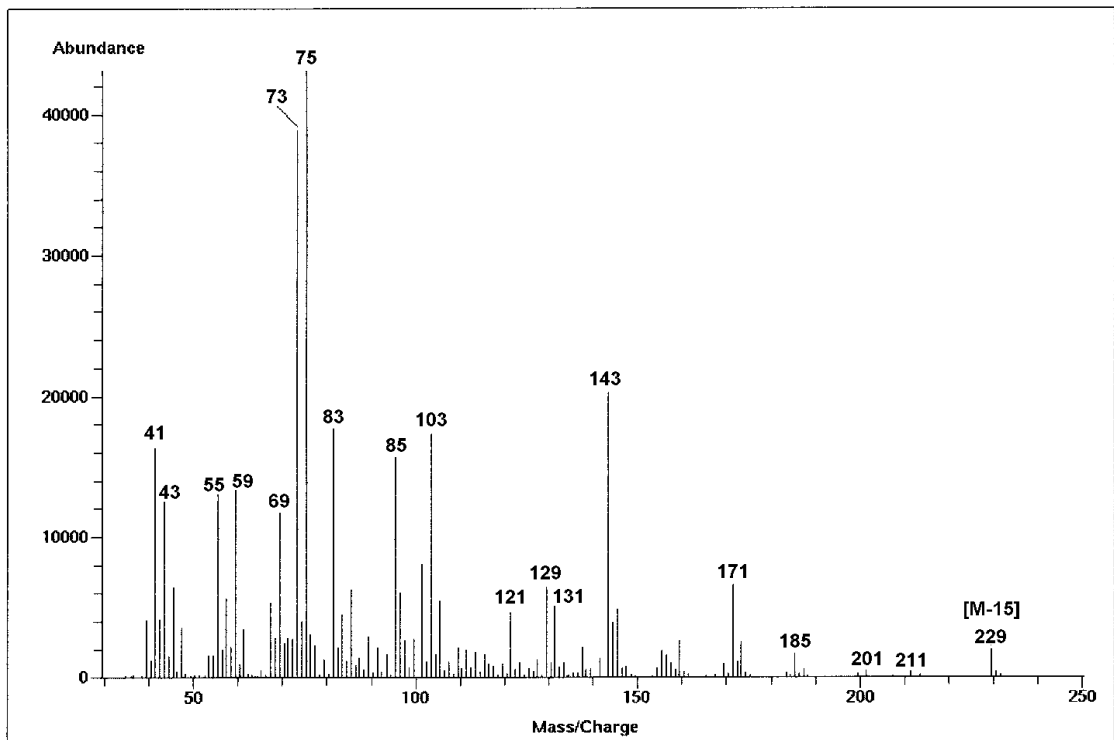


Abb. 2-99: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4) - silyliert

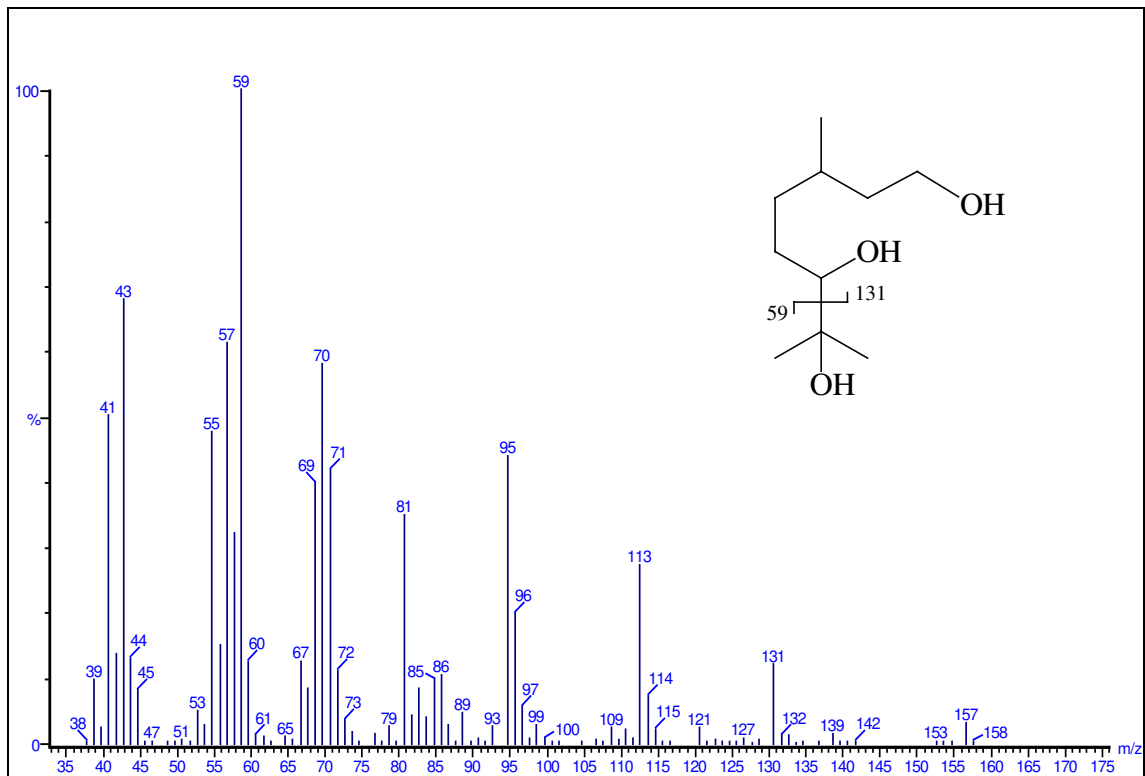


Abb. 2-100: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9)

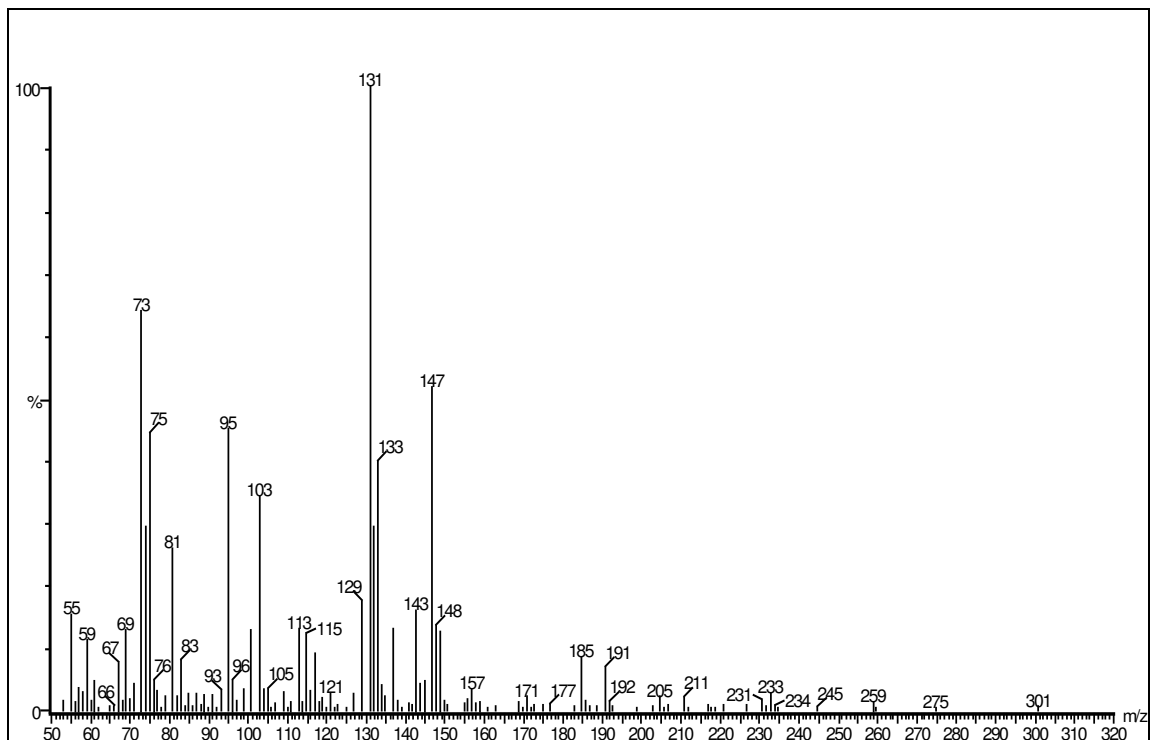


Abb. 2-101: Massenspektrum von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9) - silyliert

### 2.2.1.2.3 Produktmengen der Citronellol-Transformation

Die im Medium enthaltenen Produktmengen (Sammelproben über 7 Tage Transformationszeit, vgl. 4.9.1.3) sind in Tab. 2-11 dargestellt.

Die folgenden Stämme zeigten eine deutliche Produktbildung an Diolen (**6**), (**7**) und (**8**), Rosenoxid (**1**) oder Triol (**9**):

Stamm Nr. 5 (*Cystoderma carcharias*) wies neben dem höchsten Gehalt an Rosenoxiden auch eine deutliche Triol- (**9**) und Diol- (**6**) Bildung auf.

Stamm Nr. 7 zeigte neben relativ viel Rosenoxid einen sehr hohen Gehalt an Diol (**5**). Da es sich bei diesem Produkt um ein typisches Hydratisierungsprodukt handelt, kann eine enzymatische Bildung nur anhand der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Blindwerte geklärt werden.

Die Stämme Nr. 9, 14, 19, 20 und 21 bildeten mehrere [ $\text{mg L}^{-1}$ ] der Diole (**6**) und (**7**) sowie des Epoxids (**4a/b**). Rosenoxid (**1a/b**) entstand dagegen nur in Konzentrationen von 20-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Die Trockenmassen gingen bei allen Basidiomycetenstämmen, denen Citronellol zudosiert wurde, im Vergleich zu den Leerwerten auf 10-25% zurück. Nur bei den beiden Deuteromyceten (Nr. 2 und Nr. 6) wurde das Wachstum durch den Citronellolzusatz nicht gestört. Allerdings wurden bei *Corynespora cassiicola* (Nr. 2) keine Produkte gefunden, obwohl das Citronellol vollständig verbraucht war (im Medium nicht mehr nachweisbar).

Bei *Diplodia gossypina* (Nr. 6) wurde nur das Triol (**9**) in einer Menge von 6,8  $\text{mg L}^{-1}$  nachgewiesen und ebenfalls kein Citronellol mehr. Beide Pilze konnten das Citronellol vermutlich sehr effektiv transformieren, akkumulierten jedoch keine oder nur geringe Produktmengen, so daß sie unter diesen Kultivierungsbedingungen für Transformationen nicht geeignet waren.

**Tab. 2-13:** Produktmengen der Citronellol-Transformation ( $[mg L^{-1}]$  in Sammelproben) und Kulturparameter

|           | <i>Stammnr.</i> (vgl. Tab. 2-9)                                  |              | <i>1</i>   | <i>2</i>    | <i>3</i>   | <i>4</i>    | <i>5</i>    | <i>6</i>   | <i>7</i>   | <i>8</i>   | <i>9</i>   | <i>10</i>  | <i>11</i>  | <i>12</i>  | <i>13</i>  | <i>14</i>  | <i>15</i>  | <i>16</i>  | <i>17</i>  | <i>18</i>  | <i>19</i>  | <i>20</i>   | <i>21</i>   |
|-----------|--|--------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
|           | <i>Name</i>  | <i>Leer*</i> | <i>BLU</i> | <i>CCAS</i> | <i>CAF</i> | <i>CSTR</i> | <i>CCAR</i> | <i>DGO</i> | <i>FPI</i> | <i>IBE</i> | <i>LNU</i> | <i>PIN</i> | <i>PSC</i> | <i>PPI</i> | <i>PSQ</i> | <i>PCL</i> | <i>PCR</i> | <i>PFL</i> | <i>PLA</i> | <i>POS</i> | <i>PPU</i> | <i>PSAJ</i> | <i>PSAP</i> |
| <b>1a</b> | cis-Rosenoxid  | 0,015        | 0,130      | -           | 0,121      | 0,614       | 1,428       | -          | 1,214      | 0,051      | 0,426      | -          | 0,045      | 0,038      | 0,014      | 0,034      | 0,078      | 0,022      | 0,115      | 0,022      | 0,024      | 0,087       | 0,071       |
| <b>1b</b> | trans-Rosenoxid  | 0,004        | 0,030      | -           | 0,086      | 0,102       | 0,756       | -          | 0,347      | 0,008      | 0,248      | -          | 0,006      | 0,006      | 0,004      | -          | 0,007      | 0,001      | 0,064      | 0,007      | 0,002      | 0,026       | 0,006       |
| <b>2</b>  | Citronellal  | -            | -          | -           | -          | -           | -           | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | 0,28       | 2,15       | 0,14       | 0,96       | -          | 0,18       | 1,20       | 0,13        | 0,42        |
| <b>3</b>  | 3,7-Dimethyl-1-octanol   | 0,16         | -          | -           | -          | 0,55        | -           | -          | 0,20       | -          | -          | -          | -          | 0,40       | 0,27       | -          | 0,38       | -          | -          | -          | 0,98       | 0,03        | 0,49        |
| <b>4a</b> | 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (1.Isomer)                      | 0,38         | -          | -           | 0,81       | 0,25        | -           | -          | -          | 0,43       | 9,27       | -          | -          | 0,75       | 0,43       | 7,02       | 0,91       | 4,08       | -          | 1,43       | 6,55       | 3,39        | 6,98        |
| <b>4b</b> | 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (2.Isomer)                      | 0,47         | -          | -           | 0,92       | -           | -           | -          | -          | 0,48       | 9,35       | 0,32       | -          | 0,13       | 0,48       | 7,18       | 0,97       | 4,19       | -          | 1,49       | 6,77       | 3,80        | 7,36        |
| <b>5</b>  | 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol                                       | -            | -          | -           | -          | -           | -           | -          | 19,20      | -          | -          | -          | 1,57       | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | -           |
| <b>6</b>  | 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol                                    | 0,50         | 0,92       | -           | 2,23       | 2,72        | 1,74        | 0,17       | -          | 1,02       | 4,23       | 0,68       | -          | 1,64       | 0,59       | 2,92       | 1,91       | 2,13       | 1,36       | 1,00       | 3,19       | 3,99        | 3,83        |
| <b>7</b>  | 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol                                    | 0,21         | 0,29       | -           | 0,83       | 0,73        | 0,36        | 0,17       | 0,57       | 0,15       | 10,57      | 0,17       | 0,26       | 0,44       | 0,21       | 1,19       | 0,52       | 0,55       | 0,15       | 0,13       | 0,92       | 1,51        | 1,28        |
| <b>8</b>  | 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol                                    | -            | -          | -           | 0,28       | -           | 0,74        | -          | -          | 0,14       | 1,13       | 0,05       | 0,11       | 0,06       | -          | 0,23       | 0,08       | -          | 0,87       | -          | 0,13       | 0,36        | 0,38        |
| <b>9</b>  | 3,7-Dimethyl-1,6,7- octan-triol                                  | -            | -          | -           | -          | 0,85        | 0,53        | 6,80       | -          | -          | 1,24       | -          | -          | 0,11       | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -           | 0,21        |
|           | <b>pH-Wert</b><br>(Kultur + Substrat)                            | -            | -          | 6,96        | 5,31       | 4,69        | 4,29        | 7,13       | 2,78       | 5,50       | 5,84       | -          | 5,56       | 5,61       | 5,99       | 7,02       | 5,62       | 6,87       | 5,18       | 6,06       | 6,40       | 5,92        | 6,13        |
|           | <b>pH-Wert</b> (Kultur ohne Substrat)                            | -            | -          | 7,14        | 4,52       | 5,06        | 4,77        | 7,37       | 2,55       | 4,73       | 6,92       | -          | 4,99       | 5,17       | 5,74       | 7,05       | 4,83       | 6,51       | 5,83       | 6,44       | 6,77       | 6,05        | 6,31        |
|           | <b>Trockenmasse [g L<sup>-1</sup>]</b><br>(Kultur + Substrat)    | -            | -          | 9,64        | 1,10       | 0,54        | 0,61        | 8,68       | 1,37       | 0,35       | 3,26       | -          | 0,79       | 0,72       | 0,06       | 1,46       | 1,65       | 1,67       | 0,75       | 0,09       | 0,37       | 3,38        | 1,60        |
|           | <b>Trockenmasse [g L<sup>-1</sup>]</b><br>(Kultur ohne Substrat) | -            | -          | 9,15        | 4,34       | 4,95        | 7,66        | 9,84       | 3,64       | 2,33       | 9,26       | -          | 2,98       | 3,12       | 0,47       | 4,36       | 2,97       | 6,05       | 3,63       | 0,63       | 2,91       | 8,18        | 6,89        |

\*Die Citronellol-Leerwerte wurden von den angegebenen Konz. in den Pilzmedien bereits subtrahiert.

#### 2.2.1.2.4 Untersuchung der Kulturen von *C. carcharias* auf saure und nichtflüchtige Citronellol-Transformationsprodukte

Die Oxyfunktionalisierung von Citronellol schafft die Voraussetzungen für eine weitere Oxidation der Diole bzw. des Triols zu den entsprechenden Carbonsäuren. Um die Bedeutung eines solchen Stoffwechselweges zu untersuchen, wurden von *C. carcharias*-Kulturen nach 48 h Transformationszeit saure Extrakte gewonnen und methyliert. Wie schon bei *P. sapidus* ergab auch hier die GC-MS-Auswertung keine Hinweise auf saure Transformationsprodukte.

Wie bei der Limonen-Transformation durch *P. sapidus* (s. 2.1.5) wurde auch bei *C. carcharias* die Bildung nichtflüchtiger Transformationsprodukte nach separater Aufarbeitung von Medium und Myzel mittels HPLC-ELSD und zusätzlich HPLC-MS untersucht.

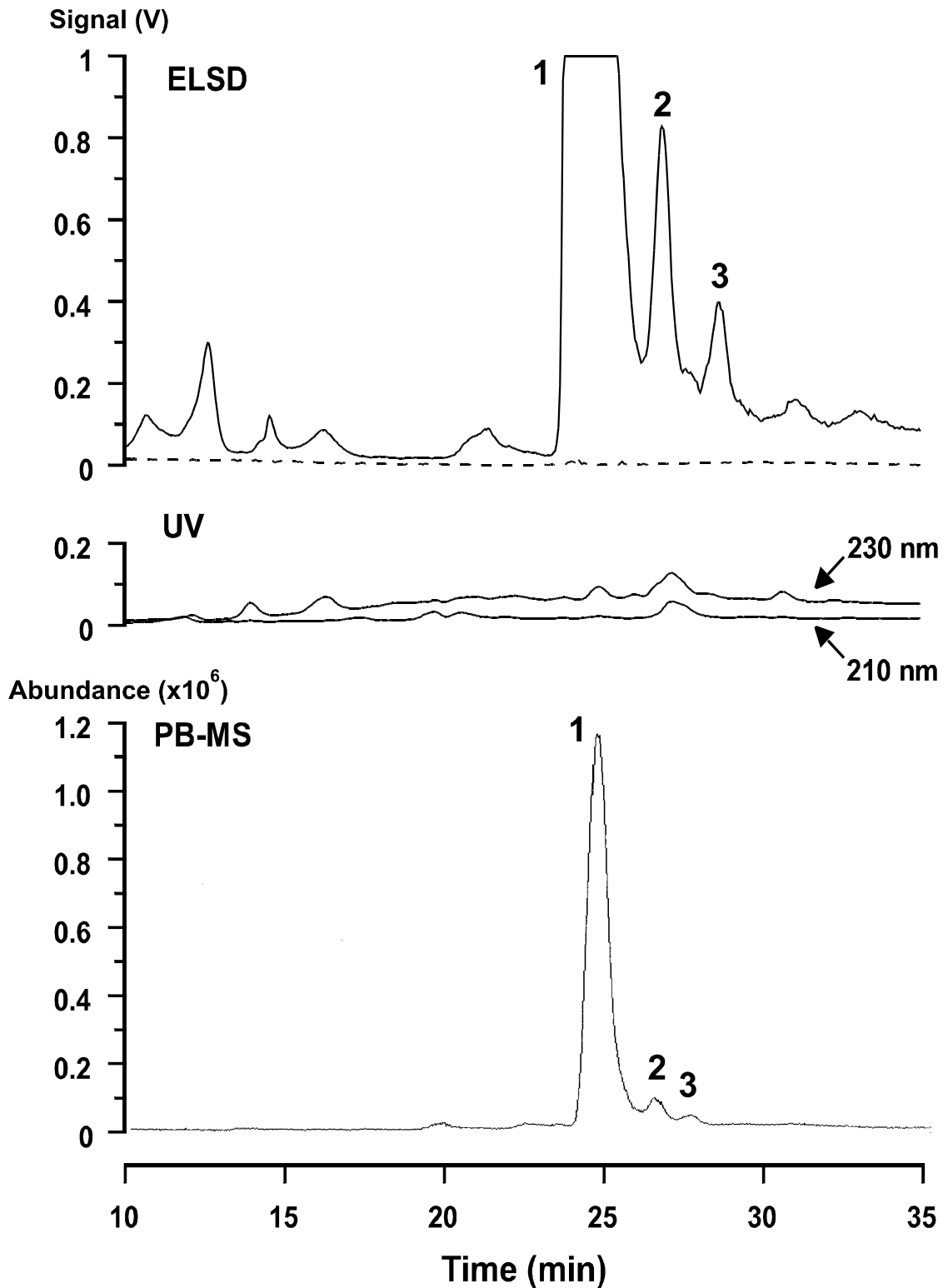
Wie Abb. 2-102 zeigt, traten beim Vergleich des Blindwertes (Medium von Kulturen ohne Citronellolzugabe) mit dem Transformationswert (Medium von Kulturen mit Citronellolzugabe) 3 Peaks im Chromatogramm besonders hervor.

Bei dem ersten und größten Peak (Peak 1) handelte es sich um das schon gaschromatographisch identifizierte Triol (**9**).

Die beiden nachfolgenden Peaks (2 und 3) waren sehr viel kleiner. Da sie auf der Diolsäule nach dem Triol eluierten, mußte es sich um polarere Produkte handeln, die damit als weitere Abbauprodukte von Interesse sein könnten.

Durch die HPLC-MS-Untersuchung wurden von den Peaks Nr. 1 und 2 Massenspektren erhalten, für Peak 3 reichte die Empfindlichkeit der Messung jedoch nicht aus.

Das Spektrum von Peak 1 entsprach dem GC-MS-Spektrum des Triols (vgl. Abb. 2-100, bei der HPLC-MS wurde jedoch nur der Massenbereich ab  $m/z=88$  erfaßt).



**Abb. 2-102:** Festphasenextrakte aus Medien citronellolgefütterter Kulturen von *C. carcharias*  
1) HPLC-ELSD-Spur (gestrichelte Linie: *C. carcharias* o. Citronellol),  
2) HPLC-UV-Spuren (210 und 230 nm),  
3) Particle-Beam (PB)-MS-Spur (Totalionenstrom)

Das Massenspektrum von Peak 2 (s. Anhang, Abb. 6-2) hatte große Ähnlichkeit mit dem von 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol (**5**). Die Retentionszeit dieser Verbindung lag jedoch bei der HPLC-ELSD mit 17,6 min deutlich vor Peak 2. Massen größer als  $m/z=159$  waren im HPLC-MS-Spektrum nicht vorhanden, so daß nicht auf das Vorhandensein eines Konjugates geschlossen werden, sondern eher ein nichtflüchtiges Oxidationsprodukt des Citronellols vermutet werden konnte. Eine vollständige Identifizierung des Produktes erfolgte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht.

Im Gegensatz zum Medium wurden im Myzel zwischen Kontrollkulturen und Transformationskulturen – abgesehen von einem kleinen Triolpeak im Transformationswert – keine Unterschiede in den HPLC-ELSD-Chromatogrammen festgestellt (Chromatogramme nicht abgebildet).

### **Teilzusammenfassung 2.2.1:**

- Neben den allylischen Diolen, darunter auch dem Rosenoxid-Precursor 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**), ergab die Transformation des Monoterpenalkohols Citronellol auch das Epoxid sowie das resultierende vicinale Diol (**9**) als Produkte. Rosenoxid konnte bei vielen Pilzen als Nebenprodukt nachgewiesen werden.
- Bei allen 19 untersuchten Basidiomyceten wurden Transformationsprodukte festgestellt. *Cystoderma carcharias* bildete die größten Rosenoxid-Mengen.

⇒ Fazit: Ziel der weiteren Untersuchungen sollte sein, die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* nach Möglichkeit auf die Rosenoxidbildung hin zu optimieren.

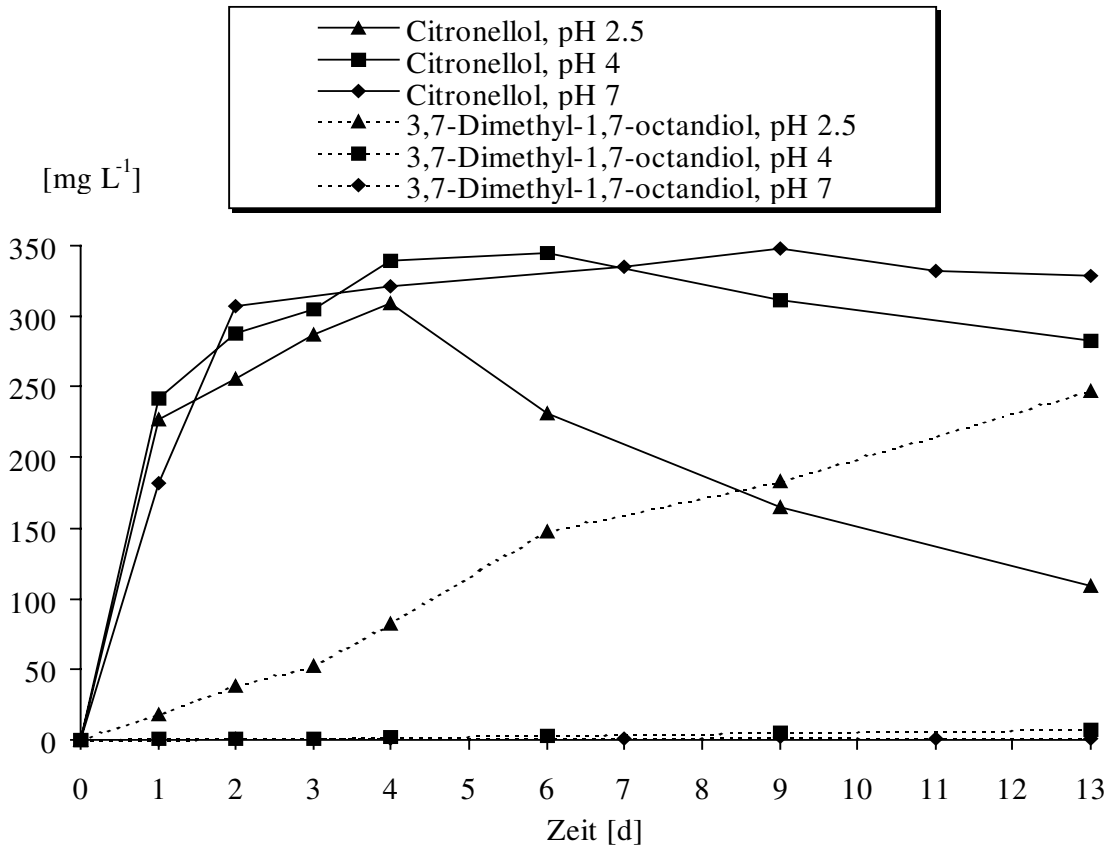
### **2.2.2 Untersuchung der nichtenzymatischen Reaktionen von Citronellol und seinen Transformationsprodukten in wäßrigen Kulturmedien**

Anhand von Kontrollexperimenten sollte festgestellt werden, welchen pH-abhängigen Reaktionen Citronellol in wäßriger Lösung unterliegt und wie die Biotransformationsprodukte sich nichtenzymatisch verändern. Für die Citronellolblindwerte wurden  $2 \times 20 \mu\text{L}$  Citronellol  $(100 \text{ mL})^{-1}$  bei verschiedenen pH-Werten unter den gleichen Bedingungen wie die Pilzkulturen inkubiert.

Wie Abb. 2-103 zu entnehmen ist, wurde Citronellol bei pH-Werten  $\geq 4$  kaum abgebaut. Bei niedrigeren pH-Werten (hier pH 2,5) wurde die Doppelbindung des Citronel-



lols zum 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol (**5**) hydratisiert. Unter den gewählten Bedingungen trat eine fast konstante Reaktionsgeschwindigkeit von etwa  $15\text{-}20\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$  für die Diolbildung wie auch für den Citronellolabbau auf. Eine mögliche enzymatische Bildung dieses Diols in Kulturen von Stamm Nr. 7 (vgl. 2.2.1.2.3) war daher nicht von einer nichtenzymatischen, säurekatalysierten Bildung zu unterscheiden.



**Abb. 2-103:** pH-Abhängigkeit der Citronellol-Blindwerte bei direkter Citronelloladdition ( $2 \times 20\ \mu\text{L}$  Citronellol pro  $100\ \text{mL}$  SNLH-Medium)

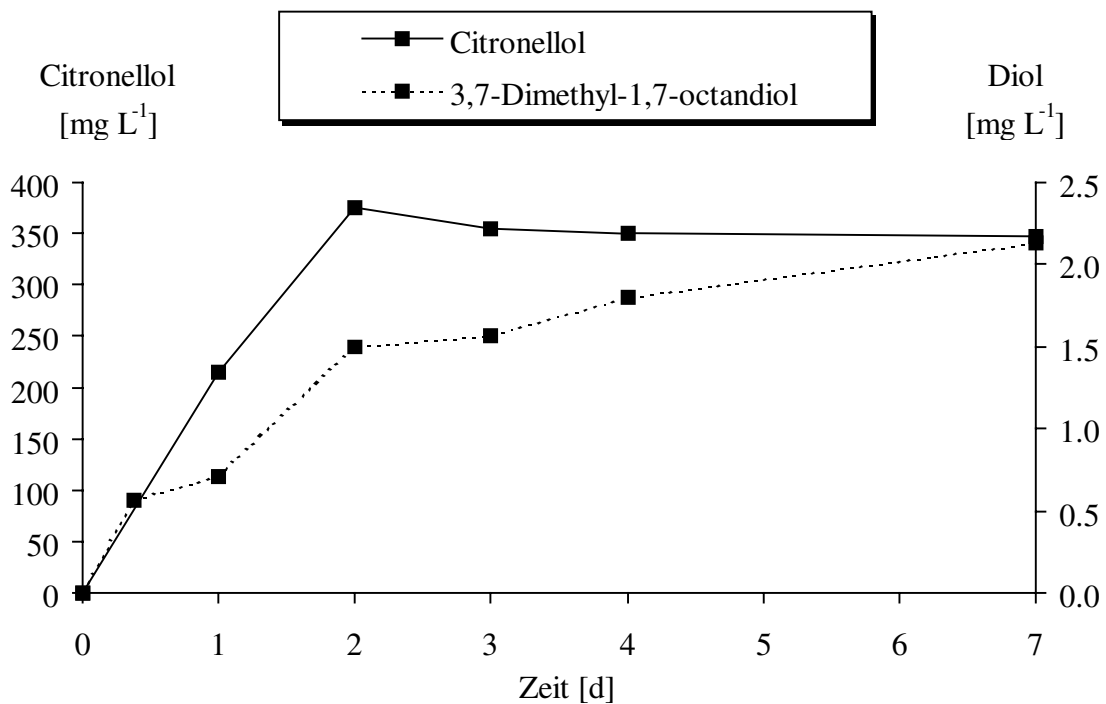
Außer diesem Hydratisierungsprodukt konnte jedoch keine Produktbildung festgestellt werden, die über die in Tab 2-13 dokumentierten Citronellolleerwerte hinausging.

Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kommt als typisches Produkt verschiedener Oxidasen als blindwertbeeinflussender Medienbestandteil in Frage. Um dies zu untersuchen, wurde einem Citronellolblindwert ( $2 \times 0,11\ \text{mmol}$  pro  $100\ \text{mL}$ ) gleichzeitig mit Citronellolzugabe jeweils eine äquimolare Menge an Wasserstoffperoxid zudosiert. Wie Abb. 2-104 zeigt, wurde ein Einfluß dieses Oxidationsmittels auf den Gehalt an nichtenzymatischen Abbauprodukten nicht festgestellt. Einziges nachweisbares Produkt war auch hier

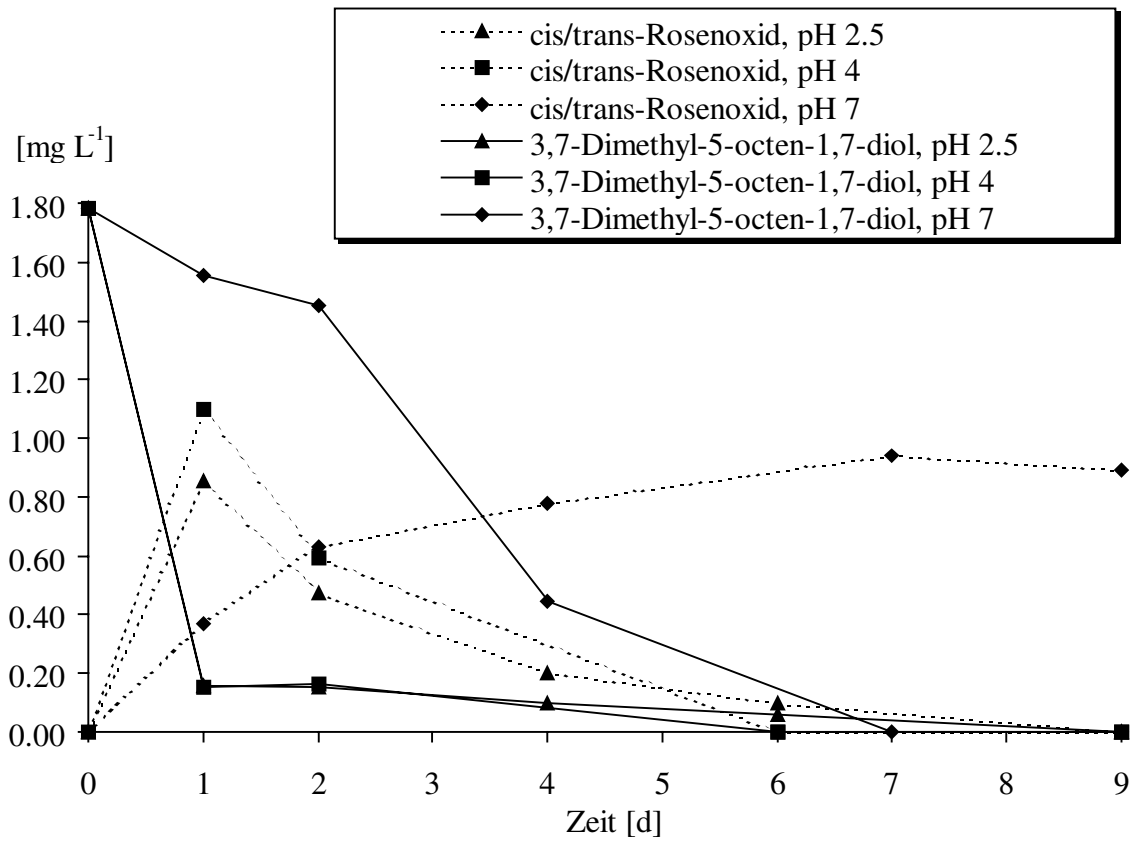
das 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol (**5**), während Hydroperoxide oder andere zusätzliche Produkte nicht detektierbar waren.

Neben den nichtenzymatischen Reaktionen von Citronellol ist auch der Abbau der Citronelloxidationsprodukte wichtig, um die Bedeutung des chemischen Abbaus der primären Produkte zu den Folgeprodukten abschätzen zu können.

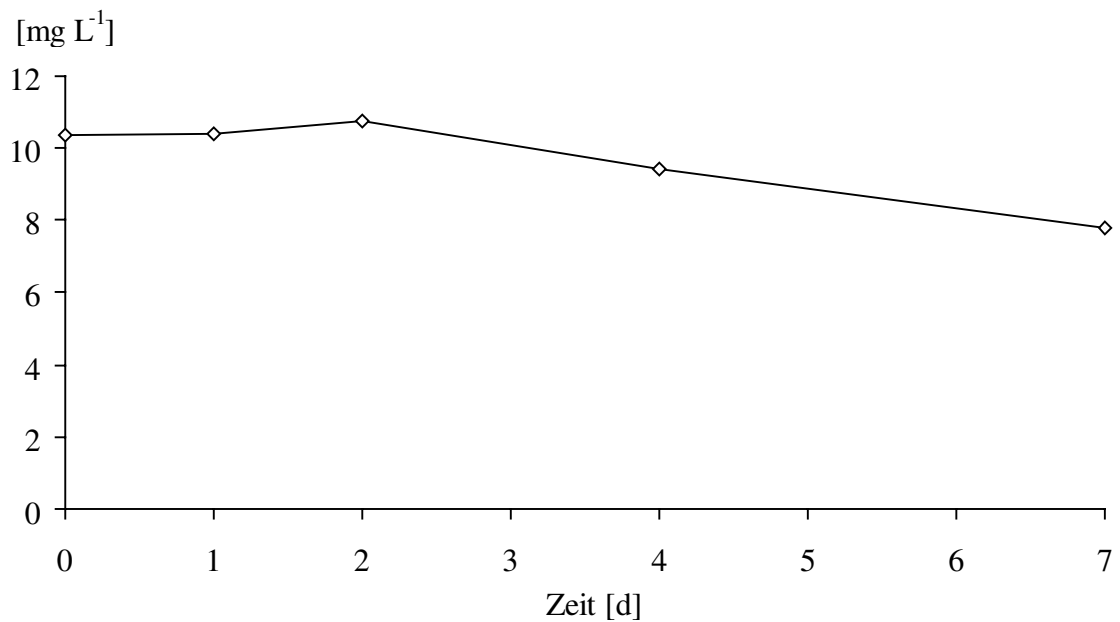
Wurde wäßrigem SNLH-Medium 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) ( $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) zuge-  
setzt, so war eine säurekatalysierte intramolekulare Veretherung zum Rosenoxid zu er-  
warten. Es zeigte sich (s. Abb. 2-87), daß bei pH-Werten  $\ominus$  4 zwar zunächst eine Ro-  
senoxidbildung stattfand, daß aber im weiteren Verlauf ein Abbau dieses Produktes zu  
nicht identifizierten Verbindungen auftrat. Bei pH 7 war die Rosenoxidbildung langsa-  
mer, allerdings war bei diesem pH-Wert auch kein Rosenoxidverlust feststellbar.



**Abb. 2-104:** Citronellolblindwert bei pH 4 unter Zusatz einer äquimolaren Menge Wasserstoffperoxid



**Abb. 2-105:** Abbau von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) zu Rosenoxid bei verschiedenen pH-Werten



**Abb. 2-106:** Stabilität von 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (**4**) in SNLH-Medium bei pH 7,0

Das Epoxid erwies sich bei pH-Werten von 2,5 und 4,0 als sehr instabil: Bei Zusatz von  $10 \text{ mg L}^{-1}$  war es nach einem Tag nicht mehr nachweisbar. Bei pH 7,0 (Abb. 2-106) blieb dieses Produkt dagegen über den Zeitraum von 7 Tagen noch zu 80% erhalten.

Das 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) wies eine gute pH-Wert-Stabilität auf: Unter den hier untersuchten Bedingungen traten keine Abbaureaktionen auf, sondern das Triol blieb vollständig erhalten (Ergebnisse nicht dargestellt).

### **Teilzusammenfassung 2.2.2:**

- In chemischen Blindwerten trat bei pH-Werten  $\approx 4$  das Hydratisierungsprodukt 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol als Hauptprodukt auf. Wasserstoffperoxid hatte keinen Einfluß auf die Blindwerte.
- Das Rosenoxid-Precursor-Diol 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) ließ sich in wäßriger Lösung nichtenzymatisch zum Rosenoxid umsetzen.
- 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (**4**) wurde bei pH-Werten unter 7 sehr schnell abgebaut, während das dabei entstehende 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) eine sehr gute pH-Wert-Stabilität aufwies.

### 2.2.3 Zeitlicher Verlauf der Biotransformation bei *Cystoderma carcharias* und *Pleurotus sapidus*

Aufgrund der Ergebnisse des Screenings für citronellohtransformierende Pilzstämme wurden für weitergehende Untersuchungen die Basidiomycetenstämme *Cystoderma carcharias* (Stamm Nr. 5) und *Pleurotus sapidus* (Stamm Nr. 21) verwendet. Letzterer wurde ausgewählt, weil er neben guten Transformationsleistungen beim Citronellol die besten Transformationseigenschaften bei den Terpenkohlenwasserstoffen aufgewiesen hatte.

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Biotransformation näher untersucht, um herauszufinden, ob die interessanten Zielprodukte 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) und Rosenoxid (**1**) im Transformationsverlauf in größeren Mengen auftraten.

#### 2.2.3.1 Direkte Citronelloldosierung

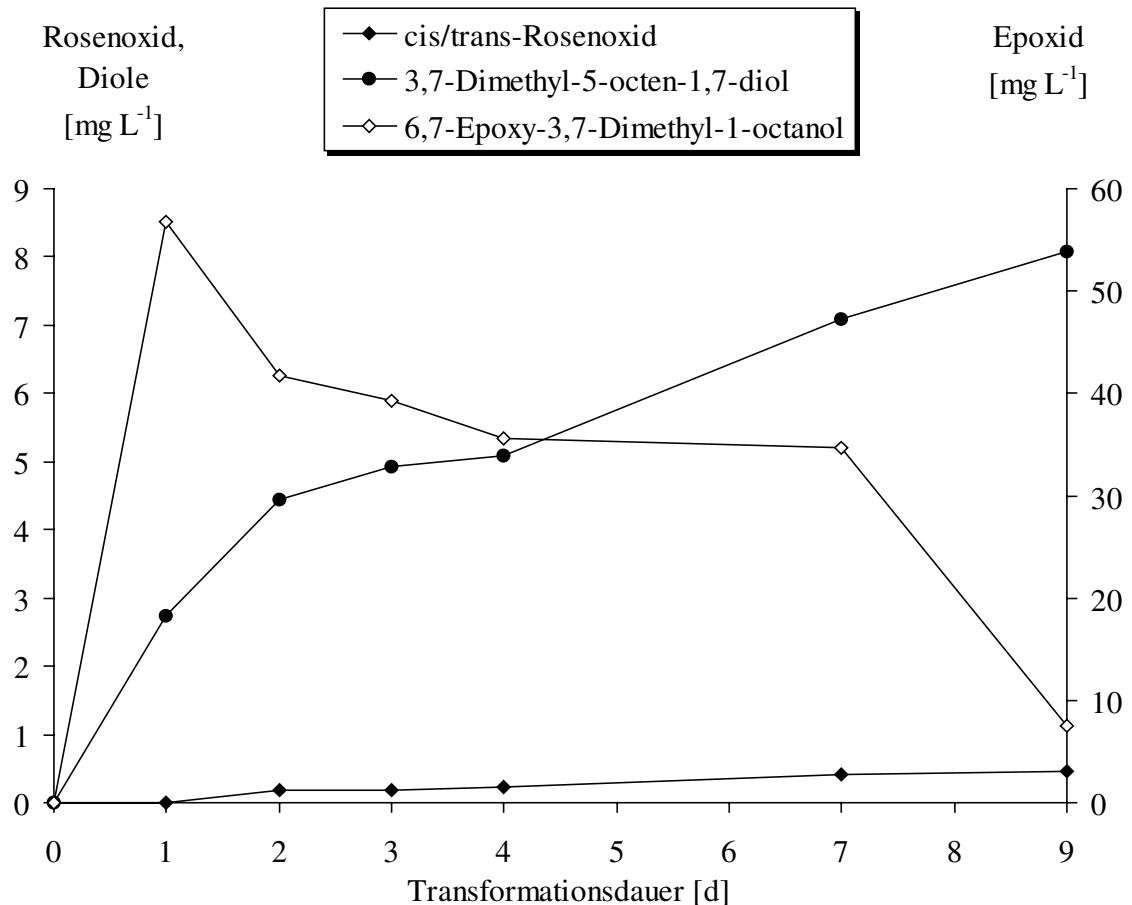
Zu den 100 mL-Kulturen wurden nach 2,5 Kulturtagen 50  $\mu$ L Citronellol dosiert und die Produktmengen im Kulturverlauf verfolgt.

Abb. 2-107 zeigt die Produktbildung bei *P. sapidus*. Bei diesem Stamm war das Epoxid Hauptprodukt mit einem Gehalt von fast 60 mg L<sup>-1</sup>, der nach einem Tag Transformationsdauer erreicht wurde und im weiteren Kulturverlauf wieder abnahm.

Der Gehalt an 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**), dem direkten Rosenoxid-Precursor nahm bis zum Ende der Kultivierung zu. Rosenoxid (**1**) war allerdings im Medium nur zu <1 mg L<sup>-1</sup> nachweisbar. Trotz des relativ hohen Diolgehaltes fand also eine nennenswerte Akkumulation von Rosenoxid nicht statt.

Bei *C. carcharias* trat ebenfalls das Epoxid (**4**) als Hauptprodukt mit >60 mg L<sup>-1</sup> auf (Abb. 2-108). Im weiteren Verlauf wurde eine deutliche Menge an 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) gebildet (16 mg L<sup>-1</sup> nach 9 Transformationstagen). Bei diesem Stamm war Rosenoxid in einer Menge von maximal 2,5 mg L<sup>-1</sup> nachweisbar.

Außerdem war bei *C. carcharias* eine deutliche Triolbildung festzustellen (max. 16 mg L<sup>-1</sup>).



**Abb. 2-107:** Citronellol-Transformation durch *P. sapidus* (direkte Substratzugabe)

### 2.2.3.2 Citronelloldosierung über die Gasphase

Da sich die Substratdosierung über die Gasphase bei der Limonentransformation durch *P. sapidus* als günstig erwiesen hatte, wurde dieser Dosierungsmodus bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* ebenfalls untersucht. Dazu wurden zu 2,5 Tage alten Submerskulturen 500  $\mu\text{L}$  Citronellol in ein Gasphasenreservoir dosiert.

Dadurch trat eine Verschiebung im Produktspektrum auf (Abb. 2-110). Das Epoxid (**4**) war im Medium gar nicht mehr nachweisbar, stattdessen war das Triol (**9**) mit max. 17  $\text{mg L}^{-1}$  Hauptprodukt. Seine Konzentration lag damit deutlich über der des 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diols (**6**), dem Rosenoxid-Precursor (max. 3  $\text{mg L}^{-1}$ ). Im Vergleich zur direkten Substratdosierung wurde vom Diol und vom Rosenoxid bei der Gasphasendosierung nur etwa die Hälfte der Produkte gebildet, während die absolute Triolmenge bei beiden Methoden vergleichbar war.

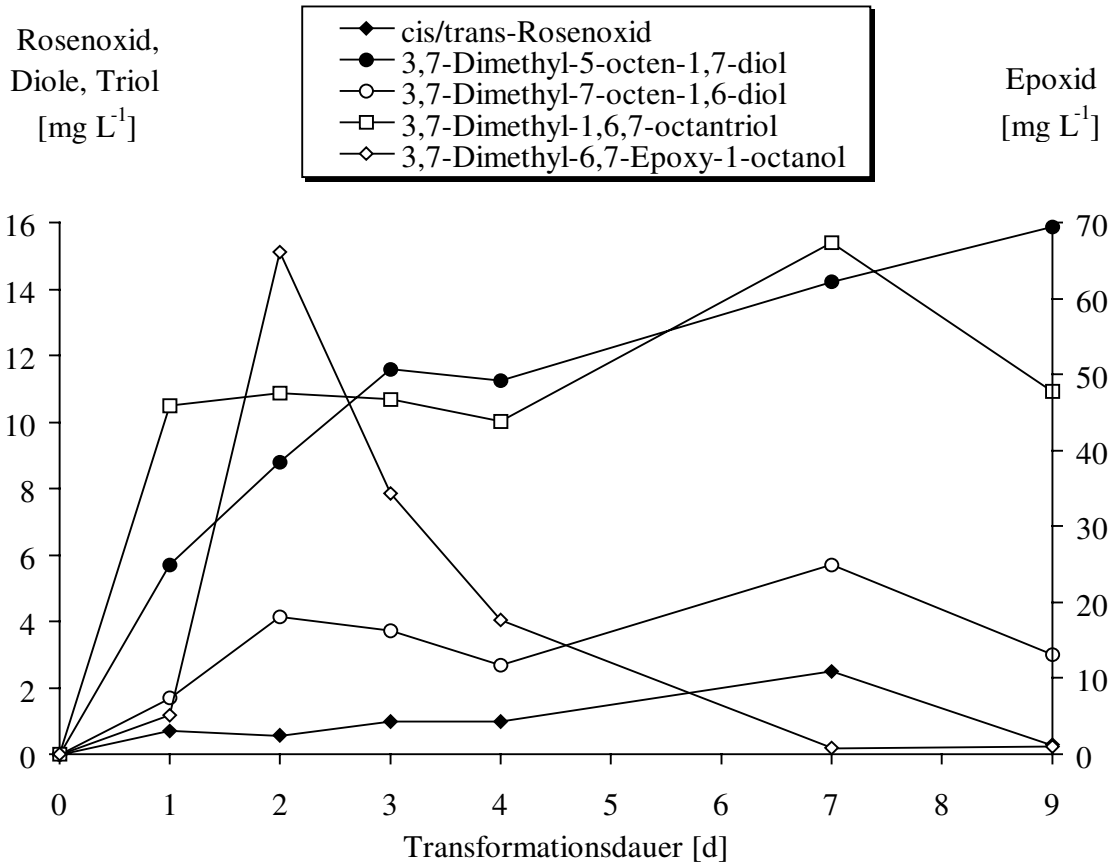


Abb. 2-108: Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (direkte Substratzugabe)

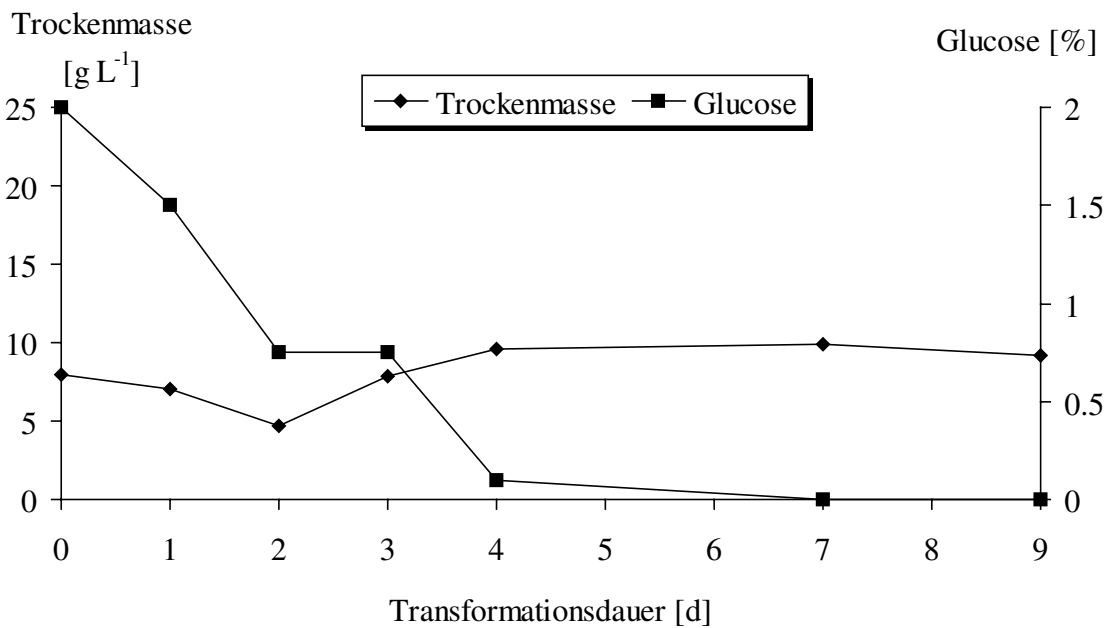
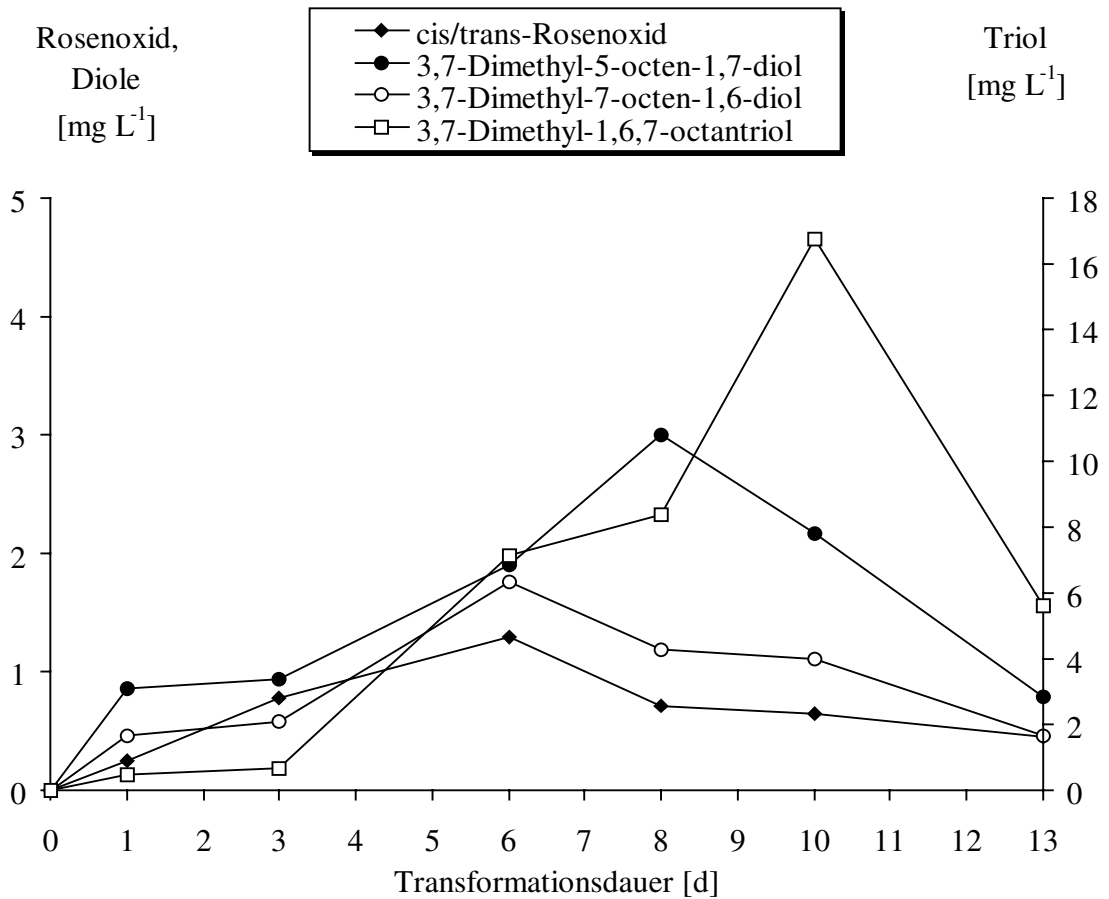
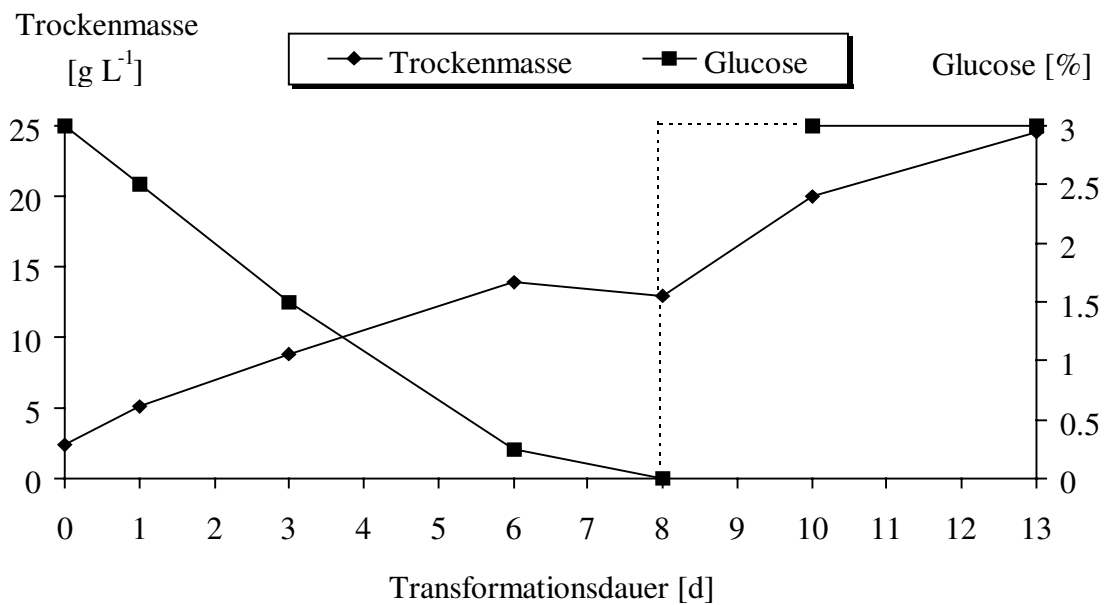


Abb. 2-109: Kulturparameter der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (direkte Substratzugabe)



**Abb. 2-110:** Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (Gasphasen-Substratzugabe)



(3% Glucoseaddition am 8. Transformationstag)

**Abb. 2-111:** Kulturparameter der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (Gasphasen-Substratzugabe)



Die Gasphasen-Zugabe führte aufgrund der geringeren Substratkonzentration im Myzel von *C. carcharias* dazu, daß über den gesamten Transformationsverlauf ein Glucoseverbrauch und Wachstum vorhanden war (Abb. 2-111).

### **Teilzusammenfassung 2.2.3:**

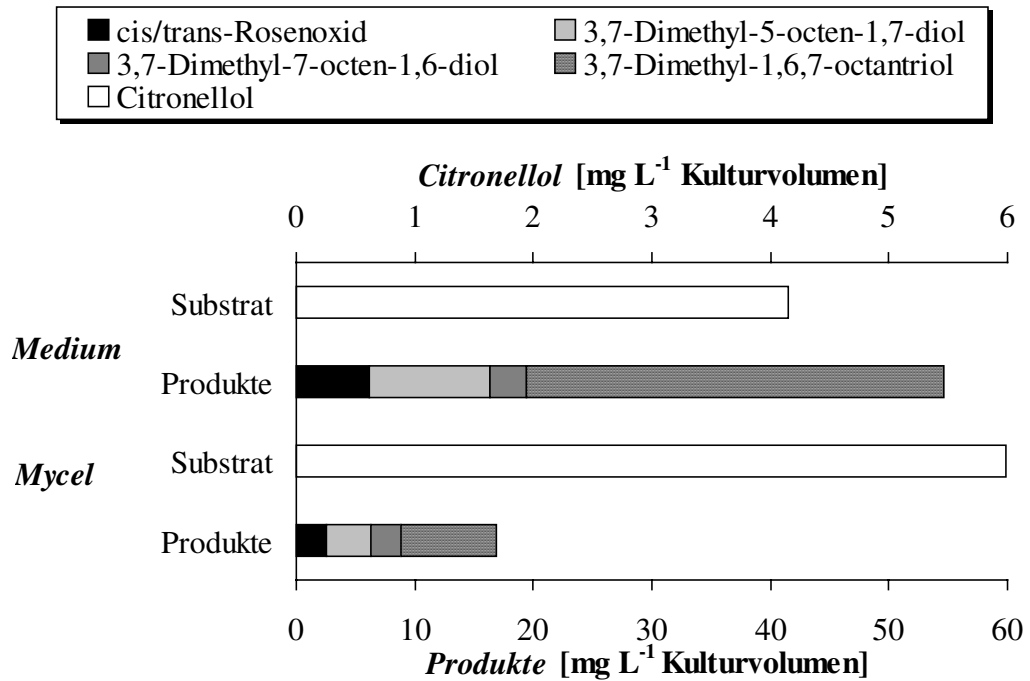
- Sowohl *P. sapidus* als auch *C. carcharias* bildeten das 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (**4**) als Hauptprodukt, während das Rosenoxid-Precursor-Diol (**6**) und das Rosenoxid (**1**) nur als Nebenprodukte auftraten.
- Citronellol bewirkte bei direkter Zugabe, wie schon die Terpenkohlenwasserstoffe, eine vollständige Wachstumshemmung.
- Dagegen trat bei der Substratdosierung über die Gasphase bei *C. carcharias* noch Wachstum auf. Aufgrund der geringeren Flüchtigkeit des Citronellols führte sie jedoch auch zu verringerten Produktmengen. Während das Epoxid (**4**) hier nicht mehr im Medium nachgewiesen wurde, war in diesem Fall das Triol (**9**) Hauptprodukt.

⇒ Fazit: Die Gasphasendosierung bot für Monoterpenalkohole keine Vorteile und die Bildung allylischer Produkte trat nur als Nebenreaktion der Transformation auf, während die Epoxidierung bzw. die Bildung des korrespondierenden vicinalen Diols im Vordergrund stand.

### **2.2.4 Substrat- und Produktverteilung in Medium und Myzel bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias***

Die separate Bestimmung der Substrat- und Produktgehalte bei der Transformation von Citronellol ergab, daß die Produkte in ca. 4-fachem Überschuß im Medium gelöst vorliegen (Abb.2-112).

Das Citronellol war im Myzel nur in einer ca. 50% größeren Menge gelöst als im Medium. Es unterschied sich damit wesentlich von den Terpenkohlenwasserstoffen, bei denen die Löslichkeit im Myzel um ein Vielfaches besser war als diejenige im Medium (Faktor 114 für  $\alpha$ -Pinen nach 48 h Transformationszeit, s. 2.1.4). Dies ist auf die viel bessere Wasserlöslichkeit von Citronellol zurückzuführen.



**Abb. 2-112:** Substrat- und Produktverteilung bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (48 h Transformationszeit, Citronellol: 2 x 20  $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ )

### 2.2.5 Variation der Kulturbedingungen bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias*

*C. carcharias* (Stamm Nr. 5) erwies sich in den Vorversuchen als für die Citronellol-Transformation am besten geeigneter Stamm, da die höchsten Konzentrationen an den Zielsubstanzen Rosenoxid (**1**) und dessen Vorstufe 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) erzielt wurden.

Als Hauptprodukte traten bei den Vorversuchen 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) bzw. 3,7-Dimethyl-6,7-Epoxy-1-octanol (**4**) auf.

Ziel der Experimente zur Variation der Kultivierungsbedingungen war es, zunächst Aufschluß über die Abhängigkeit des Produktspektrums von den Kulturbedingungen zu gewinnen und dann die Produktbildung möglichst zugunsten der Zielsubstanzen (**1**) und (**6**) zu beeinflussen.

Aufgrund der deutlichen Wachstumshemmung durch die in den ersten Versuchen eingesetzte Menge an Citronellol (50  $\mu\text{L}$  / 100 mL Kultur = 0,275 mmol / 100 mL) wurde in den nachfolgenden Versuchen eine stufenweise Dosierung von je 20  $\mu\text{L}$  (=2 x 0,11 mmol) nach 2,5 und 3,5 Kulturtagen vorgenommen, um die toxischen Effekte möglichst gering zu halten.

### 2.2.5.1 Plackett-Burman-Design zur Identifizierung von Medienbestandteilen mit Einfluß auf die Transformationsleistung und das Produktspektrum

Für die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Medienbestandteile auf die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* wurde das gleiche Plackett-Burman-Design verwendet wie für die Limonen-Transformation durch *P. sapidus* (vgl. 2.1.8.1).

Die Substratzugabe erfolgte in Mengen von jeweils 20 µL (0,11 mmol) je 100 mL Kulturvolumen nach 2,5 und 3,5 Kulturtagen.

Vor der Darstellung der Transformationsergebnisse, sollen die Einflüsse der verschiedenen Parameter auf die Pilztrockenmasse im durchgeführten Plackett-Burman-Design aufgezeigt werden.

Vor der Citronellolzugabe (nach 2,5 Kulturtagen) waren positive Wachstumseffekte durch Glucose, Malzextrakt, Hefeextrakt und Magnesium festzustellen (Abb. 2-114).

Ein deutlich negativer Effekt wurde durch Universalpepton hervorgerufen. Alle anderen Effekte lagen im Bereich der Schwankungen der Dummies.

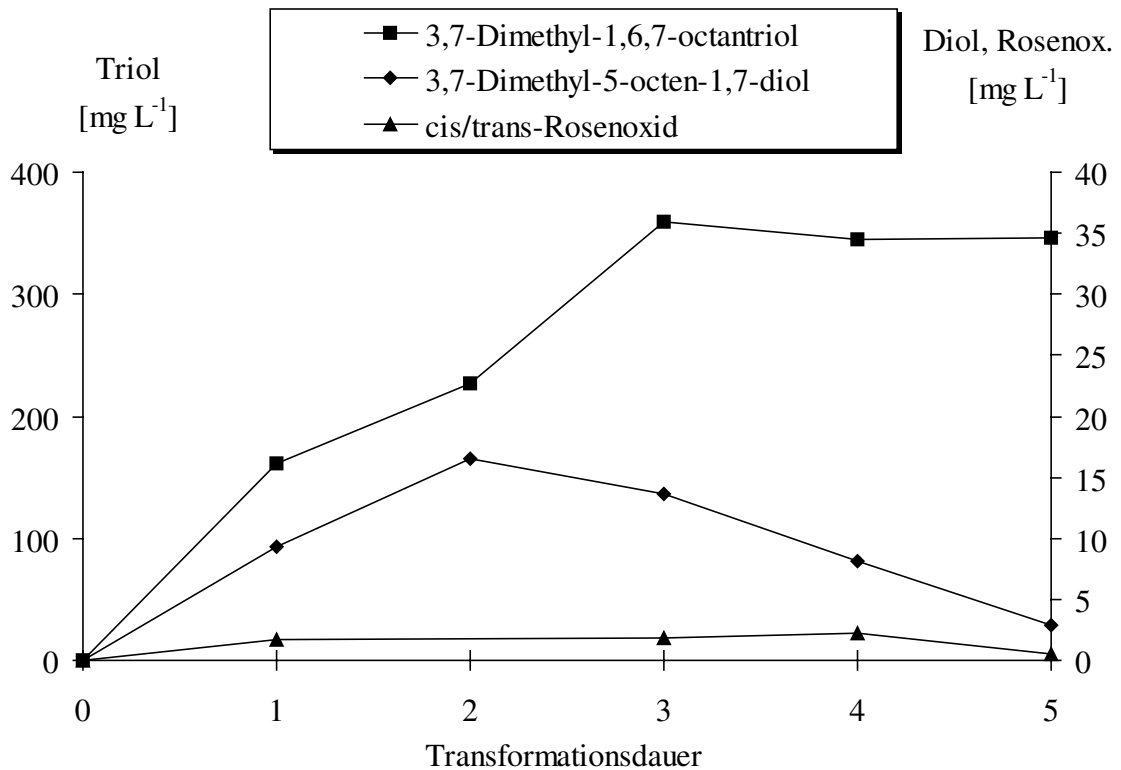
24 h nach der ersten Citronellolzugabe waren die positiven Effekte noch deutlich vorhanden (Abb. 2-115), wenn auch die Gesamttrockenmasse aufgrund der Substrattoxizität bereits abgenommen hatte. Der negative Effekt des Peptons konnte hier nicht bestätigt werden. Besonders der positive Effekt von Calcium trat nach Beginn der Biotransformation noch deutlicher hervor als zuvor.

Nun war es interessant festzustellen, inwieweit die Effekte auf die Trockenmasse parallel zu den Effekten auf die Produktbildung verliefen.

In diesem Transformationsversuch wurde eine geringere Citronellolmenge zugesetzt als in den vorigen Versuchen, um Toxizitätsprobleme zu minimieren. Dadurch war die Produktbildung in diesem Ansatz fast vollständig zum Triol hin verschoben, und daneben war eine geringe Menge des 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diols (**6**) vorhanden. Rosenoxid wurde kaum gebildet und konnte daher für die Auswertung des Versuches nicht herangezogen werden.

Der Umsatz des Citronellols erfolgte in dieser Kultivierung außerordentlich schnell. Das Citronellol wurde innerhalb von 72 h nach der ersten Substratzugabe nahezu vollständig umgesetzt (im Medium nur noch  $<5 \text{ mg L}^{-1}$  nachweisbar). Abb. 2-113 zeigt den Transformationsverlauf in einer Kultur, die zeitlich parallel zum Plackett-Burman-Design, jedoch *im SNLH-Medium*, geführt wurde.

Unter Vernachlässigung des Myzelvolumens entsprach die gebildete Triolmenge von  $1,89 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $359 \text{ mg L}^{-1}$ ) einer Umsatzrate von 86% zum Triol (theoretisch max.  $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



**Abb. 2-113:** Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (SNLH-Medium)

Die *Triolbildung*, ausgewertet nach 24 h Transformationszeit (Abb. 2-116), wurde von keinem der eingesetzten Medienbestandteile in dem eingesetzten Konzentrationsbereich deutlich positiv beeinflusst. Bei Calcium war ein positiver Effekt von  $27 \text{ mg L}^{-1}$  feststellbar, der damit jedoch im Bereich der Dummyvariablen lag.

Negative Effekte waren etwas deutlicher: Malzextrakt, Asparagin, Universalpepton und Natrium wirkten sich eher negativ auf die Triolbildung aus.

Berechnet man die Ergebnisse nicht als Konzentrationen im Medium, sondern normiert auf 1 g Kulturtrockenmasse, so erhält man *spezifische* Effekte, bei denen dann Trockenmasseunterschiede nicht mehr ins Gewicht fallen (Abb. 2-117).

Die negativen Effekte waren ähnlich wie bei den nicht-normierten Werten. Der leicht positive Effekt des Calciums wurde hier jedoch nicht mehr festgestellt. Der positive Effekt des Calciums war also folglich auf das verbesserte Wachstum bzw. die verringerte terpenbedingte Schädigung der Kulturen zurückzuführen (vgl. Abb. 2-115), wäh-

rend die festgestellten negativen Effekte (Malzextrakt, Asparagin, Universalpepton und Natrium) unabhängig von der Trockenmasse zu einer Verringerung der Transformationsaktivität führten.

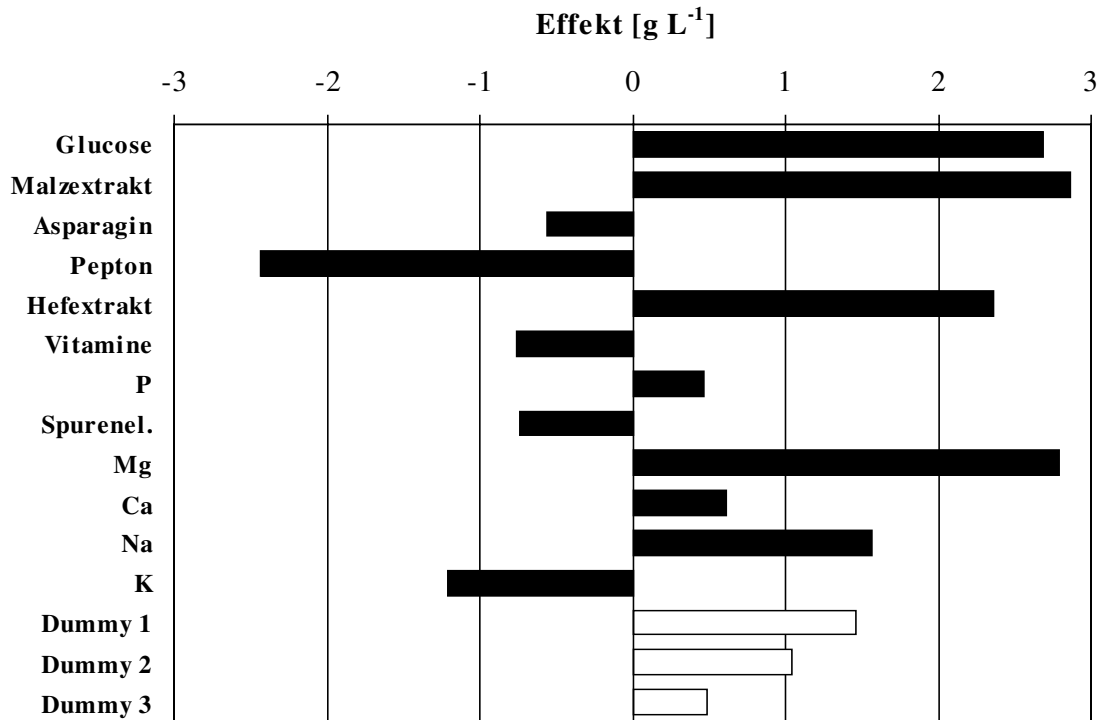
Die Bildung des Diols (**6**) wurde durch eine Reihe von Parametern leicht positiv beeinflusst (Abb. 2-118), die Gesamtkonzentration blieb jedoch auf niedrigem Niveau (Mittelwert:  $9,1 \text{ mg L}^{-1}$  nach 24 h). Auch hier fiel der positive Effekt des Calciums auf, während die Effekte von Pepton, Hefeextrakt, Vitaminen, Phosphat, Spurenelementen und Magnesium weniger deutlich waren. Natrium hatte auch bezüglich der Diolbildung einen deutlich negativen Effekt.

Die Normierung auf die Trockenmasse (Abb. 2-119) führte zu einem ähnlichen Ergebnis, wie bei der Triolbildung: Der Calcium-Effekt ging zurück, während die anderen Effekte sich kaum veränderten, also nicht auf Trockenmasseunterschiede zurückzuführen waren.

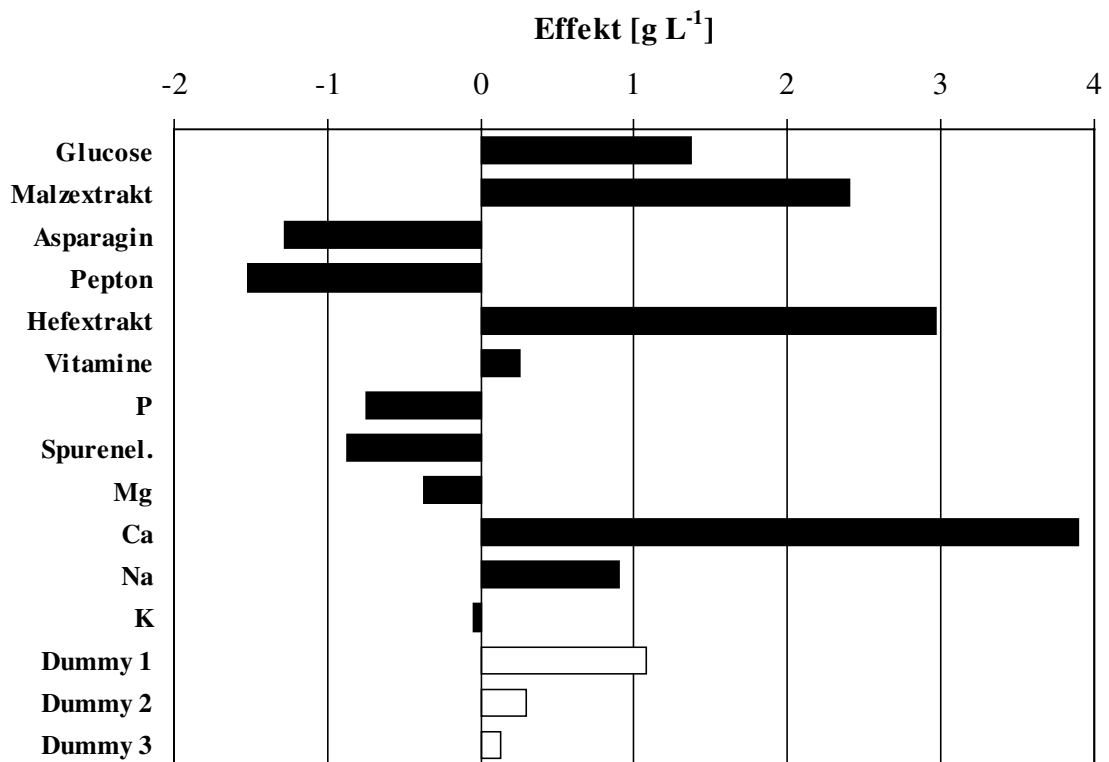
In den dargestellten Diagrammen (Abb. 2-114 bis 2-119) waren – wie oben erläutert – einige positive und negative Effekte feststellbar, die sich deutlich von den Effekten der drei Dummy-Variablen unterschieden.

Trotzdem war für keinen der 12 Medienparameter eine statistische Signifikanz eines Effektes auf Trockenmasse, Diol- oder Triolbildung mittels F-Test [33] sicher nachweisbar, da die Dummy-Variablen bereits deutliche Schwankungen aufwiesen.

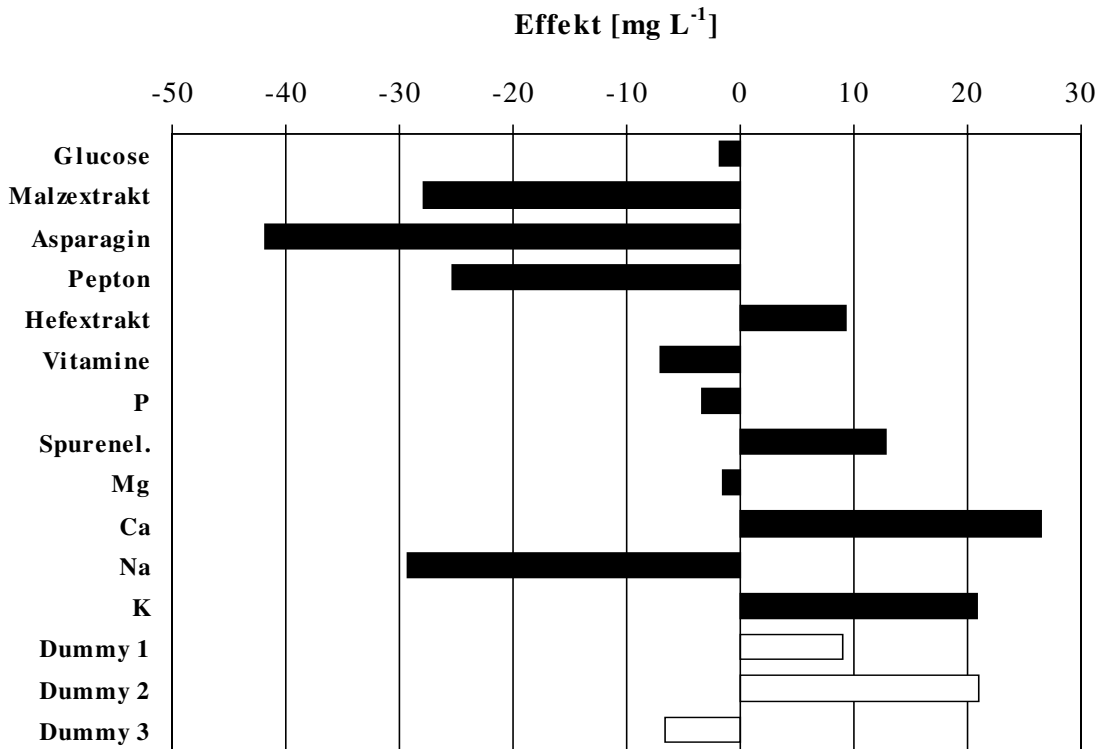
Für die Dummies müßten im Idealfall die Effekte = 0 sein. Gründe für die Abweichung von 0 können Kombinationseffekte verschiedener Medienbestandteile sein, die bei der Erstellung des Plackett-Burman-Designs nicht beachtet werden und daher zu Störungen führen können, wenn sie sich in den gewählten Faktorkombinationen nicht mehr vollständig nivellieren.



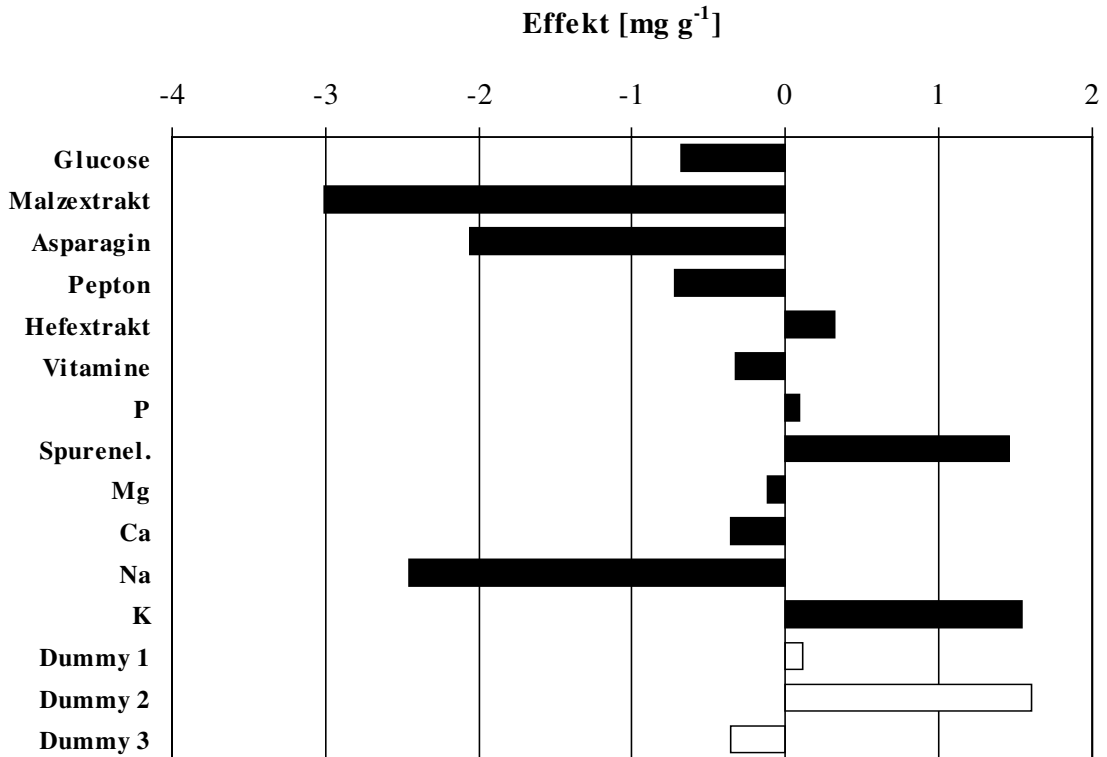
**Abb. 2-114:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Pilztrockenmasse *vor Citronellolzugabe* (2,5 Tage Kulturdauer, mittlere Trockenmasse: 21,7 g L<sup>-1</sup>)



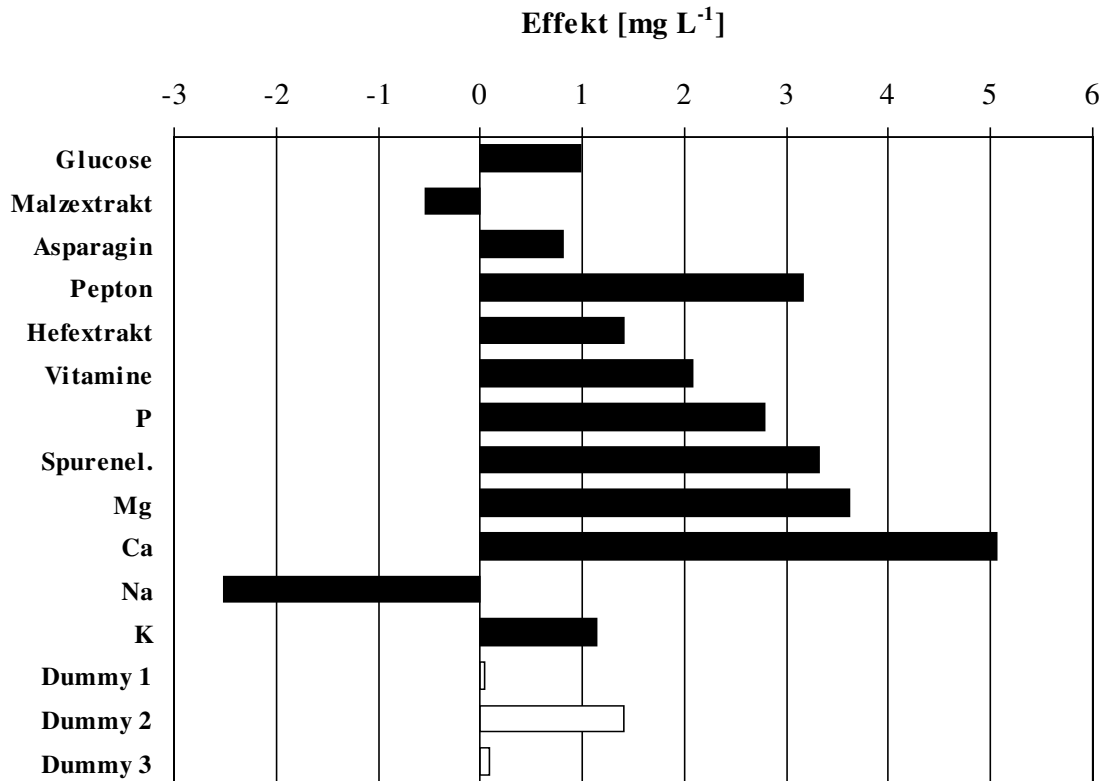
**Abb. 2-115:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Pilztrockenmassebildung *nach der ersten Citronellolzugabe* (3,5 Tage Kulturdauer, mittlere Trockenmasse: 15,5 g L<sup>-1</sup>)



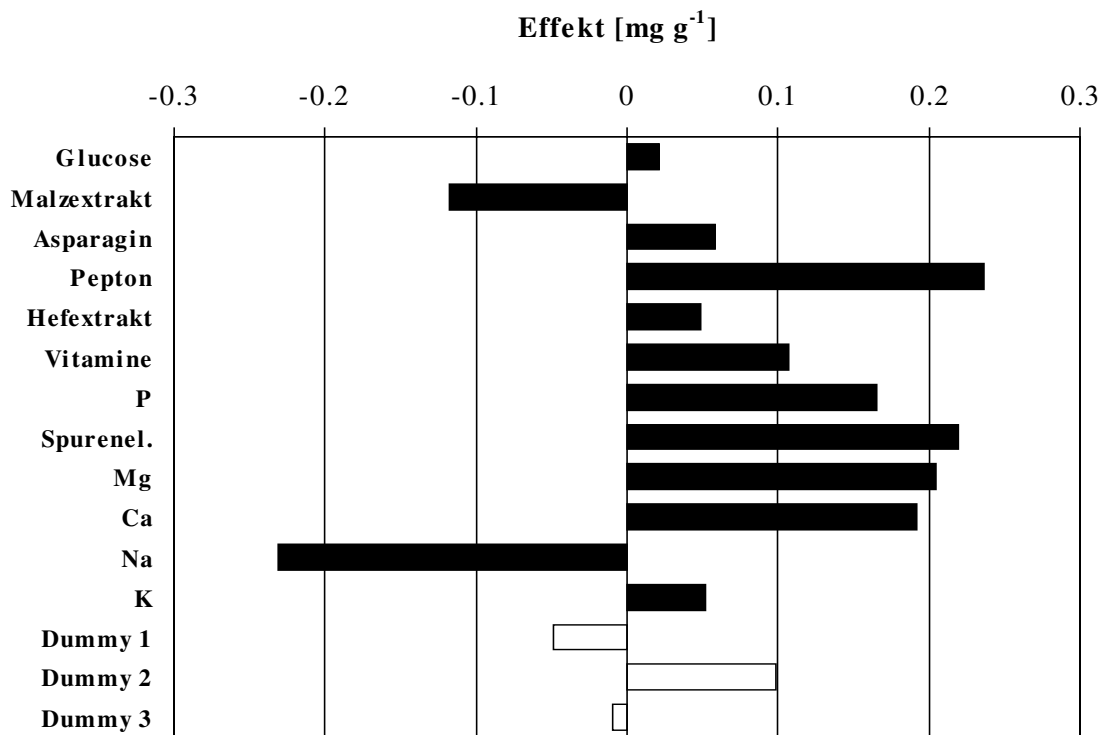
**Abb. 2-116:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) nach 24 h Transformationszeit (mittlerer Gehalt im Medium: 110,3 mg L<sup>-1</sup>)



**Abb. 2-117:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die trockenmassennormierte Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) nach 24 h Transformationszeit (mittlerer normierter Gehalt 7,29 mg g<sup>-1</sup>)



**Abb. 2-118:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die Bildung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) nach 24 h Transformationszeit (mittlerer Gehalt im Medium:  $9,1 \text{ mg L}^{-1}$ )



**Abb. 2-119:** Plackett-Burman-Design: Einfluß der Medienvariation auf die trockenmassennormierte Bildung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) nach 24 h Transformationszeit (mittlerer normierter Gehalt  $0,60 \text{ mg g}^{-1}$ )

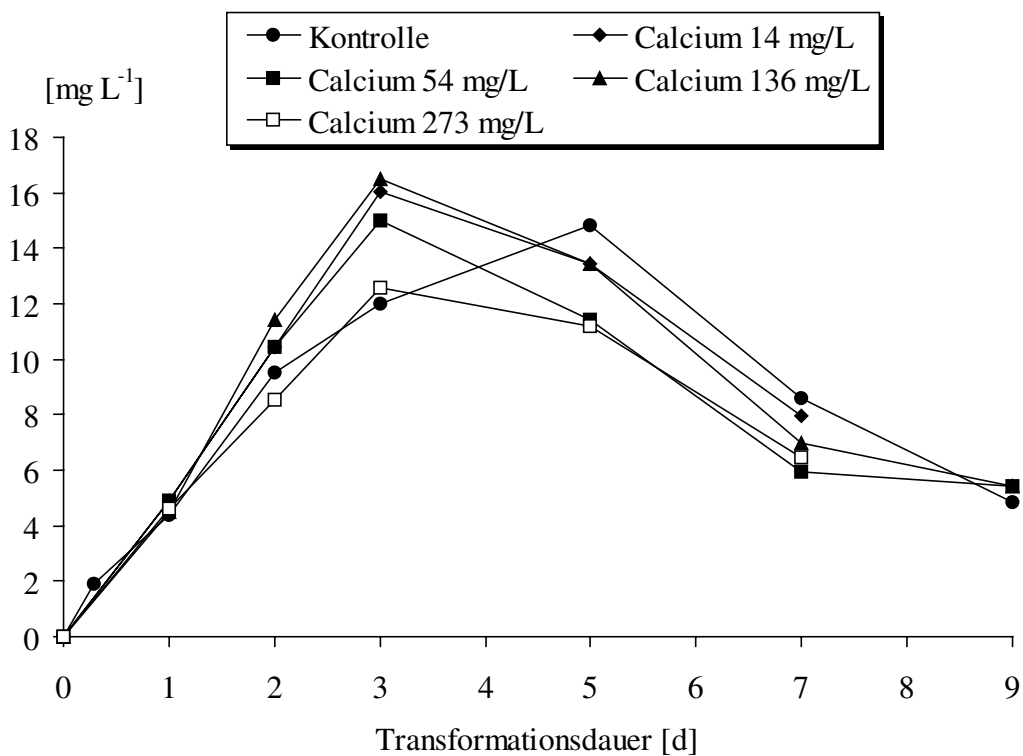


### 2.2.5.2 Transformation bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

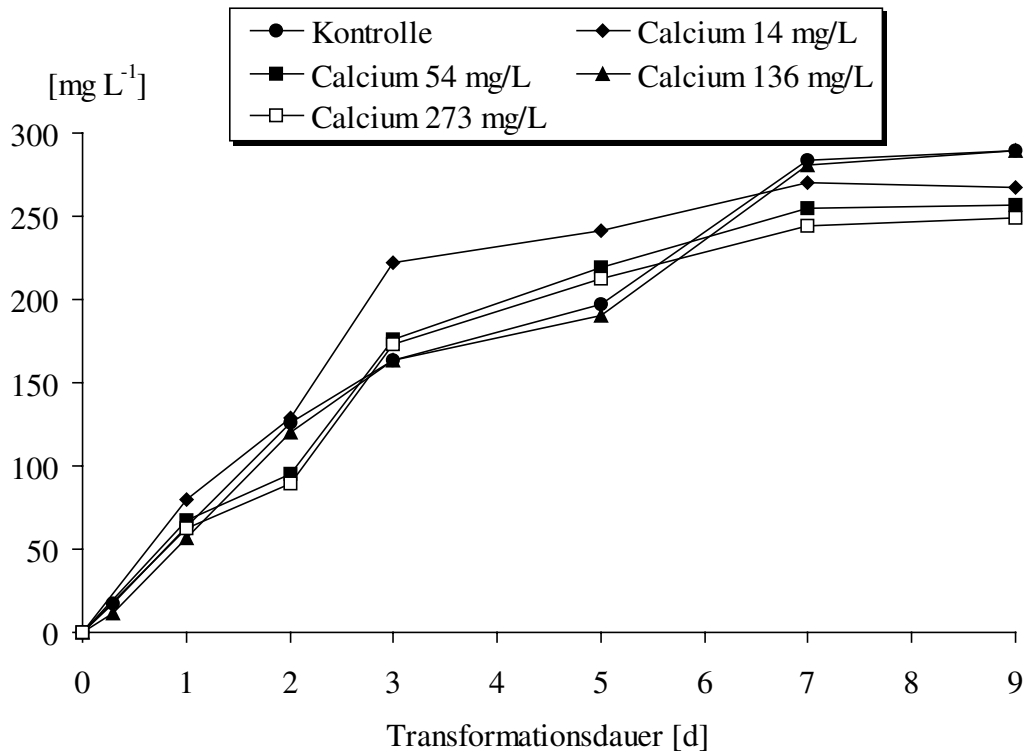
Der Design-Versuch zeigte einen möglichen positiven Einfluß von Calcium auf die Bildung des Rosenoxid-Precursors 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**). Um die Signifikanz dieses Einflusses zu überprüfen, wurde eine Citronellol-Transformation mit verschiedenen Calciumgehalten im Medium durchgeführt.

Abb. 2-120 zeigt, daß bei Calciumgehalten von 14, 54 und 136 mg L<sup>-1</sup> das Maximum der Diolkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (SNLH-Medium) und zu der Kultur mit dem höchsten Ca-Gehalt (273 mg L<sup>-1</sup>) einen Tag eher erreicht wurde, signifikante Effekte lassen sich daraus jedoch nicht ableiten.

Ein Einfluß des Ca-Zusatzes auf die Triolbildung konnte nicht festgestellt werden (Abb. 2-121).



**Abb. 2-120:** Bildung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) durch *C. carcharias* bei verschiedenen Ca-Konzentrationen



**Abb. 2-121:** Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) durch *C. carcharias* bei verschiedenen Ca-Konzentrationen

### 2.2.5.3 Durchführung der Biotransformation in Transformationsmedien

Transformationsmedien enthalten neben einem Puffersystem zur Einstellung des pH-Wertes noch die für die Biotransformation notwendigen Substrate. Für diesen Versuch wurde ein Phosphatpuffer (20 mmol L<sup>-1</sup>) mit pH 7,3 (zur Verbesserung der Stabilität des bei der Transformation gebildeten Epoxids) verwendet. Verglichen wurde die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* in einem glucosefreien, einem glucosehaltigen und in einem glucose- und hefeextrakthaltigen Phosphatpuffer. Außerdem wurde untersucht, ob auch im myzelfreien Medium der 2,5 Tage alten Kulturen ein Umsatz stattfindet. Als Kontrolle wurde ein Standardansatz im SNLH-Medium parallel geführt. Die Zellmasse für die Transformationsmedien wurde durch 2,5-tägiges Wachstum in SNLH-Medium und nachfolgendes Abtrennen und Waschen gewonnen. Die geerntete Zellmasse wurde dann in die verschiedenen Transformationsmedien überführt.

Eine Triolbildung (Abb. 2-122 oben) war sowohl im myzelfreien Medium (2,5 Tage altes Kulturmedium nach Abtrennung des Myzels) als auch im glucosefreien Phosphatpuffer (Anfangs-pH-Wert 7,3) kaum feststellbar. Bei Zusatz von Glucose bzw. Glucose und Hefeextrakt fand eine deutliche Produktbildung statt, die jedoch langsamer verlief und eine um etwa 30% geringere Maximalkonzentration erreichte als die Kontrolle, obwohl in allen Kulturen auch zum Ende der Transformationsdauer noch Glucose im Medium vorhanden war (Werte nicht dargestellt).

Die Epoxidkonzentration (Abb. 2-122 unten) war in den glucosehaltigen Transformationsmedien im Vergleich zur Wachstumsmedium (pH 4,5-5,0) dagegen um etwa 60% höher. Dies ist auf einen zu erwartenden pH-Wert-Effekt zurückzuführen.

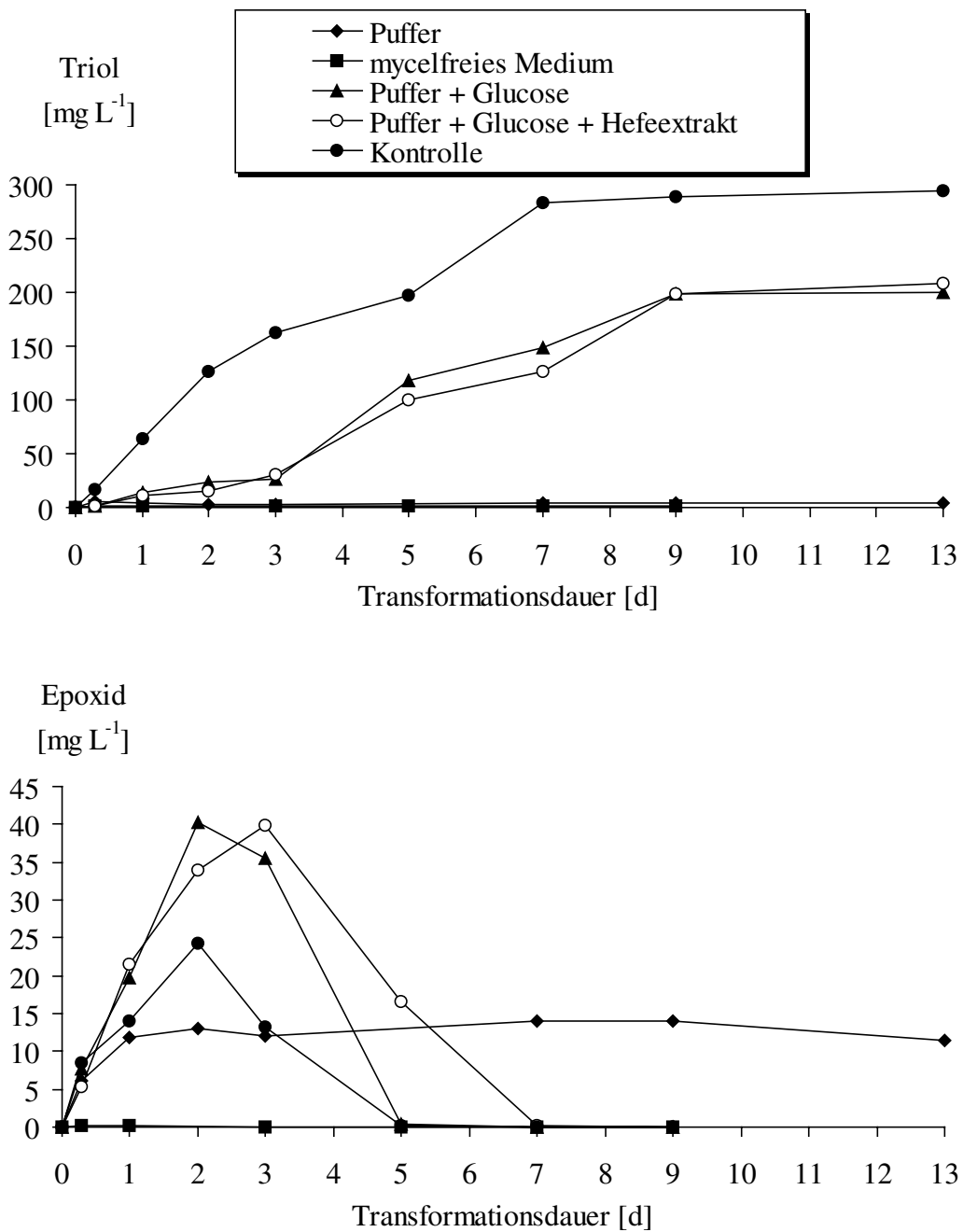
Für das Diol (Abb. 2-123 oben) entsprachen die Ergebnisse denen für das Triol.

Eine Betrachtung des pH-Verlaufes in den Transformationsansätzen (Abb. 2-123 unten) zeigt, daß in den glucosehaltigen Transformationsmedien eine Angleichung des pH-Wertes vom Anfangs-pH 7,3 an den für diesen Pilz im Wachstumsmedium normalen pH-Wert von 4,0-5,0 auftrat.

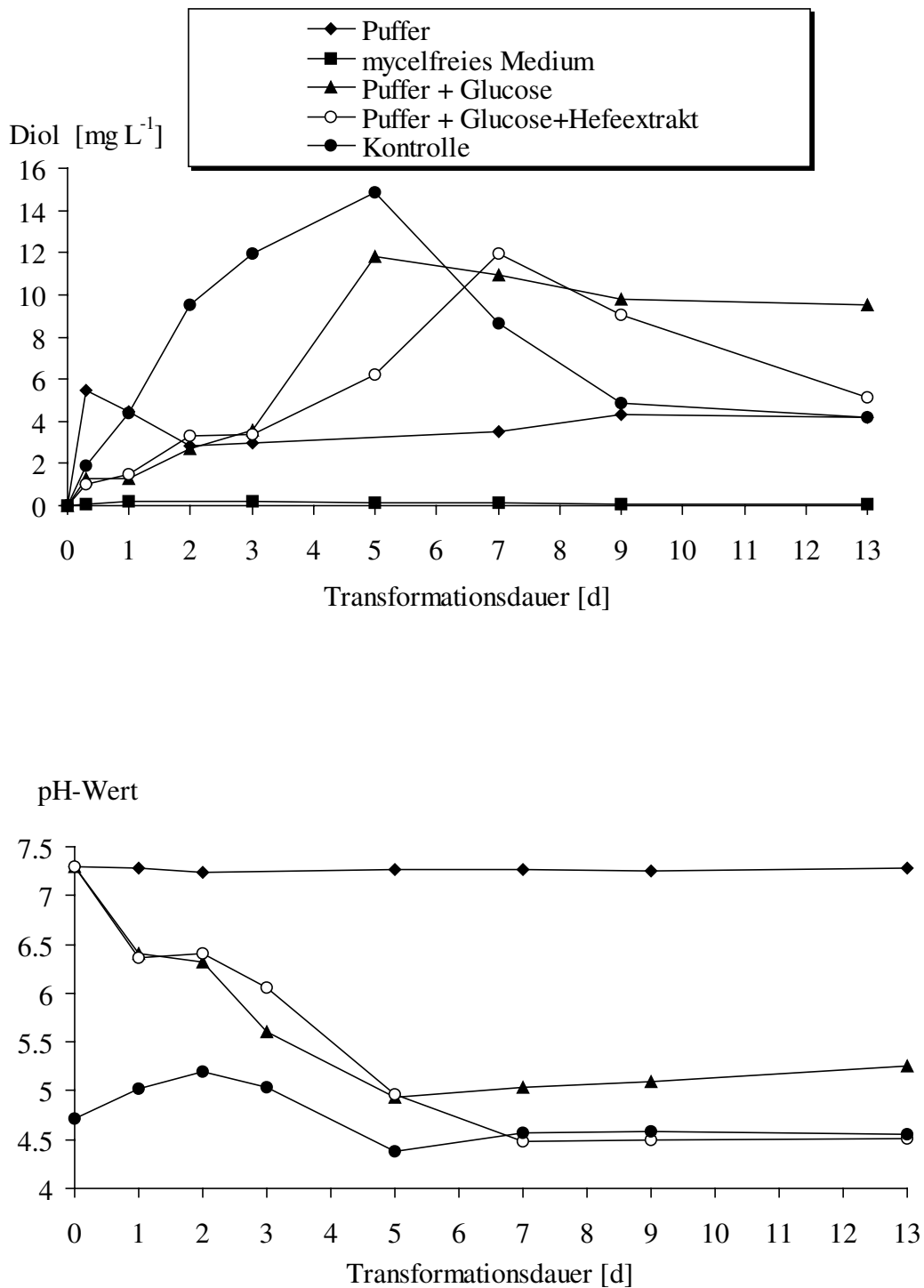
Der Zusatz von Hefeextrakt als komplexer Vitamin- und auch N-Quelle führte nicht zu einer Verbesserung der Eigenschaften der Transformationsmedien.

Daraus ergab sich, daß die Durchführung der Biotransformation in einfachen Pufferlösungen unter Zusatz von Glucose als C-Quelle ohne weiteres möglich ist, jedoch mit einer geringeren Umsatzgeschwindigkeit und einem niedrigeren Produktmaximum einhergeht.

In myzelfreiem Medium wurde kein Citronellol umgesetzt. Auch wenn durch die Entfernung der Zellmasse die Bereitstellung von Coenzymen für Exoenzyme im Kulturmedium in diesen Ansätzen nicht mehr stattfinden konnte, so wäre doch zumindest direkt nach Substratzusatz eine geringe Produktbildung zu erwarten gewesen, wenn Exoenzyme beteiligt wären. Dies belegt die Beteiligung zellgebundener Enzyme an der Transformation von Citronellol durch *C. carcharias*.



**Abb. 2-122:** Bildung von Triol (9) und Epoxid (4) aus Citronellol durch *C. carcharias* in verschiedenen Transformationsmedien und myzelfreiem Wachstumsmedium

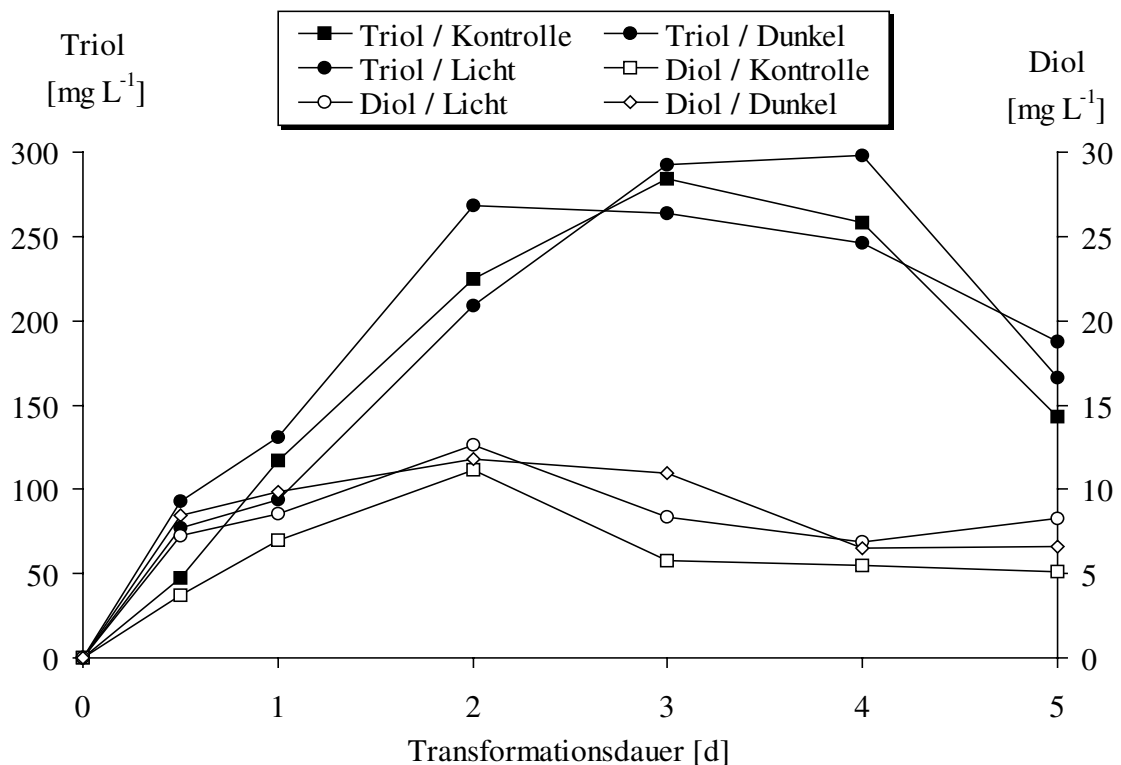


**Abb. 2-123:** Bildung von Diol (6) aus Citronellol *C. carcharias* in verschiedenen Transformationsmedien und mycelfreiem Wachstumsmedium sowie pH-Verlauf

#### 2.2.5.4 Lichteinfluß

Wie bei der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch verschiedene Basidiomyceten wurde auch bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* untersucht, ob die Produktbildung von Art und Dauer der Kulturbelichtung abhängig ist.

Dazu wurden die Dunkelkulturen ohne jegliche Belichtung, Lichtkulturen mit 14-stündiger täglicher Belichtungsdauer (UV-A) und Kontrollkulturen mit natürlichem Hell-Dunkel-Wechsel miteinander verglichen.



**Abb. 2-124:** Untersuchung des Lichteinflusses auf die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* (Licht = 14 h d<sup>-1</sup> UV-A-Belichtung)

Wie Abb. 2-124 zeigt, war ein Einfluß der Belichtung auf die Bildung von 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**) und von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) nicht festzustellen. Die UV-A-Belichtung zeigte allenfalls auf die Triolbildung einen geringen negativen Effekt.

Auch in diesem Versuch wurde das eingesetzte Citronellol (2,2 mmol L<sup>-1</sup>) mit 72% Umsatz sehr effektiv zum Triol (im Maximum 300 mg L<sup>-1</sup> = 1,58 mmol L<sup>-1</sup>) umgesetzt; der Umsatz zum Diol (max. 12,6 mg L<sup>-1</sup> = 0,073 mmol L<sup>-1</sup>) betrug dagegen nur 3,3%.

### 2.2.5.5 Zusatz von Cytochrom-P 450-Monooxygenase-Inhibitoren

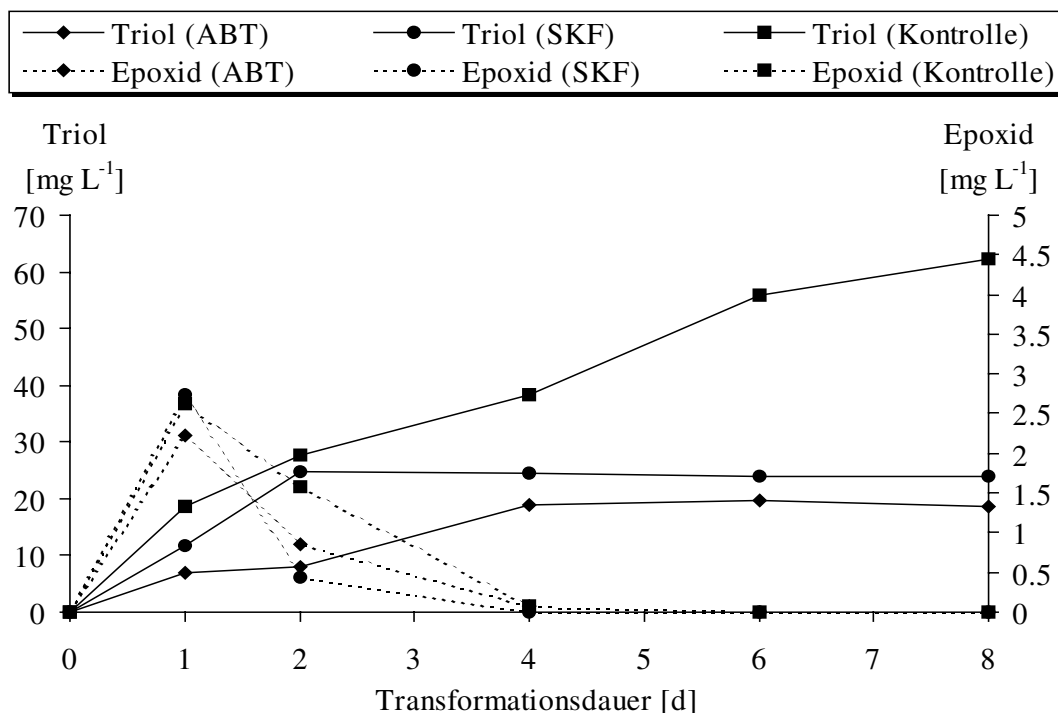
1-Aminobenzotriazol (=ABT) und SKF-525 A (=SKF) sind als Cytochrom-P450-Monooxygenase-Inhibitoren bei höheren Pilzen bekannt [34].

Sie wurden Kulturen von *C. carcharias* zu Transformationsbeginn gemeinsam mit dem Substrat (Citronellol) in einer Konzentration von  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  zugesetzt.

Die Triolbildung wurde durch beide Inhibitoren im Vergleich zum inhibitorfreien Kontrollwert deutlich vermindert (Abb. 2-125): Bei SKF war die Triolbildung nach 2 Tagen beendet und bei ABT nach 4 Tagen. Die erreichte Konzentration lag nach 8 Tagen bei etwa 30% der Konzentration im Kontrollwert. Im Gegensatz zu den inhibierten Kulturen war die Produktbildung in der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet.

Die Bildung des Epoxids als primärem Oxidationsprodukt der beteiligten oxygenierenden Enzyme war in allen Ansätzen nur gering, so daß signifikante Unterschiede zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Kulturen nicht feststellbar waren.

Da bei den niedrigen pH-Werten im Medium (pH 3,5-4,5) eine sofortige Hydrolyse des gebildeten Epoxids zum Triol abläuft, war das Triol zur Beurteilung einer hemmenden Wirkung der eingesetzten spezifischen Hemmstoffe geeignet. Folglich konnte eine Beteiligung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen an der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* als sehr wahrscheinlich angenommen werden.



**Abb. 2-125:** Wirkungen der Cytochrom-P450-Inhibitoren 1-Aminobenzotriazol und SKF-525 A auf die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias*

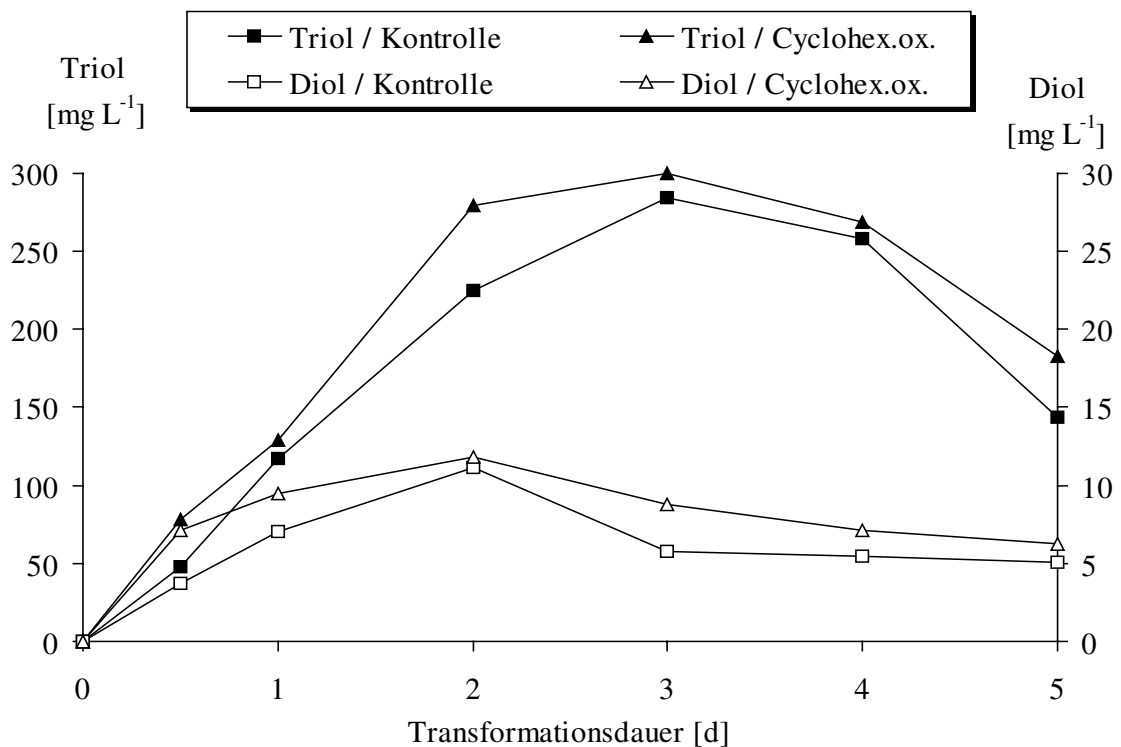
### 2.2.5.6 Zusatz eines Epoxid-Hydrolase-Inhibitors

Während in den ersten Transformationsversuchen mit *C. carcharias* größere Mengen des Epoxides (**4**) als Produkte auftraten (s. 2.2.3), wurde bei allen weiteren Versuchen das Triol (**9**) als Hauptprodukt gebildet. Dies legte die Vermutung nahe, daß in den späteren Versuchen eine Epoxid-Hydrolase-Aktivität in dem Pilz vorhanden war.

Der Zusatz eines effektiven Hydrolase-Inhibitors wäre eine Möglichkeit, um die Bildung des Triols aus dem Epoxid zu hemmen und so die Beteiligung einer Hydrolase an der Triolbildung zu belegen.

Von Säugetierleber-Microsomen ist bekannt, daß *Cyclohexenoxid* ein effektiver Inhibitor für Epoxid-Hydrolasen ist [35], wenn es in gleicher Menge wie das Substrat eingesetzt wird.

Für das Inhibitor-Experiment wurden Kulturen von *C. carcharias* nach 2,5 und 3,5 Kulturtagen mit je 0,11 mmol Citronellol und 0,11 mmol Cyclohexenoxid pro 100 mL Kultur versetzt. Wie Abb. 2-126 zu entnehmen ist, wurde die Produktbildung durch Cyclohexenoxid jedoch nicht gehemmt. Eher war in den Kulturen mit Zusatz von Cyclohexenoxid eine leichte Erhöhung der Transformationsgeschwindigkeit festzustellen.



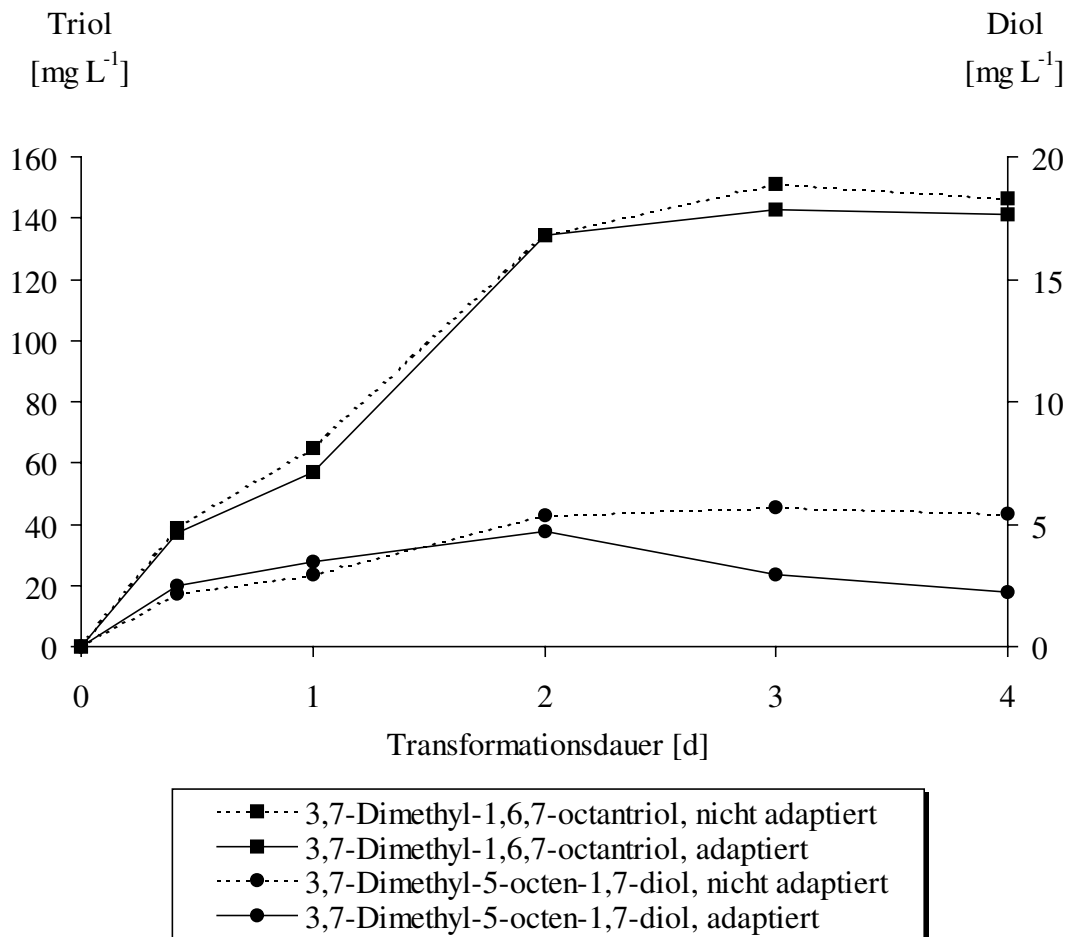
**Abb. 2-126:** Untersuchung des Einflusses von Cyclohexenoxid auf die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias*



### 2.2.5.7 Beeinflussung der Transformationsleistung durch Substratadaption der Vorkulturen

Um zu klären, ob die vollständige Verschiebung des Produktbildungsgleichgewichtes zum Triol (**9**) hin auf einen Induktions- oder Adaptionseffekt zurückzuführen sein könnte, wurden citronellol-adaptierte und nicht-adaptierte Vorkulturen geführt und deren Transformationsleistungen verglichen.

Es ergab sich (s. Abb. 2-127), daß die Transformationsgeschwindigkeit und die maximalen Konzentrationen in adaptierten und nichtadaptierten Kulturen annähernd gleich waren, sowohl bezüglich der Triol- als auch der Diolbildung. Ein Adaptionseffekt auf die Transformation war demzufolge bei diesem Pilz nicht feststellbar.



**Abb. 2-127** Vergleich der Citronellol-Transformation durch adaptierte und nicht-adaptierte Kulturen von *C. carcharias*

#### 2.2.5.8 Abhängigkeit der Transformationsleistung von der eingesetzten Substratmenge

Aufgrund der Toxizität hat die eingesetzte Substratmenge großen Einfluß auf Terpen-Transformationen durch Basidiomyceten. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden Kulturen von *C. carcharias* Mengen von 0,22 bis 2,2 mmol Citronellol pro 100 mL Kulturvolumen zugegeben.

Abb. 2-128 (Triol) und Abb. 2-129 (Diol) zeigen, daß alle Mengen über 0,22 mmol pro 100 mL (=343 mg L<sup>-1</sup>) zu einer starken Verminderung der Transformationsleistung führten.

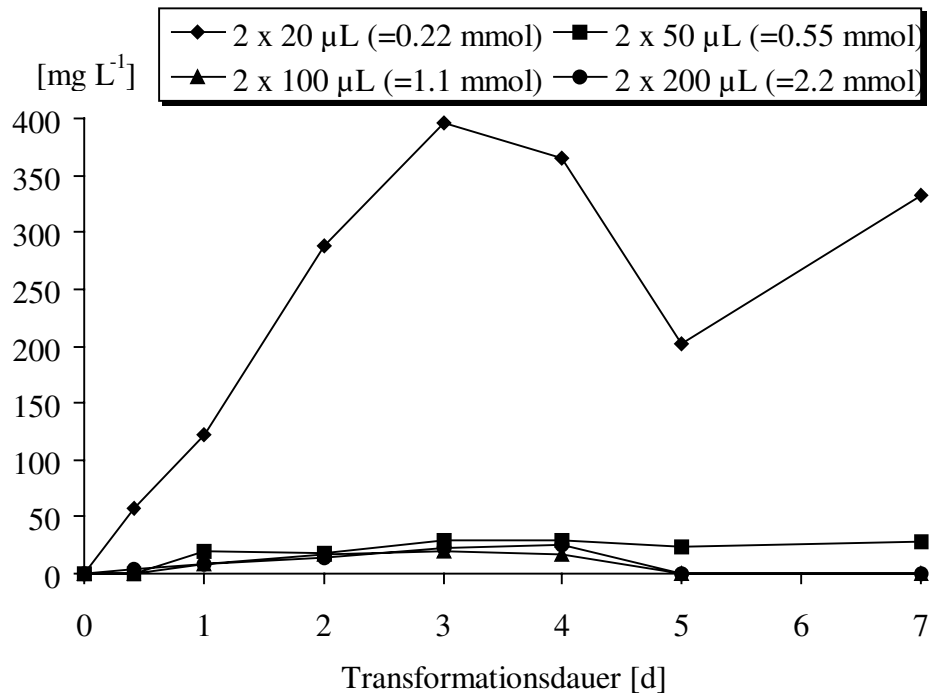
Die niedrigen Produktkonzentrationen bei den größeren Substratmengen stimmen mit den bei den ersten Versuchen (1 x 50 µL Citronellol = 0,275 mmol) erhaltenen Produktkonzentrationen gut überein. Die hohen Triolbildungsraten in den meisten der bisher beschriebenen Versuche waren folglich auf die im Vergleich zu den ersten Citronellol-Transformationen verringerte Substratmenge zurückzuführen.

Wie Abb. 2-130 zeigt, war die Rosenoxidbildung in allen Kulturen mit durchschnittlich 2 mg L<sup>-1</sup> in etwa gleich gering.

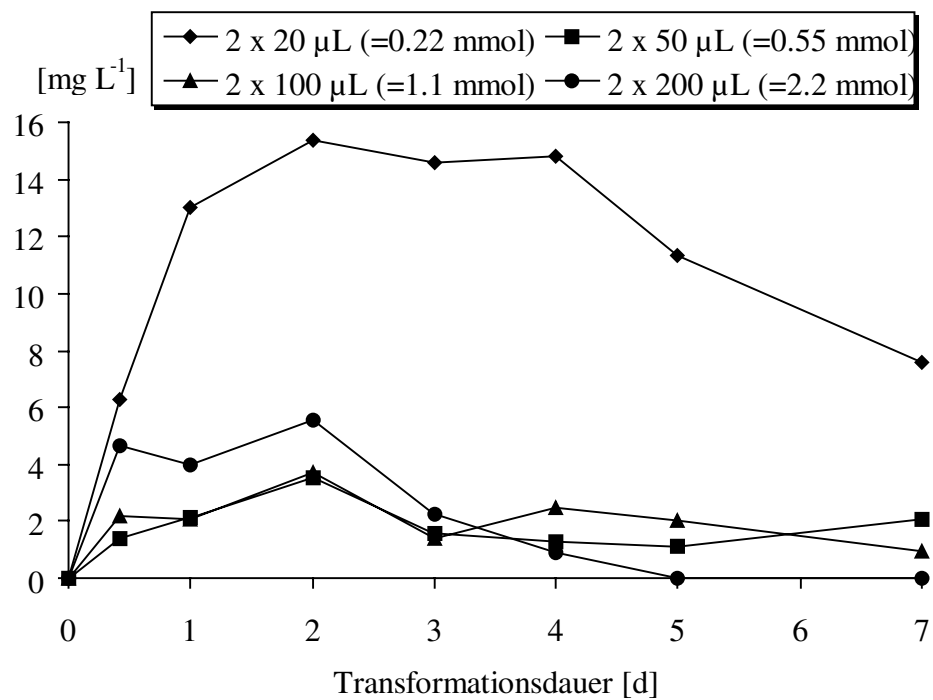
Citronellol bewirkte bei *C. carcharias*, ähnlich wie die Monoterpenkohlenwasserstoffe bei den in Abschnitt 2.1 beschriebenen Basidiomyceten, eine Wachstumshemmung (s. Abb. 2-131). Bei den Kulturen mit der höchsten Transformationsleistung und der niedrigsten Substratdosierung (2 x 20 µL pro 100 mL Kulturvolumen) trat dieser fungistatische Effekt ebenfalls auf, im Gegensatz zu den höheren Dosierungen nahm die Trockenmasse jedoch nicht ab, sondern blieb konstant und nahm am Ende der Transformation, nach Metabolisierung des Citronellols, leicht wieder zu.

Bei allen höherdosierten Kulturen führt die Schädigung der Zellen zu einer stetigen Abnahme der Trockenmasse.

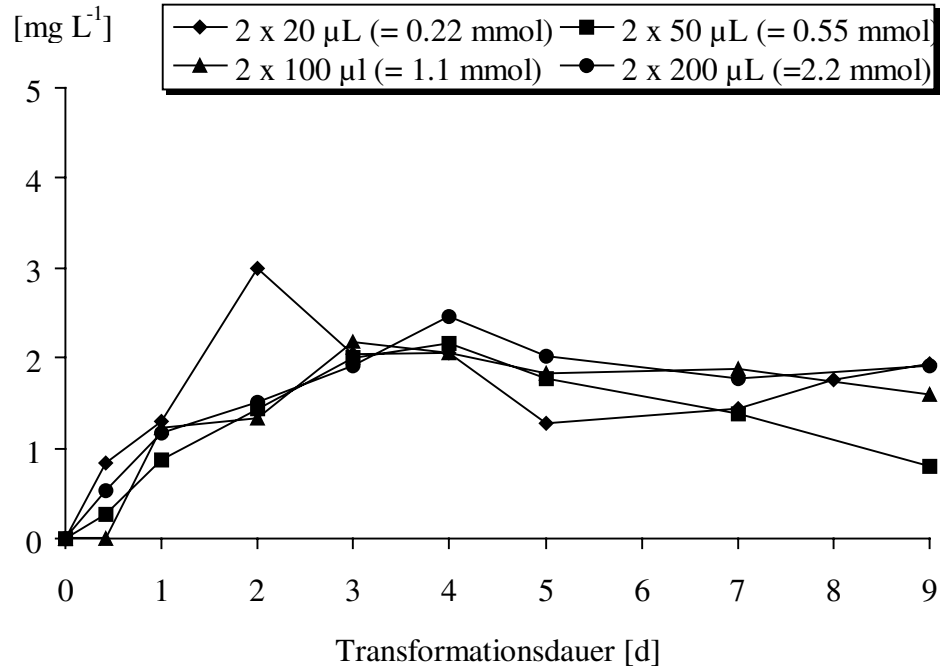
Ein Wachstum unter Zusatz von Citronellol war nur bei Dosierung über die Gasphase festzustellen (vgl. Abb. 2-111). Nachteil dieser Methode war jedoch, daß keine nennenswerte Produktakkumulation stattfand (Abb. 2-110), da die gebildeten Produkte (vor allem das Triol) aufgrund des fortgesetzten Pilzwachstums wahrscheinlich schnell weiter abgebaut wurden.



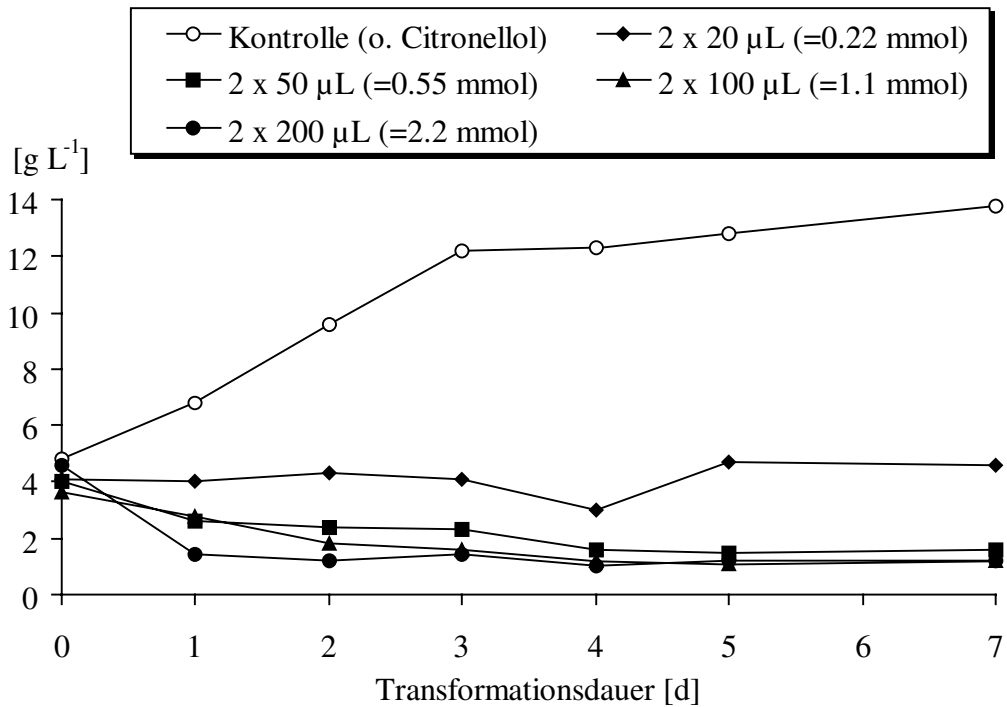
**Abb. 2-128:** Triolbildung durch *C. carcharias* bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen (bezogen auf 100 mL Kulturvolumen)



**Abb. 2-129:** Diolbildung durch *C. carcharias* bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen (bezogen auf 100 mL Kulturvolumen)



**Abb. 2-130** Rosenoxidbildung durch *C. carcharias* bei Zusatz unterschiedlicher Citronellolmengen (bezogen auf 100 mL Kulturvolumen).



**Abb. 2-131:** Trockenmassen von *C. carcharias* im Verlauf der Citronellol-Transformation mit verschiedenen Substratmengen

### 2.2.5.9 Variation der Zeitpunkte der Substratzugabe

Die Aktivität der an der Terpenttransformation beteiligten Enzyme verändert sich im Verlauf der Kultivierung. Üblicherweise werden Terpenttransformationen mit wachsenden Kulturen durch Substratzugabe gestartet, wenn sich die Kultur zwischen Mitte und Ende der Trophophase befindet (vgl. 2.1.9.1.2).

Die Transformationsleistung und das Produktspektrum ist möglicherweise davon abhängig, in welchem Kulturalter die Transformation durch Zugabe des Terpensubstrates gestartet wird.

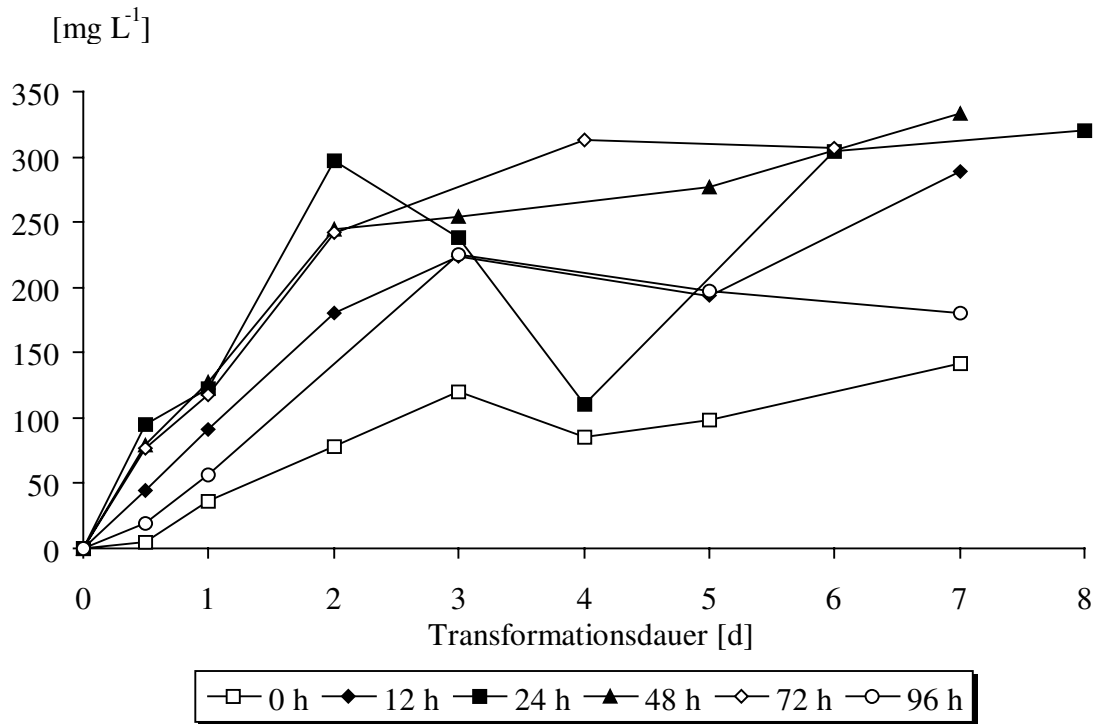
Daher wurde Kulturen von *C. carcharias* zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 48, 72 und 96 h nach Inokulation die erste Citronelloldosis von 0,11 mmol (20 µL pro 100 mL) und jeweils 24 h später erneut die gleiche Menge Citronellol zugegeben.

Die Bildung des Triols (**9**) (Abb. 2-132) war bei einem Transformationsbeginn 48 und 72 h nach Inokulation am günstigsten, während ein Beginn nach 0, 12 und 96 h zu einem deutlichen Verlust bei der Transformationsgeschwindigkeit in den ersten 3 Kulturtagen sowie bei der maximalen Produktkonzentration führte. Der Transformationsverlauf beim Diol (**6**) war den Ergebnissen des Triols (**9**) analog (s. Abb. 2-133).

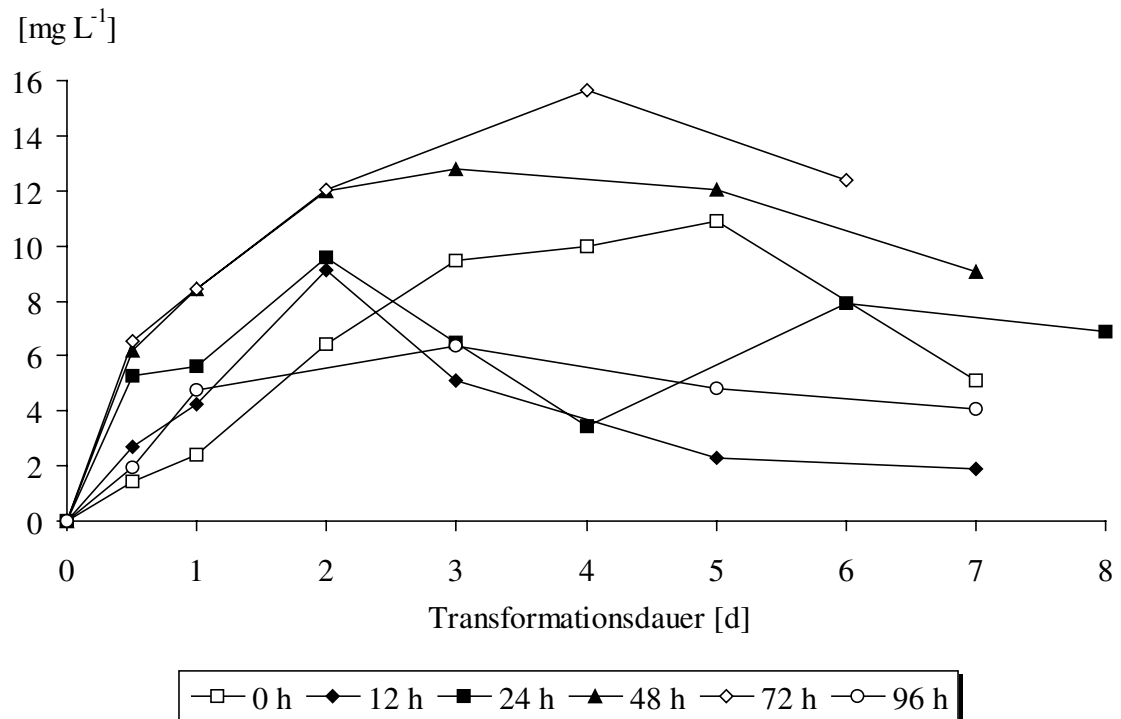
Aus den verschiedenen Kulturverläufen fiel jedoch die 24 h-Kultur deutlich heraus: Die Produktkonzentration im Kulturmedium durchlief hier zunächst 2 Tage nach Transformationsbeginn ein Maximum, nach 4 Tagen ein Minimum und stieg danach wieder an, bis beim Triol die Konzentration nach 6 Tagen sogar höher ist als im Maximum (nach 2 Tagen) war.

Der Effekt, daß nach einem Konzentrationsminimum die Produktkonzentration wieder anstieg, trat in abgeschwächter Form beim 0 h- und 24 h-Wert sowie schon in einer der ersten Versuchsreihen (vgl. 2.2.3.1, Abb. 2-108) auf.

In den Versuchen mit hoher Transformationsleistung wurde die Kultivierung nach Durchlaufen des ersten Produktmaximums (nach 2-3 Tagen Transformationsdauer) nur für 1-2 Tage fortgeführt (Gesamttransformationszeit: 4-5 Tage). Ein erneuter Konzentrationsanstieg wäre aber wahrscheinlich erst in den darauf folgenden Tagen aufgetreten. Ergebnis dieser Untersuchung war, daß der gewählte Zeitpunkt der Substratzugabe einen Einfluß auf die Transformation hatte, der in allen bisherigen Versuchen gewählte Zeitpunkt von 2,5 Tagen (= 60 h) aber im günstigsten Bereich lag.



**Abb. 2-132:** Triolbildung aus Citronellol durch *C. carcharias* bei unterschiedlichen Zeitpunkten der ersten Substratzugabe (Angaben in [h] nach der Inokulation)



**Abb. 2-133:** Diolbildung aus Citronellol durch *C. carcharias* bei unterschiedlichen Zeitpunkten der ersten Substratzugabe (Angaben in [h] nach der Inokulation)

### **Teilzusammenfassung 2.2.5:**

- Die Variation der Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, Licht, Adaption der Vorkulturen) brachte sowohl hinsichtlich der Zielprodukte Diol (**6**) und Rosenoxid (**1**) als auch hinsichtlich der Gesamtproduktmengen keine Verbesserungen.
  - Es wurde gezeigt, daß die Durchführung von Transformationen mit *C. carcharias* auch in Transformationsmedien möglich ist, sofern sie Glucose enthalten. Exoenzyme waren an der Citronellol-Transformation nicht beteiligt.
  - Die Transformation wurde durch die Cytochrom-P450-Inhibitoren SKF-525 A und 1-Aminobenzotriazol um bis zu 70% inhibiert. Der Epoxid-Hydrolase-Inhibitor Cyclohexenoxid zeigte dagegen keine Wirkung.
  - Als Substratzugabezeitpunkt waren auch für diesen Pilz 2-3 Tage am günstigsten. Substratmengen von 0,22 mmol pro 100 mL (2 x 20 µL im Abstand von 24 h) führten zu einem nahezu vollständigen Umsatz zum Triol (**9**), während größere Mengen grundsätzlich zu einer Hemmung der Transformation führten.
- ⇒ Fazit: Die Optimierung der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* führte zu einem vollständigen Umsatz des eingesetzten Substrates zum Triol (**9**), die gewünschte Verschiebung des Produktspektrums zu den Zielverbindungen konnte jedoch nicht erreicht werden.

## **2.2.6 Citronellol-Transformationen im Bioreaktor**

### **2.2.6.1 Direkte Belüftung des Reaktors**

Die einfachste Art der Belüftung ist das Einleiten von Druckluft- oder Sauerstoff vom unteren Ende der Flüssigkeitssäule im Reaktor her durch Belüftungsrohre oder direkt durch den verwendeten Rührer.

Für die Kultivierung von *C. carcharias* im Bioreaktor wurde ein einfaches Belüftungsrohr mit Druckluft eingesetzt. Mehrere Versuche zeigten, daß die dadurch erreichte Sauerstofftransfertrate für diesen schnellwachsenden Pilzstamm nach längerer Kultivierung (3-4 Tage) für die Kulturstabilität und Terpententransformation nicht mehr ausreichte.

Nach einem schnellen Anwachsen der Kultur fand die im Kulturkolben normale Pelletbildung hier nicht statt. Stattdessen nahm die Viskosität des Mediums stark zu und es trat eine unerwünschte Schaumbildung auf.

Eine nennenswerte Citronellol-Transformation konnte mit dieser Reaktorordnung trotz eines meßbaren Glucoseverbrauches ( $10\text{-}15\text{ g L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ ) nicht erreicht werden (Triol: max.  $2\text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 2.2.6.2 Belüftung durch einen hydrophoben Kapillarmembranschlauch

Aufgrund der Ergebnisse bei der Reaktorkultivierung mit direkter Belüftung, wurde in diesem Versuch untersucht, ob die Belüftung über eine große Membranfläche im Reaktor zu einer höheren Transformationsleistung durch eine verbesserte Sauerstoffversorgung führt.

Vorversuche zur blasenfreien Belüftung mit einem Silikonmembranschlauch (15 m Länge, Innendurchmesser 3 mm, Wandstärke 0,35 mm, Membranfläche:  $1743\text{ cm}^2$ ), der an einer Seite verschlossen und von der anderen Seite mit 1 bar Sauerstoffdruck beaufschlagt wurde, hatten ebenso wie die direkte Belüftung zu einer unzureichenden Versorgung mit Sauerstoff geführt. Außerdem bewirkte die gute Löslichkeit der eingesetzten Terpensubstrate im Silikon eine Aufweichung und ein Aufquellen des Schlauchmaterials. Aus diesen Gründen erwies sich die Anwendung von Silikonschläuchen für Terpenttransformationen als ungeeignet.

In einem weiteren Versuch wurde daher eine Wicklung einer mikroporösen hydrophoben Polypropylen-Hohlfasermembran mit einer Porengröße von  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  im Reaktor angebracht (Membranfläche im Reaktor:  $1272\text{ cm}^2$ ). Durch Einleiten von Druckluft von beiden Schlauchenden her wurde ein Transmembranfluß von  $50\text{ mL min}^{-1}$  erhalten. Durch die Schlauchwicklung im Reaktorinnenraum wurde außerdem eine vertikale Zirkulation des Reaktormediums bewirkt, die vergleichbar war mit der Wirkung eines Leitrohres.

Abb. 2-134 zeigt, daß die Triolbildung in den ersten 5 Tagen sehr effektiv war. Die Produktbildungsrate lag am zweiten Transformationstag mit ca.  $150\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$  am höchsten, betrug aber auch an den folgenden beiden Tagen noch  $>100\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ .

Nach dem 5. Kulturtag nahm die Produktbildung deutlich ab, zeitweise wurde sogar eine Abnahme der Triolkonzentration festgestellt, die nicht allein auf den Verdünnungs-



effekt durch Glucosezugabe zurückgeführt werden konnte. Die Endkonzentration an Triol (**9**) betrug max.  $866 \text{ mg L}^{-1}$ . Es war eine deutliche Korrelation der Triolbildungsrate mit der Sauerstoffsättigung im Reaktor (s. Abb. 2-136) festzustellen. Als Grund für die Abnahme der Sauerstoffsättigung nach dem 5. Transformationstag ist anzunehmen, daß sich die Poren der Kapillarmembran teilweise zugesetzt hatten (ein Festwachsen des Pilzes auf der Membran trat dagegen kaum auf).

Die vom Diol (**6**) gebildete Menge überschritt auch in diesem Reaktorversuch nicht die im Kulturkolben erreichten Konzentrationen von  $10\text{-}15 \text{ mg L}^{-1}$ .

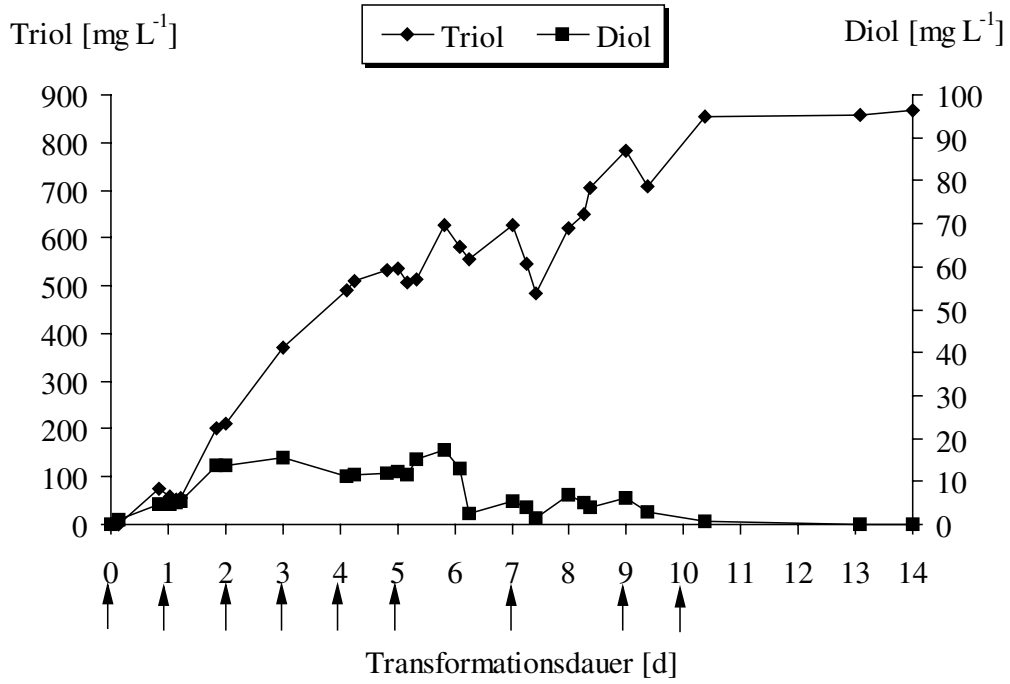
Der Glucoseverbrauch war über den gesamten Transformationsverlauf sehr hoch, so daß täglich  $20 \text{ g L}^{-1}$  supplementiert werden mußten (Abb. 2-137).

In der Reaktorabluft wurden in den ersten beiden Tagen nur geringe Mengen an Citronellol gefunden (Abb. 2-135). Dies ist darauf zurückzuführen, daß zunächst eine Sättigung der hydrophoben Membran stattfand, bevor ein Teil des Substrates über die Abluft ausgetragen wurde.

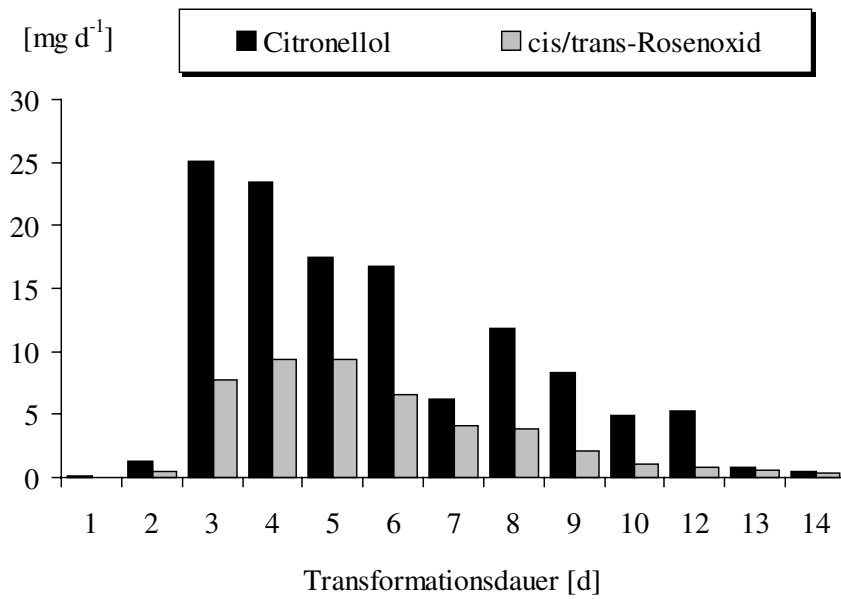
Die Citronellolverluste über die Abluft erreichten am 3. und 4. Transformationstag die höchsten Werte und betrugen maximal  $7,3 \%$  (bezogen auf die am Tag zuvor zudosierte Citronellolmenge, Tab. 2-14). Im späteren Verlauf nahmen die ausgetragenen Citronellolmengen ab, obwohl täglich Citronellol nachdosiert wurde (vgl. Abb. 2-134).

Der Grund dafür war die Abnahme der Belüftungseffektivität (auch erkennbar an der sinkenden Sauerstoffsättigung) aufgrund des schon erläuterten Zusetzens der Membranporen.

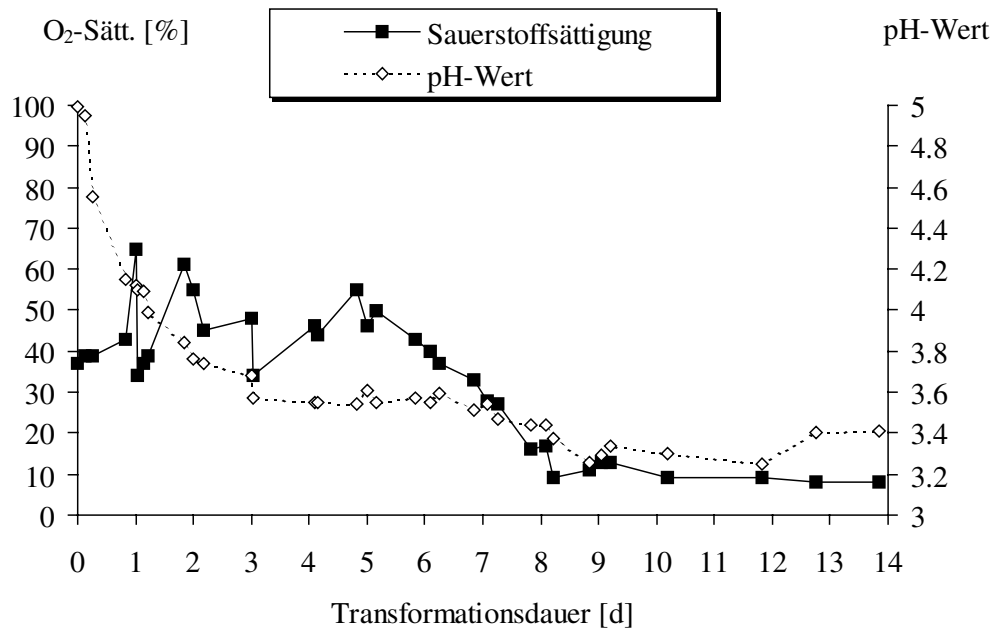
Die in der Abluft vorliegenden Rosenoxidmengen betrugen am 4. und 5. Transformationstag jeweils fast  $10 \text{ mg d}^{-1}$  (Abb. 2-135), während in der wäßrigen Phase kein Rosenoxid nachweisbar war. Dies deutet auf ein quantitatives Austragen dieser Verbindung durch die Reaktorbelüftung hin.



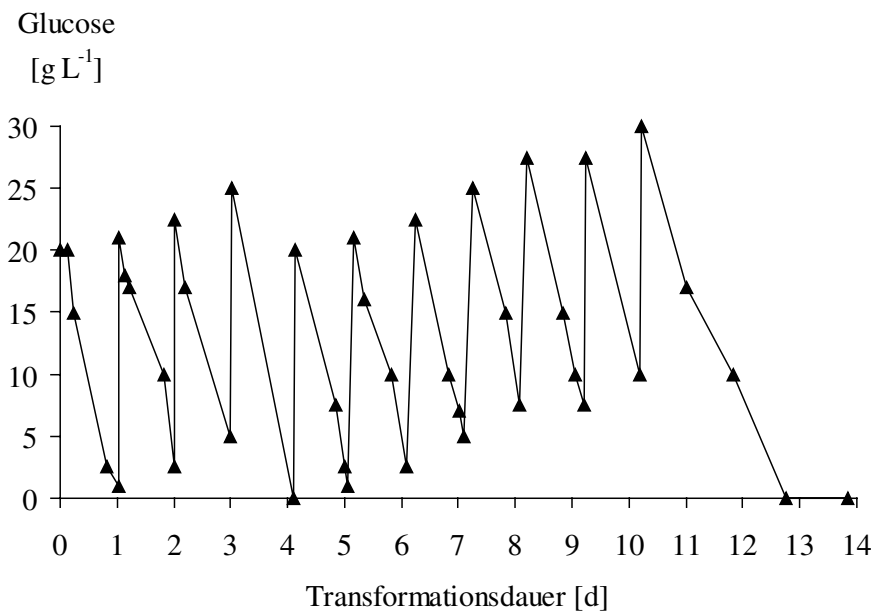
**Abb. 2-134:** Gehalte an 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9) und 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6) im Medium (Pfeile: Zeitpunkte der Citronellolzugabe)



**Abb. 2-135:** Citronellol und Rosenoxid in der Reaktorabluft (jeweils 24 h Adsorptionszeit)



**Abb. 2-136:** Sauerstoffsättigung und pH-Wert im Verlauf der Transformation



**Abb. 2-137:** Glucosegehalt im Verlauf der Transformation

**Tab. 2-14:** Citronellolverluste über die Reaktorabluft (Prozentangaben bezogen auf die 24 h zuvor zugesetzte Citronellolmenge)

| Transformationsdauer[d] | [mg] zugesetzt (pro Tag) | [%] der zugesetzten Menge in der Abluft |
|-------------------------|--------------------------|---|
| 1                       | 341,6                    | 0,1                                     |
| 2                       | 341,6                    | 0,4                                     |
| 3                       | 341,6                    | 7,3                                     |
| 4                       | 341,6                    | 6,9                                     |
| 5                       | 341,6                    | 5,1                                     |
| 6                       | 341,6                    | 4,9                                     |
| 7                       | kein Substratzusatz      |   |
| 8                       | 341,6                    | 3,4                                     |
| 9                       | 170,8                    | 4,9                                     |
| 10                      | 170,8                    | 2,9                                     |
| 12                      | kein Substratzusatz      |   |
| 13                      | kein Substratzusatz      |   |
| 14                      | kein Substratzusatz      |   |

**Teilzusammenfassung 2.2.6:**

- Die direkte Belüftung führte bei diesem Pilzstamm nicht zu einer ausreichenden Sauerstoffversorgung im Reaktor. Eine Terpen-Transformation war auf diese Weise nicht durchführbar.
- Der Einsatz eines mikroporösen hydrophoben Membranschlauches ermöglichte eine ausreichende Belüftung und gute Transformationsraten. Die Substratverluste waren mit max. 25 mg d<sup>-1</sup> akzeptabel.

⇒ Fazit: Der Einsatz hydrophober Membranen stellt eine Möglichkeit zur Reaktorbelüftung schnellwachsender Pilzkulturen für die Transformation flüchtiger Substrate dar.

### 2.2.7 Vergleich der Citronellol-Transformation durch *Cystoderma carcharias* mit den Transformationen von $\alpha$ -Pinen und Limonen

*C. carcharias* erwies sich als sehr effektiver Transformierer des acyclischen Monoterpenalkohols Citronellol. Um einen Vergleich dieses Pilzes mit den zu Anfang dieser Arbeit untersuchten Kohlenwasserstoff-Transformationen durchführen zu können, wurde die Transformation von Limonen und  $\alpha$ -Pinen durch diesen Pilz untersucht (Gasphasendosierung des Substrates, 5 Tage Transformationsdauer, dann extraktive Aufarbeitung).

Die Ergebnisse der Produktidentifizierung sind in Tab. 2-15 und Abb. 2-138 dargestellt. Aus *Limonen* wurde in kleinen Mengen Limonenepoxid als cis/trans-Isomerengemisch gebildet. Das daraus durch Hydrolyse entstehende p-Menth-8-en-1,2-diol (Limonenglykol) lag als Hauptprodukt der Transformation vor.

Weiterhin wurde die Doppelbindung am Isopropenylrest zum vicinalen Diol, dem p-Menth-1-en-8,9-diol (Uroterpenol), umgesetzt, das korrespondierende Epoxid konnte in diesem Fall jedoch nicht identifiziert werden.

Auch ein allylisches Hydroxylierungsprodukt fand sich in gleicher Menge wie das Uroterpenol als drittes Hauptprodukt der Transformation: Perillaalkohol, der durch Hydroxylierung der exocyclischen Methylgruppe entstand.

Die  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *C. carcharias* führte neben den typischen in Allylposition oxidierten Bicyclen Myrtenol, trans-Verbenol und Verbenon zusätzlich zu dem monocyclischen trans-Sobrerol als Hauptprodukt. In geringen Mengen trat dieses Produkt auch im chemischen Blindwert auf, daher konnte nur bei diesem Pilz eine biokatalytische Bildung eindeutig belegt werden, während bei den in 2.1.1 beschriebenen Pilzstämmen die gefundenen Sobrerolmengen zu gering waren.

Die Unterschiede zu der Limonentransformation durch *P. sapidus* waren offensichtlich, denn dieser Pilz hydroxylierte hauptsächlich endocyclische C-Atome mit oder ohne Umlagerung der 1-2-Doppelbindung des Limonens bzw. des  $\alpha$ -Pinens, so daß als primäre Produkte cis/trans-Carveole bzw. cis/trans-p-2,8-Menthadien-1-ol (vgl. 2.1.2) auftraten. Eine Hydroxylierung an der Methylgruppe sowie ein Angriff der Ring- bzw. der Isopropenyl-doppelbindung trat bei *P. sapidus* im Gegensatz zu *C. carcharias* nicht auf.

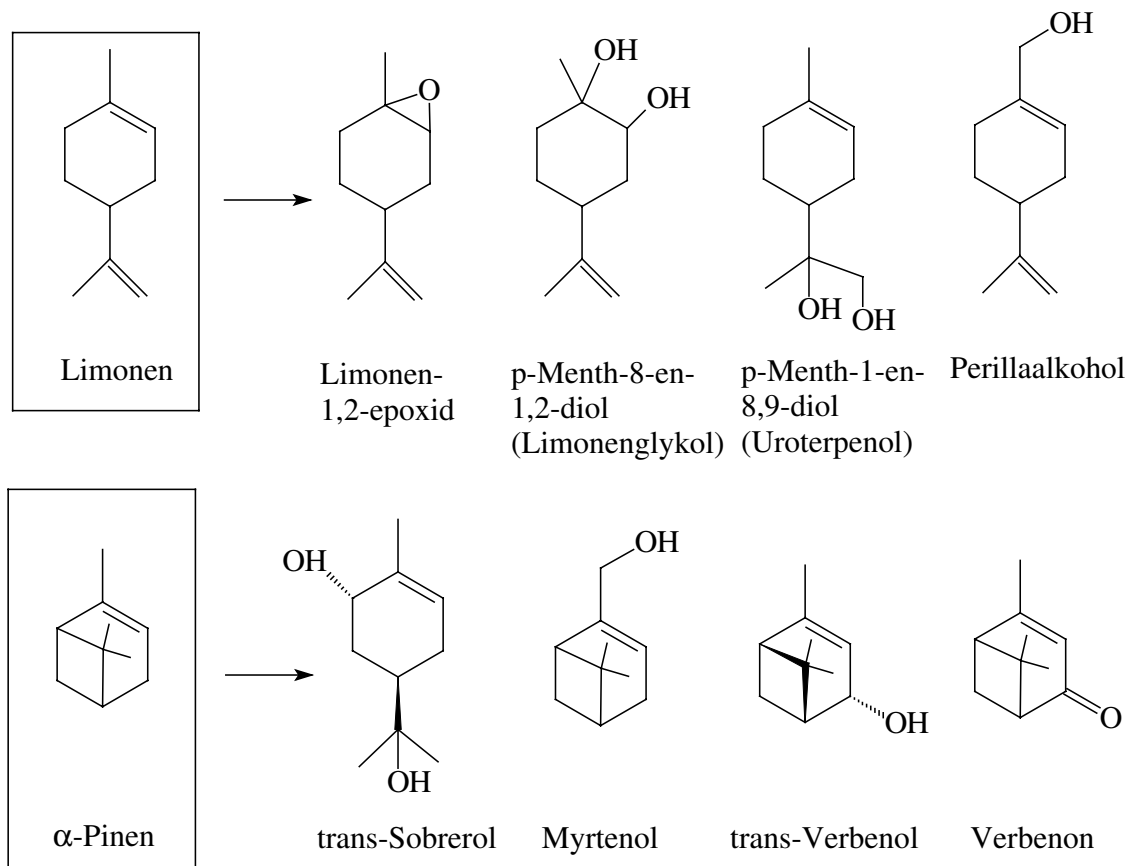
Die Produktmengen der Kohlenwasserstoff-Transformationen waren bei beiden Pilzen etwa vergleichbar: Die Summe der Hauptprodukte lag bei etwa 50-100 mg L<sup>-1</sup> – abhängig von der Transformationsdauer und dem Substratzugabemodus.

Die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* war dagegen ungleich effektiver. Der Umsatz des eingesetzten Substrates zum Triol war fast vollständig und die allylischen Diole sowie das cis/trans-Rosenoxid traten nur als Nebenprodukte auf.

Wie für *P. sapidus* (vgl. 2.1.2) wurde auch für *C. carcharias* der Sesquiterpenkohlenwasserstoff Valencen als Substrat untersucht. Eine über den chemischen Blindwert hinausgehende Transformation konnte jedoch auch bei diesem Pilz nicht festgestellt werden.

**Tab. 2-15:** Transformation von R-(+)-Limonen und (-)- $\alpha$ -Pinen durch *C. carcharias* (5 Tage Transformationsdauer; Kovats-Indices für SE 54 u. CW 20 M)

| Substanz                                    | Identifizierung | Kovats-Index (SE / CW)            | Lit.-Kovats-Index (SE / CW) [15, 16, 17] | [mg L <sup>-1</sup> ] |
|---|-----------------|-----------------------------------|--|-----------------------|
| <b><u>R-(+)-Limonen</u></b>                 |                 |                                   |  |                       |
| cis/trans-Limonen-1,2-epoxid                | Std., KI, MS    | cis 1129,<br>trans 1132<br>/ 1459 | cis: 1119 ,<br>trans: 1122<br>/ -        | 1,02                  |
| Perillaalkohol                              | KI, MS          | 1290 / 2013                       | 1281 / -                                 | 14,83                 |
| p-Menth-8-en-1,2-diol (Limonenglykol)       | MS              | 1335 / 2288                       | - / -                                    | 27,74                 |
| p-Menth-1-en-8,9-diol (Uroterpenol)         | MS              | 1431 / 2418                       | - / -                                    | 15,66                 |
| <b><u>(-)-<math>\alpha</math>-Pinen</u></b> |                 |                                   |  |                       |
| trans-Verbenol                              | Std., KI, MS    | 1139 / 1683                       | 1140 / 1735                              | 0,35                  |
| Myrtenol                                    | Std., KI, MS    | 1186 / 1799                       | 1191 / 1784                              | 10,10                 |
| Verbenon                                    | Std., KI, MS    | 1197 / 1696                       | 1195 / 1733                              | 5,67                  |
| trans-Sobrerol                              | Std., KI, MS    | 1367 / 2334                       | - / -                                    | 15,65                 |



**Abb. 2-138:** Transformationsprodukte von Limonen und  $\alpha$ -Pinen durch *C. carcharias*

## 3 Diskussion

### 3.1 Terpenoide: Aromastoffe und Aromastoffvorstufen

#### 3.1.1 Bedeutung von Terpenoiden als Duft- und Aromastoffe

Terpenoide, vor alle Monoterpenoide, sind die wichtigsten Duft- und Aromastoffe in den etherischen Ölen höherer Pflanzen (vgl. Tab. 3-1 und 3-2).

Während die Monoterpenkohlenwasserstoffe nur begrenzte Bedeutung als Aromastoffe haben, sind die *monofunktionalisierten cyclischen und acyclischen Monoterpenoide* die Substanzen mit den interessantesten sensorischen Eigenschaften. Der Grund für diesen Unterschied liegt darin, daß als Voraussetzungen für die sensorische Aktivität von Stoffen neben einem hohen Dampfdruck das Vorhandensein eines hydrophoben und eines hydrophilen Molekülteils (oberflächenaktive Eigenschaften) und damit auch eine gewisse Wasserlöslichkeit notwendig ist. Beide Voraussetzungen werden von den Kohlenwasserstoffen nur unzureichend erfüllt.

Das Einsatzgebiet der Terpenoide durch die Duft- und Aromaindustrie umfaßt mittlerweile eine große Zahl von Parfümeriewaren und Kosmetika (vor allem blumige Düfte), Lebensmitteln (Citrus- und Minzaromen), aber auch eine Vielzahl von Haushaltsprodukten (Reinigungsmittel u.ä.; v.a. Citrusaromen).

Die erste Identifizierung der verschiedenen Terpenoide erfolgte zumeist nach Isolierung aus Pflanzenmaterial. Die Gehalte an etherischen Ölen in Pflanzen sind jedoch mit Konzentrationen zwischen 0,1 und maximal 10% gering und die Komplexität der Öle so groß, daß eine industrielle Gewinnung von Aromastoffen aus diesen natürlichen Quellen nur in wenigen Fällen wirtschaftlich wäre und den Bedarf auf Dauer decken könnte.

Aus diesem Grund wurden bereits Ende der 80er Jahre 84% der weltweit verwendeten Aromastoffe durch chemische Synthese gewonnen [46].

Die terpenoiden Aromastoffe bieten den Vorteil, daß sie häufig aus kostengünstigen Rohstoffen (v.a. aus Terpenkohlenwasserstoffen) mittels chemischer Synthese gewonnen werden können.

Sowohl im Aroma- als auch im Duftstoffsektor besteht nach wie vor Interesse, diese naturidentischen Aromastoffe durch natürliche Aromen zu ersetzen.



**Tab. 3-1:** Acyclische Monoterpenoide mit Bedeutung als Duft- und Aromastoffe (zusammengestellt aus [36])

| Trivialname                           | Chem. Name  | Geruchseindruck                              | Verwendung  |   | natürliches Vorkommen   |
|---------------------------------------|---|--|---|---|---|
|                                       |   |  | Duftkompositionen                                       | Aromakompositionen                        |   |
| <b>Alkohole</b>                       |   |  |   |   |   |
| Geraniol                              | 3,7-Dimethyl- <i>trans</i> -2,6-octadien-1-ol       | frisch, grün, blumig,                        | blumige Noten   | Akzentuierung von Citrusnoten             | Citronella-/Palmarosaöl   |
| Nerol                                 | 3,7-Dimethyl- <i>cis</i> -2,6-octadien-1-ol         | angenehm, rosenähnlich                       | blumige Noten (Rosendüfte und andere)                   | Bouquet von Citrusaromen                  | Neroliöl  |
| (+)(-)-Linalool                       | 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol                      | blumig-frisch (lilienähnlich)                | fruchtige Noten   | fruchtige Noten                           | Rosenholzöl (brasilian.), Shiuöl, Korianderöl   |
| Myrcenol                              | 2-Methyl-6-methylen-7-octen-2-ol                    | frisch-blumig, nach Limone                   | Topnoten in Citrus- und Lavendelkomp.                   |   | Chin. Lavendelöl  |
| (+) / (-)- $\beta$ -Citronellol       | 3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol                           | süßlich, rosenähnlich (-) angenehmer als (+) | Rosen- und allg. Blumendüfte                            | Bouquet von Citruskompositionen           | (+): <i>Boronia citriodora</i> - u. <i>Eucalyptus citriodora</i> -Öl,<br>(-): Geranium- / Rosenöl |
| <b>Aldehyde</b>                       |   |  |   |   |   |
| Citral (Gemisch aus Geranial + Neral) | 3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-al                      | zitronenähnlich                              |   | Citrusaromen                              | viele ether.Öle (z.B. aus Lemongrass o. <i>Litsea cubeba</i> )                                    |
| 7-Hydroxydihydrocitronellal           | 3,7-Dimethyl-7-hydroxyoctan-1-al                    | blumig (Lindenblüten, Lily of the Valley)    | Parfümkomp. mit Lindenblüten o. Liliendüften            |   |   |
| <b>Ester</b>                          |   |  |   |   |   |
| Geranylacetat                         | 3,7-Dimethyl- <i>trans</i> -2,6-octadien-1-ylacetat | fruchtig, rosenähnlich,                      | blumig-fruchtige sowie Lavendel- u. Citruskompositionen | Fruchtaromen                              | <i>Callitris</i> - u. <i>Eucalyptus</i> Palmarosaöl   |
| Linalylacetat                         | 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-yl-acetat               | bergamotte-/ lavendelähnlich                 | sehr wichtig f. Lavendel-, Flieder-, Bergamottedüfte    | z.T. in Citruskompositionen               | Hauptkomponente v. Lavendel-, Bergamotteöl  |
| Citronellylacetat                     | 3,7-Dimethyl-6-octen-1-yl-acetat                    | frisch-fruchtig, rosenähnlich                | Rosen-, Lavendel-, Geraniumnoten                        | Citrusaromen u. Abrundung v. Fruchtaromen |   |

**Tab. 3-2:** Cyclische Monoterpenoide mit Bedeutung als Duft- und Aromastoffe (zusammengestellt aus [36])

| Trivialname               | Chem. Name                                      | Geruchseindruck   | Verwendung  |  | natürl. Vorkommen   |
|---------------------------|---|---|---|--|---|
|                           |   |   | Duftkompositionen   | Aromakompositionen                     |   |
| <b>Kohlenwasserstoffe</b> |   |   |   |  |   |
| Limonen                   | 1,8-p-Menthadien                                | citrusartig   | Citrusaromen<br>(hs. Haushaltsprod.)  |  | R-(+): Citruschalenöl<br>S-(-): <i>Mentha</i> sp., Coniferen                |
| α-Pinen                   | 2,6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-en        | nach Terpentinöl, medizinisch   | z.T. für industrielle Produkte<br>hs. als Rohstoff für Synthesen (Terpineole, Borneol, Campher) |  | (+): <i>Pinus palustris</i><br>(-): <i>P. pinaster</i><br><i>P. caribea</i> |
| β-Pinen                   | 6,6-Dimethyl-2-methylenbicyclo [3.1.1] heptan   | nach Terpentinöl, medizinisch   | Duftkomp. f. Haushaltsprod.<br>hs. als Rohstoff für Synthesen (Myrcen u.a.)                     |  | Terpentinöle<br>(< als α-Pinen)   |
| <b>Alkohole u. Ether</b>  |   |   |   |  |   |
| cis/trans-Rosenoxid       | 4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)tetrahydropyran | blumig, nach Geraniumöl, nach Karottenblättern                          | Rosendüfte  |  | Bulgar. Rosenöl, Geraniumöl   |
| (-)-Menthol               | p-Menthan-3-ol                                  | Minze, kühl-erfrischend   | Kosmetika, Zigaretten   | Arzneimittel, Zahnpasten, Kaugummi     | <i>Mentha</i> sp.   |
| Isopulegol                | 8-p-Menthen-3-ol                                | minzig-krautig  | Blütendüfte, Geraniumnoten  |  | viele ether. Öle  |
| α-Terpineol               | 1-p-Menthen-8-ol                                | fliederähnlich  | wichtigste Komponente in Fliederdüften  |  |   |
| 1-Terpinen-4-ol           | 1-p-Menthen-4-ol                                | muskatnußähnl., holzig-erdig  | künstl. Geraniumöle, krautige Noten   | künstl. Pfefferöle                     | <i>Pinus</i> u. <i>Eucalyptus</i> -Öle                                      |
| Borneol                   | 2-Bornanol                                      | (+): campher-ähnl., scharf, pfefferähnl.<br>(-): weniger scharf als (+) | Herst. ether. Öle   |  | (-): <i>Pinaceae</i> , Citronellöl; (+): Rosmarin-, Lavendelöl              |
| <b>Aldehyde u. Ketone</b> |   |   |   |  |   |
| Menthon                   | p-Menthan-3-on                                  | minzig  | synthet. Pfefferminzöle   |  | viele ether. Öle  |
| Carvon                    | 1,8-p-Menthadien-6-on                           | (+): kümmel-, dillähnl.<br>(-): spearmintähnl.                          |   | (+) / (-): viele Lebensm. und Getränke | (+): Kümmel-u. Dillöl<br>(-): Spearmintöl                                   |
| Verbenon                  | 4,6,6-Trimethyl-bicyclo [3.1.1]hept-3-en-2-on   | campherähnlich  |   |  | Rosmarinöl ( bis zu 37%, abhängig v. d. Herkunft)                           |
| <b>Ester</b>              |   |   |   |  |   |
| (-)-Menthylacetat         | (-)-p-Menthan-3-yl-acetat                       | frisch-fruchtig, Pfefferminz  |   | Pfefferminzaromen                      |   |
| α-Terpinylacetat          | 1-p-Menthen-8-yl-acetat                         | bergamotte-lavendelähnl.  | Lavendel- u. Bergamottekompositionen  |  | in vielen ether. Ölen   |

Lebensmittelrechtlich unterscheiden sich natürliche Aromen von den naturidentischen gemäß der Aromenverordnung [37] dadurch, daß sie *aus natürlichen Rohstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft mit Hilfe enzymatischer oder mikrobiologischer Verfahren bzw. herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren hergestellt werden.*

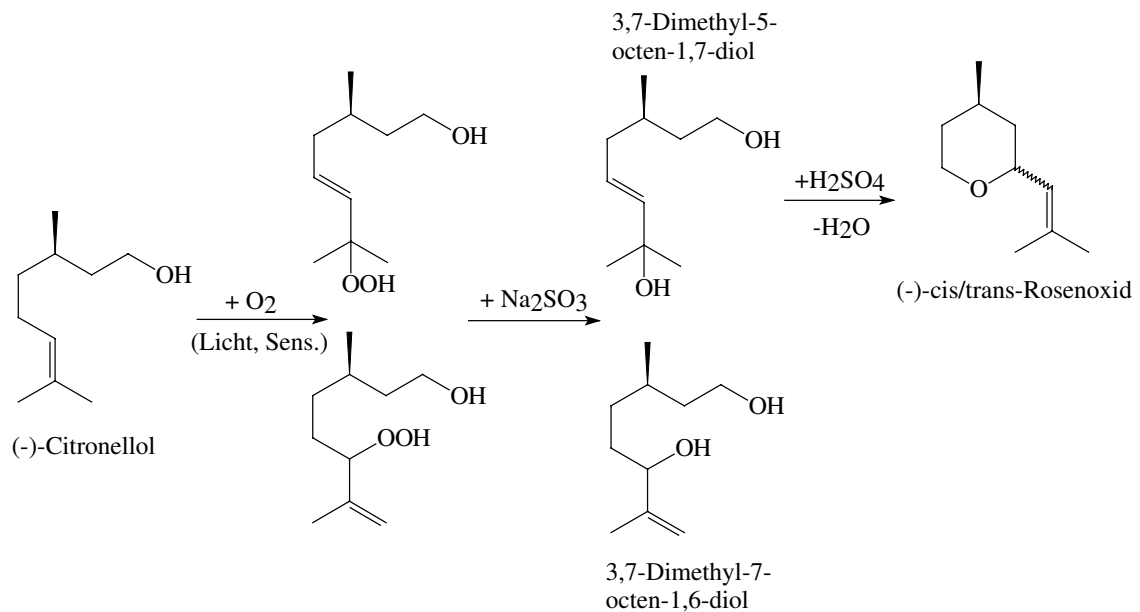
Als Vorteile natürlicher Aromastoffe sind zu nennen:

- die Gewinnung erfolgt aus regenerierbaren Rohstoffquellen
- durch biologische Produktionsverfahren ist die Herstellung umweltfreundlich
- die Produktqualität ist u.U. gegenüber den chemisch synthetisierten Aromen verbessert:
  - höhere Enantiomerenreinheit
  - hohe Spezifität der Bildungsreaktionen, dadurch treten weniger unerwünschte Nebenreaktionen auf
- bessere Akzeptanz beim Verbraucher

*Cis-* und *trans-Rosenoxid* treten als Impactverbindung im bulgarischen Rosenöl sowie in größerer Menge im Geraniumöl auf. Seit Mitte der 60er Jahre werden die Rosenoxide für blumig-grüne Kopfnoten in der Parfümindustrie eingesetzt. Mittlerweile werden jährlich mehr als 50 Tonnen der Rosenoxide (einschließlich des 4-Hydroxydihydro-Rosenoxids, einem Maiglöckchen-Duft) eingesetzt. Dabei handelt es sich um naturidentische Rosenoxide, die durch sensibilisierte Photooxidation von Citronellol gewonnen werden (Abb. 3-1). Der Reaktionsweg wurde 1961 von OHLOFF, KLEIN und SCHENCK [38] entdeckt und verläuft analog der Bildung dieser Duftstoffe in den Zellen von Rosenpflanzen [39].

Zunächst wird Citronellol mittels Photooxidation unter Umlagerung der Doppelbindung zu zwei allylischen Hydroperoxiden oxidiert. Diese werden mit Natriumsulfit zu den allylischen Diolen reduziert von denen eines, das 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol, dann sauer katalysiert zu einem Gemisch aus *cis-* und *trans-Rosenoxid* umgesetzt werden kann.

Neuere Untersuchungen zeigen einen alternativen Weg auf, der die elektrochemische Oxidation von Citronellol zur Grundlage hat [40].



**Abb. 3-1:** Herstellung von cis/trans-Rosenoxid durch sensibilisierte Photooxidation

Die *Carvon*-Enantiomere als interessante allylische Oxidationsprodukte aus Limonen haben sehr unterschiedliche sensorische Eigenschaften. Während (+)-Carvon als Hauptbestandteil des Kümmelöls (ca. 60%) und Dillöls einen typischen kümmelähnlichen Geruch aufweist, hat das im Spearmintöl als Hauptbestandteil (70-80%) auftretende (-)-Carvon eine frische, minzige Note. Die Carvonenantiomeren wurden früher durch fraktionierte Destillation aus Kümmel- und Spearmintöl gewonnen. Heute werden sie dagegen meist durch chemische Synthese aus enantiomerenreinen Limonenen hergestellt. Der bevorzugte Syntheseweg verläuft über die Addition von Nitrosylchlorid an die endocyclische Doppelbindung. Die basenkatalysierte Elimination von Chlorwasserstoff führt zum Carvonoxim, das dann säurekatalysiert zum enantiomerenreinen Carvon hydrolysiert wird [36].

*Verbenon* als wichtiges Transformationsprodukt aus  $\alpha$ -Pinen ist eine für den Geruch wichtige Komponente in Rosmarinölen. Die Gehalte liegen je nach Herkunft des Öles zwischen 1 und 37% im etherischen Öl [41].

### 3.1.2 Bedeutung von Terpenoiden bei höheren Pilzen

#### 3.1.2.1 Biosynthese von Terpenoiden durch höhere Pilzen

Auch höhere Pilze sind in der Lage, eine Reihe terpenoider Aromastoffe *de novo* zu produzieren (vgl. Tab.3-3), wenngleich bei ihnen, im Gegensatz zu den Pflanzen, keine Speicherung dieser Metaboliten stattfindet.

Bei **Basidiomyceten** wie *Amanita ovoidea*, *Cystoderma carcharias*, *Cronartium fusiforme*, *Ganoderma applanatum*, *Gomphidius glutinosus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lentinellus cochleatus*, *Lepista nuda*, *Mycena pura*, *Phellinus sp.*, *Pholiota populnea*, *Pleurotus euosmus*, *Polyporus sp.* und *Trametes odorata* wurden als typische Produkte Monoterpenkohlenwasserstoffe wie  $\alpha$ -Thujen,  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Fenchon, Camphen, Sabinen,  $\alpha$ -Phellandren,  $\beta$ -Phellandren,  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen, p-Cymen, Limonen, Caren, Myrcen mit den korrespondierenden Monoterpenalkoholen und ihren Acetaten identifiziert (Tab. 3-3).

Auch eine Vielzahl von Sesquiterpenen und Sesquiterpenalkoholen aus der Cadinan-Reihe (Cadinole,  $\delta$ -Cadinen), der Muurolan-Reihe (Muurolole, Muurolene), der Bisabolon-Reihe (z.B. Lepistiron), der Protoilludan-Reihe, sowie Farnesole, Drimenol (Bicyclofarnesol) und  $\alpha$ -Bisabolol wurden bereits als Biosyntheseprodukte der Basidiomyceten identifiziert.

In der Ordnung der **Ascomyceten** (Schlauchpilze) ist besonders die Gattung *Ceratocystis* für die Fähigkeit zu Produktion von Terpenoiden bekannt. Dazu zählen weniger Monoterpenkohlenwasserstoffe, sondern vielmehr acyclische Monoterpenalkohole wie Citronellol, Nerol, Geraniol, Nerol und deren Acetate bzw. die korrespondierenden Aldehyde, monocyclische Monoterpenalkohole wie  $\alpha$ -Terpineol, aber auch Sesquiterpenkohlenwasserstoffe wie die  $\alpha$ - und  $\tau$ -Amorphene,  $\delta$ -Cadinen und die Protoilludan-Sesquiterpene.

**Tab. 3-3:** Biosynthese von Terpenoiden durch höhere Pilze

| <i>Name</i>  | <i>Produkte</i>  | <i>Ref.</i> |
|--|--|-------------|
| <i>Ascoidea hylecoeti</i>  | Citronellol, Linalool, Nerol, $\alpha$ -Terpineol, Citronellal, Limonen, Myrcen, Citronellylacetat u.a.  | [42]        |
| <i>Amanita ovoidea</i><br>(Bull.:Fr.) Link   | $\alpha$ -Thujen, $\alpha$ -Pinen, $\alpha$ -Fenchen, Camphen, Sabinen, $\beta$ -Pinen, $\beta$ -Phellandren, $\alpha$ -Phellandren, $\alpha$ -Terpinen, p-Cymen, Limonen, $\gamma$ -Terpinen, trans-Sabinenhydrat, Terpinolen, Camphenhydrat, Piperitol | [24]        |
| <i>Ceratocystis coeruleus</i><br>(Münch)   | Nerolidol, Citronellol, Citronellylacetat, 2,3-Dihydrofarnesol, tr, tr-Farnesol, Geraniol, Nerol. Linalool, $\alpha$ -Terpineol, Geranylacetat, Nerylacetat  | [42]        |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i><br>Ellis & Halst   | Linalool, Citronellol, Geraniol, $\alpha$ -Terpineol   | [42]        |
| <i>Ceratocystis moniliformis</i>   | Geraniol, Citronellol, Nerol, Linalool, $\alpha$ -Terpineol, Geraniol, Neral, Citronellylacetat, Geranylacetat   | [42]        |
| <i>Ceratocystis picea</i>  | 6-Protoilludene (tricycl. Sesquiterpenkohlenwasserstoffe), Cerapicol + Ceratopicanol (tricycl. Sesquiterpenalkohole)   | [42]        |
| <i>Ceratocystis populina</i><br>Hinds & Davidson   | $\tau$ -Muurolool, $\alpha$ -Amorphen, $\tau$ -Amorphen (bicycl. Sesquiterpene), $\delta$ -Cadinol, $\delta$ -Cadinen  | [42]        |
| <i>Ceratocystis variospora</i>   | Citronellol, Citronellylacetat, Geraniol, Neral, Geraniol, Linalool, Geranylacetat, Nerol, $\alpha$ -Terpineol   | [42]        |
| <i>Ceratocystis virescens</i>  | Citronellol, Citronellylacetat, Geraniol, Neral, Geraniol, Linalool, Geranylacetat, Nerol, Nerylacetat, $\alpha$ -Terpineol  | [42]        |
| <i>Clitocybe illudens</i>  | $\delta$ -Cadinol, Protoilludan-Sesquiterpene  | [42]        |
| <i>Cystoderma carcharias</i><br>(Pers.:Rf.) Fayod  | $\alpha$ -Fenchen, Myrcen, p-Mentha-2,4(8)-dien, Limonen, trans-Sabinenhydrat, Fenchon, Terpinolenhydrat, Fenchol, Camphenhydrat   | [24]        |
| <i>Cronartium fusiforme</i>  | $\beta$ -Farnesen, $\alpha$ - und $\beta$ -Pinen, Caren, Myrcen, Limonen, $\beta$ -Phellandren, $\delta$ -Terpinen, Camphen, Terpinen-4-ol, Citronellol  | [42]        |
| <i>Cystoreum muraii</i><br>(Berk. & Curt.)   | Bisabolol-Sesquiterpen   | [42]        |
| <i>Ganoderma applanatum</i>  | cis-/trans-Linalooloxid (furanoid), Linalool   | [43]        |
| <i>Gomphidium glutinosus</i><br>(Sch.:Fr.) Fr.   | $\alpha$ -Thujen, $\alpha$ -Pinen, $\alpha$ -Fenchen, Camphen, Sabinen, $\beta$ -Pinen, $\beta$ -Phellandren,  | [24]        |
| <i>Hypomyces odoratus</i>  | Sesquiterpen-Ether und -Alkohole   | [42]        |
| <i>Ischnoderma benzoinum</i>   | Linalool   | [42]        |
| <i>Kuehneromyces mutabilis</i>   | cis-/trans-Linalooloxid (furanoid)   | [43]        |
| <i>Lactarius uvidus</i>  | Drimenol (ein Bicyclofarnesol)   | [42]        |
| <i>Lentinellus cochleatus</i>  | trans-Nerolidol  | [42]        |
| <i>Lentinus lepideus</i> (Fr.:Fr.) Fr.   | Sesquiterpene mit Cadinan- und Muurolool-Gerüst, Cadinole, Muurolole, Cubenole, Farnesol, Drimenol, Terrestrol   | [42]        |
| <i>Lepista irina</i> (Fr.) Bigelow   | Lepistiron (=3S,4S,10R)-3,10-Epoxy-11-oxo-bisabola-1,8-dien  | [42]        |
| <i>Lepista nuda</i> (Bull.:Fr.) Cooke  | Linalool, cis-Linalooloxid (furanoid + pyranoid)   | [24]        |
| <i>Leptographium lundbergii</i><br>Lag. et Mel.  | Africanole (Sesquiterpenalkohole): Leptographiol, Isoleptographiol, Isoafricanol   | [42]        |
| <i>Mycena pura</i>   | cis-/trans-Linalooloxid (furanoid und pyranoid), Linalool, Citronellol   | [8]         |
| <i>Phellinus</i> sp. ( <i>P. igniarius</i> , <i>P. laevigatus</i> , <i>P. tremulae</i> ) | Linalool, $\alpha$ -Pinen  | [42]        |
| <i>Phlebia radiata</i> Fr.   | $\alpha$ -Bisabolol  | [42]        |
| <i>Pholiota populnea</i>   | cis-/trans-Linalooloxid (furanoid), $\delta$ -Cadinen  | [43]        |
| <i>Pleurotus euosmus</i><br>(Berk. apud Hussey)  | Linalool, cis-/trans-Linalooloxid  | [42]        |
| <i>Polyporus durus</i>   | Sesquiterpene: E- $\beta$ -Farnesen, $\gamma$ -Muurolole, $\beta$ -Bisabolen, $\delta$ -Cadinen, Farnesol u.a.   | [44]        |
| <i>Polyporus</i> sp.   | Farnesol, Nerolidol  | [43]        |
| <i>Trametes odorata</i> (syn. <i>Gloeophyllum odoratum</i> )                             | Nerol, Citronellol, Linalool, Drimenol, Limonen  | [42]        |
| <i>Trametes suaveolens</i>   | $\delta$ -Cadinen  | [42]        |
| <i>Trichothecium roseum</i>  | Nerol, Linalool, Citronellol, $\alpha$ - und $\beta$ -Terpineol, Nerolidol, Linalylacetat, Citronellylacetat, Geranylacetat  | [42]        |

Zur Biosynthese von Terpenoiden sind alle höheren Lebewesen fähig [45, 46]. Dabei werden zunächst Isopreneinheiten über den Mevalonsäure-Weg gebildet (s. Abb. 3-2). Ausgehend von Acetyl-Coenzym A entsteht zunächst über mehrere Reaktionsschritte Mevalonsäure als C<sub>6</sub>-Säure. Diese wird durch zweifache Phosphorylierung mittels ATP aktiviert und danach durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung in Isopentenyl-diphosphat überführt.

Diese 5 C-Atome enthaltende Ausgangsverbindung aller Terpene besitzt einen Kopf (C-5, an der Doppelbindung), der für die elektrophile Substitution und einen Schwanz (C-1 mit gebundenem Sauerstoff), der für die nukleophile Substitution zugänglich ist.

Durch enzymatische Isomerisierung kann aus Isopentenyl-diphosphat das Dimethylallyl-diphosphat entstehen. Durch Kondensation eines Isopentenyl-diphosphatmoleküls mit einem Dimethylallyl-diphosphat wird zunächst Geranyl-diphosphat als Ausgangsverbindung der Gruppe der Monoterpene gebildet (Abb. 3-2). Durch Anhängen weiterer Isopentenyleinheiten können die Ausgangsverbindungen der Sesquiterpene (3 Einheiten), Diterpene (4 Einheiten), Sesterpene (5 Einheiten), Triterpene (6 Einheiten), Tetraterpene (8 Einheiten) und schließlich der Polyterpene (>8 Einheiten) gebildet werden.

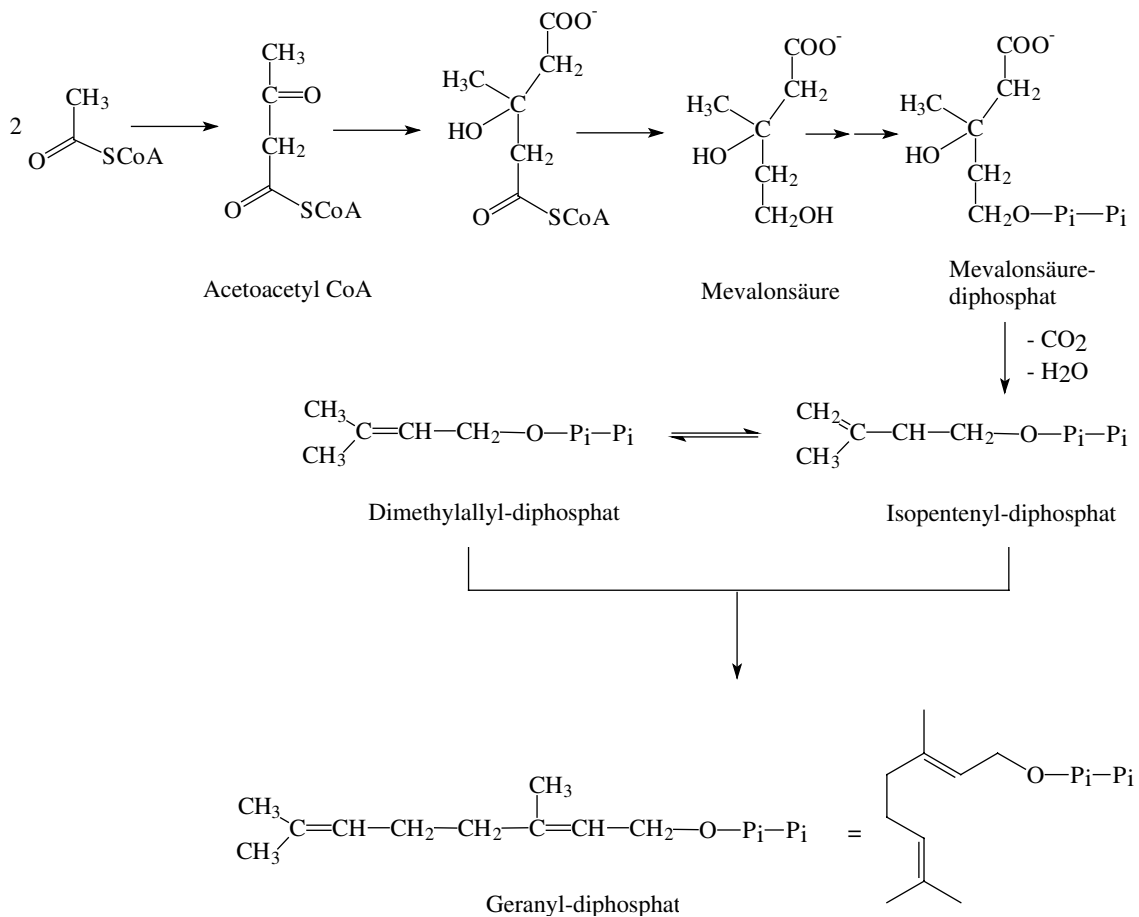
Durch weitere enzymatische Umsetzungen des Geranyl-diphosphatrestes wird aus dem einfachen acyclischen C<sub>10</sub>-Körper die große Vielfalt der Monoterpene gebildet. Folgende Reaktionstypen sind dabei von besonderer Bedeutung (s. Abb. 3-3):

**Hydrolytische Spaltung:** Diese einfachste Reaktion der Isopentenylphosphate führt zu den korrespondierenden Alkoholen, z.B. Geraniol.

**E/Z-Isomerisierung:** z.B. Transformation von Geranyl- in Neryl-diphosphat und umgekehrt.

**Cyclisierung:** Cyclische Monoterpene werden aus Diphosphaten aliphatischer Monoterpene durch polyfunktionelle Enzyme – sogenannte Carbocyclasen – gebildet.

Aus Geranyl-diphosphat entsteht z.B. zunächst Bornyl-diphosphat, das durch Hydrolyse in Borneol und durch Dehydrierung in Campher überführt werden kann.



**Abb. 3-2:** Bildung von Isopentenyldiphosphat über den Mevalonsäureweg und Dimerisierung mit Dimethylallyldiphosphat zu Geranyldiphosphat

Die Terpenkohlenwasserstoffe  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Limonen können aus Neryl-diphosphat enzymkatalysiert über ein kationisches Zwischenprodukt durch Umlagerungen und nachfolgende Deprotonierung gebildet werden.

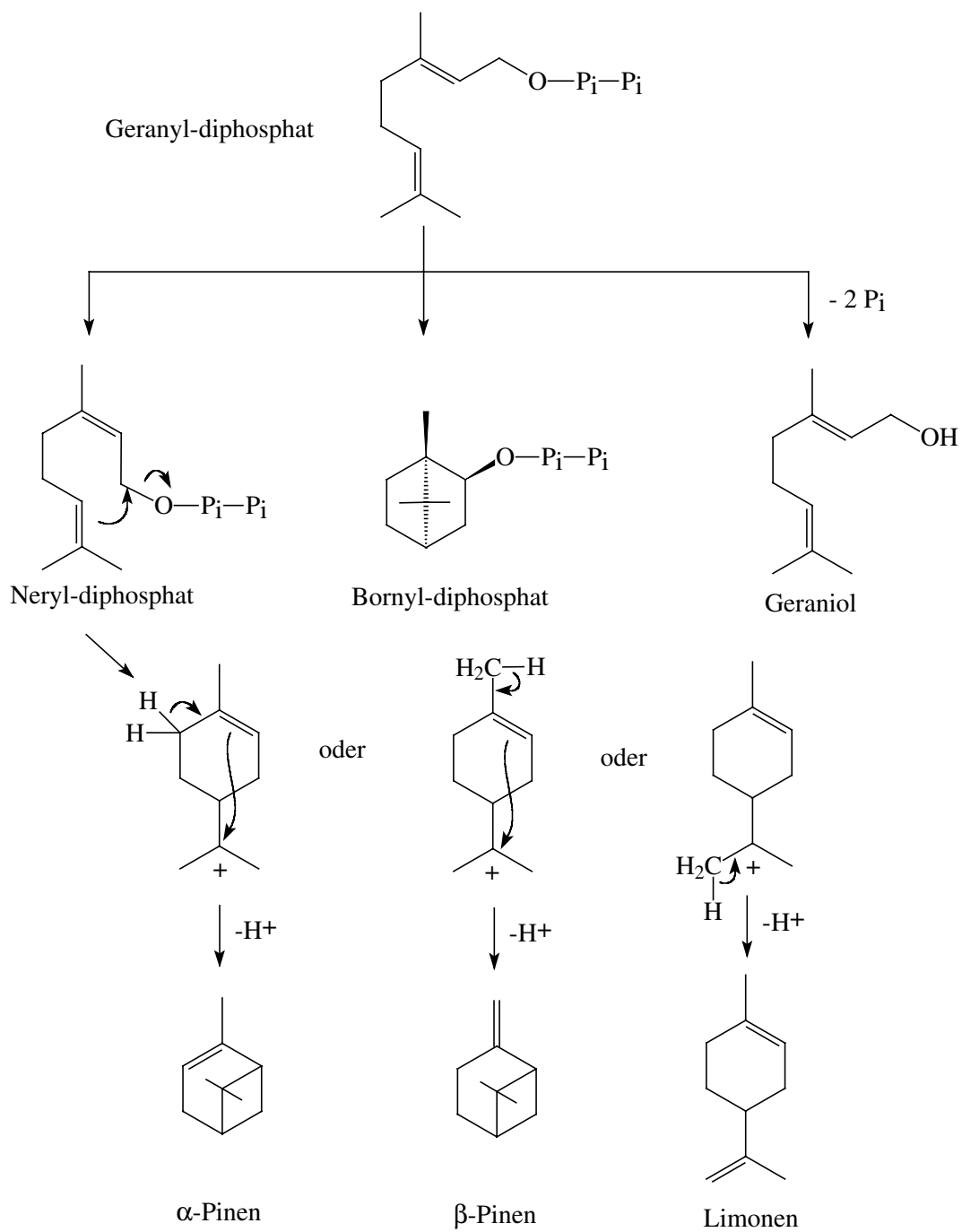
**Veresterungen:** Acylierungen erfolgen unter Anlagerung von Acyl-CoA an die entsprechenden Terpenalkohole (Geraniol, Citronellol, Linalool,  $\alpha$ -Terpineol u.a.)

**Oxidationen:** Hydroxylierungen, Dehydrierungen

Diese Oxidationsreaktionen gehören zu den späteren Reaktionen im Verlauf der Biosynthese. Bei den Biotransformationen stellen sie dagegen die primären Schritte dar. Diese oxidativen Schritte, durch die sowohl endogene als auch exogene Terpene (z.B. bei Pilzwachstum auf pflanzlichen, terpenhaltigen Substraten) funktionalisiert werden können, sind folglich sowohl für die Biosynthese (Anabolismus) als auch für den Abbau der von den Zellen aufgenommenen Stoffe (Katabolismus) von Bedeutung.



Das Vorhandensein dieser terpenmetabolisierenden Enzymsysteme ist Grundvoraussetzung für die Möglichkeit zur effektiven Transformation exogener Terpene, wie sie im natürlichen pflanzlichen Substrat saprotroph oder parasitisch wachsender Pilze enthalten sind.



**Abb. 3-3:** Biosynthesewege einiger Monoterpene – ausgehend von Geranyl-diphosphat

### 3.1.2.2 Bedeutung von Basidiomyceten bei der Bildung terpenoider Pheromone

Eine Reihe cyclischer Monoterpene spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Befalls von Koniferen durch verschiedene Borkenkäfer. So ist cis-Verbenol das Aggregations-Pheromon für *Ips typographus* (Buchdrucker) und trans-Verbenol für *Dendroctonus ponderosae* (Bergkiefern-Borkenkäfer, Nordamerika), während Verbenon für letzteren ein Antiaggregations-Pheromon darstellt.

Aus diesem Grund ist auch die ökologische Bedeutung von Pilzen bei diesen Regulationsmechanismen interessant: Infektionen von *Picea excelsa* mit dem phytopathogenen Basidiomyceten *Armillaria mellea* (Hallimasch) bewirkten einen verstärkten Befall der Bäume durch *I. typographus* [13]. Da der Pilz in der Lage ist, die im Koniferenharz natürlich vorkommenden Terpenkohlenwasserstoffe  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen zu Verbenol und Verbenon zu transformieren [47], könnte auf diese Weise ein Signalstoff entstehen, der die Borkenkäfer zu kranken und sterbenden Bäumen lockt.

Der ökologische Vorteil für den Pilz – im Sinne einer Symbiose – könnte in diesem Fall sein, daß durch die Insekten Basidiosporen aktiv zu anderen Bäumen transportiert und dadurch besser verbreitet werden.

Daneben hat die Oxyfunktionalisierung auch wichtige Bedeutung bei der Detoxifikation von Terpenkohlenwasserstoffen. Möglicherweise nutzen Borkenkäfer die Transformationstätigkeit von Basidiomyceten auch in diesem Punkt aus. Allerdings sind auch die Borkenkäfer selbst in der Lage, Terpene zu oxyfunktionalisieren und außerdem spielen neben Basidiomyceten auch andere Mikroorganismen (z.B. endosymbiotisch in den Käfern lebende Hefen) eine Rolle bei den beobachteten Biotransformationen.

Wenn auch über die ökologische Bedeutung von Terpenttransformationen durch Pilze insgesamt noch wenig bekannt ist, so ist doch denkbar, daß auch die in dieser Arbeit untersuchten Pilze, die u.a. trans-Verbenol und Verbenon als Produkte bilden, in ihrem natürlichen Lebensraum eine Bedeutung bei der Freisetzung von Pheromonen haben.

## 3.2 Terpentranformationen durch Mikroorganismen

### 3.2.1 Terpene als Substrate für Biotransformationen

Terpenkohlenwasserstoffe sind aufgrund ihres geringen sensorischen Wertes als Duft- und Aromastoffe von geringer Bedeutung und werden aus etherischen Ölen von Pflanzen vor deren Verwendung für Aromen oder Duftstoffe meist entfernt. Da sie jedoch als Hauptbestandteile einiger in großen Mengen erhältlicher etherischer Öle auftreten (vgl. Tab. 3-4), sind sie als kostengünstiges Startmaterial für biotechnologische oder chemische Synthesen von Aromastoffen ideal.

Die wichtigste natürliche Quelle für Monoterpene ist Kiefernharz, dessen Weltjahresproduktion auf 1,5 Mio t geschätzt wird. Die Gewinnung erfolgt meist durch Anritzen des Stammes und Sammeln des austretenden Harzes. Daraus kann durch Wasserdampfdestillation das etherische Öl, das dann als Terpentinöl bezeichnet wird, abgetrennt werden. Die so gewonnene Menge von jährlich etwa 260 000 t Terpentinöl entspricht 80% der Weltjahresproduktion aller etherischen Öle. Daraus werden durch weitere Destillation jährlich ca. 160 000 t  $\alpha$ -Pinen und 26 000 t  $\beta$ -Pinen gewonnen.

Orangenöl kann in großen Mengen durch kaltes Auspressen von Orangenschalen mit einer Weltjahresproduktion ca. 20 000 t gewonnen werden. Durch Destillation kann das darin enthaltene R-(+)-Limonen (bis zu 97% des Öls) abgetrennt werden [48].

Da folglich  $\alpha$ -Pinen und Limonen besonders leicht und in großen Mengen als natürliche Substrate verfügbar sind, wurde ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf Untersuchungen von Biotransformationen dieser beiden Monoterpenkohlenwasserstoffe gelegt.

**Tab. 3-4:** Einige Monoterpene aus regenerierbaren Quellen [48]

| Terpen                     | Quelle   | Gehalt  |
|----------------------------|--|---------|
| (+)-Limonen                | Orangenöl<br><i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck                          | bis 97% |
| (-)-Limonen                | Weißtannenöl<br><i>Abies alba</i> Mill.                                  | bis 90% |
| (+)- $\alpha$ -Pinen       | Griech. Terpentinöl<br><i>Pinus halepensis</i> Mill.                     | bis 90% |
| (-)- $\alpha$ -Pinen       | Französ. Terpentinöl<br><i>Pinus pinaster</i> Ait.                       | 20-75%  |
| (+)- $\beta$ -Pinen        | Nadelöl von <i>Pinus pinerosa</i><br>Douglas ex C. Laws                  | bis 75% |
| (-)- $\alpha$ -Phellandren | Eukalyptusöl<br><i>Eucalyptus dives</i> Schauer<br>var. A (u.a. Spezies) | bis 80% |

Der Monoterpenalkohol Citronellol hat im Gegensatz zu den Terpenkohlenwasserstoffen selbst große Bedeutung als Duft- und Aromastoff und ist außerdem Edukt für die Rosenoxidherstellung (vgl. 3.1.1). (-)-Citronellol (verunreinigt mit dem (+)-Enantiomeren) kann aus Geranium- und Rosenölen oder durch chemische Synthese aus enantiomerenreinen Pinenen hergestellt werden. (+)-Citronellol kann durch katalytische Hydrierung der Carbonylfunktion des Citronellals aus Java-Citronellöl gewonnen werden. Größere Mengen racemischen Citronellols werden durch partielle Hydrierung von synthetischem Geraniol und/oder Nerol produziert [36].

### **3.2.2 Systematik mikrobieller Terpenttransformationen**

Die meisten Monoterpene gehen eine große Zahl von Reaktionen ein. Bei acyclischen, monocyclischen und besonders bei bicyclischen Terpenkohlenwasserstoffen können im Verlauf der ersten Funktionalisierung Umlagerungen am Kohlenstoffgerüst oder an den Doppelbindungen auftreten, die zu komplexen Produktgemischen führen.

Der größte Teil der Reaktionen umfaßt oxidative Schritte, bei den nichtoxidativen Schritten spielt jedoch die Hydratisierung von Doppelbindungen oder Ringbrücken eine wichtige Rolle.

Im folgenden soll anhand der in dieser Arbeit durchgeführten sowie anhand literaturbekannter Biotransformationen eine systematische Betrachtung der möglichen Reaktionstypen durchgeführt werden.

#### 3.2.2.1 Allylische Hydroxylierungen

Die allylische Hydroxylierung von Monoterpenen ist aus Sicht der Aromabiotechnologie einer der wichtigsten Reaktionstypen, da er zu interessanten Aromastoffen bzw. deren direkten Vorstufen (z.B. Carveol, Borneol, Verbenol) führt.

Diese Hydroxylierungen in Allylstellung können mit oder ohne Umlagerung der Doppelbindungen ablaufen. Die Umlagerung läßt sich anhand eines radikalischen Übergangszustandes erklären, wie er bei Cytochrom-P450-gebundenen Monooxygenasen am Ende des Oxidationszyklus vorliegt (vgl. 3.2.4.2). Auch ein radikalkationisches Zwi-

schenprodukt, wie es bei peroxidasevermittelten Oxidationen auftritt, könnte zu einer solchen Umlagerung von Doppelbindungen führen (vgl. 3.2.4.4).

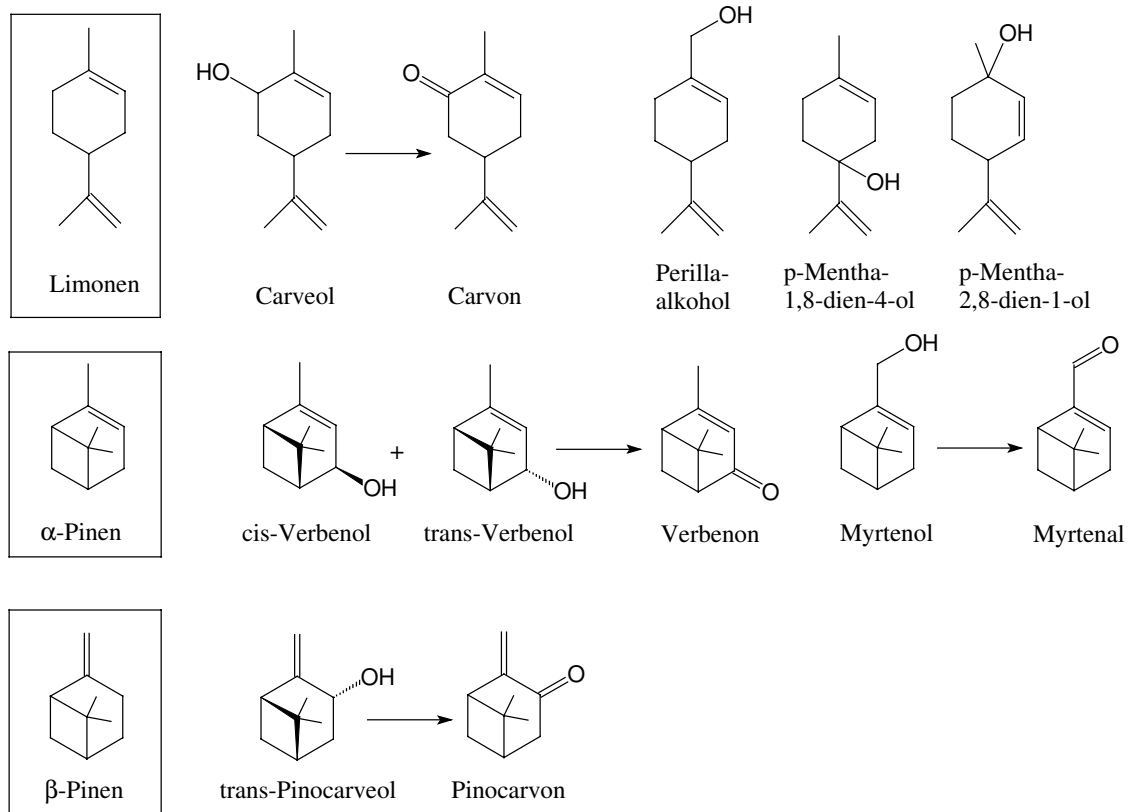
#### 3.2.2.1.1 Allylische Hydroxylierungen von Monoterpenkohlenwasserstoffen

Allylische Hydroxylierungen von Monoterpenkohlenwasserstoffen sind bereits von einer Reihe terpentransformierender Mikroorganismen und Substrate bekannt. So transformierte ein *Pseudomonas*-Stamm (PL-Strain) Limonen zu den allylischen Alkoholen Carveol und Perillaalkohol neben anderen neutralen und sauren Produkten [49, 50]. *Penicillium italicum* setzte Limonen zu den allylischen Alkoholen Carveol, Perillaalkohol, cis/trans-p-Mentha-1,8-dien-4-ol und – unter Umlagerung der Doppelbindung – zu cis/trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol um [51] (s. Abb. 3-4). *Aspergillus cellulosa*e bildete bei der Transformation von (-)-Limonen neben anderen Produkten Perillaalkohol als wichtigstes Transformationsprodukt, während die Umsetzung von (+)-Limonen zu Perillaalkohol und Carveol führte. Hauptprodukt war im letzten Fall ein vicinales Diol [52].

Die allylische Hydroxylierung von  $\alpha$ -Pinen bzw.  $\beta$ -Pinen führte bei *Aspergillus niger* NCIM 612 zu cis-Verbenol bzw. Pinocarveol und, neben anderen Produkten, durch weitere Oxidation dieser Alkohole zu Verbenon bzw. Pinocarvon [53, 54].

In einer Cometabolisierung mit Methanol als Kohlenstoffquelle setzte *Acetobacter methanolicus*  $\alpha$ -Pinen u.a. zu trans-Verbenol und Verbenon um [55].

Der Basidiomycet *Armillariella mellea* transformierte  $\alpha$ -Pinen zu Verbenol und Verbenon [47] sowie zu trans-Sobrerol als nicht-allylischem Oxidationsprodukt.



**Abb. 3-4:** Die wichtigsten durch Biotransformationen gebildeten allylischen Oxidationsprodukte von Limonen,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Basidiomyceten trat – entsprechend den Ergebnissen von BUSMANN und BERGER [10, 11, 56] – die allylische Hydroxylierung bei allen eingesetzten Substraten auf.

*P. sapidus* oxidierte alle untersuchten Substrate vor allem in Allylposition des 6-Ringes von  $\alpha$ -Pinen (Abb. 3-5),  $\beta$ -Pinen (Abb. 3-6) bzw. Limonen (Abb. 3-7), bevorzugt ohne Umlagerung der Doppelbindung.

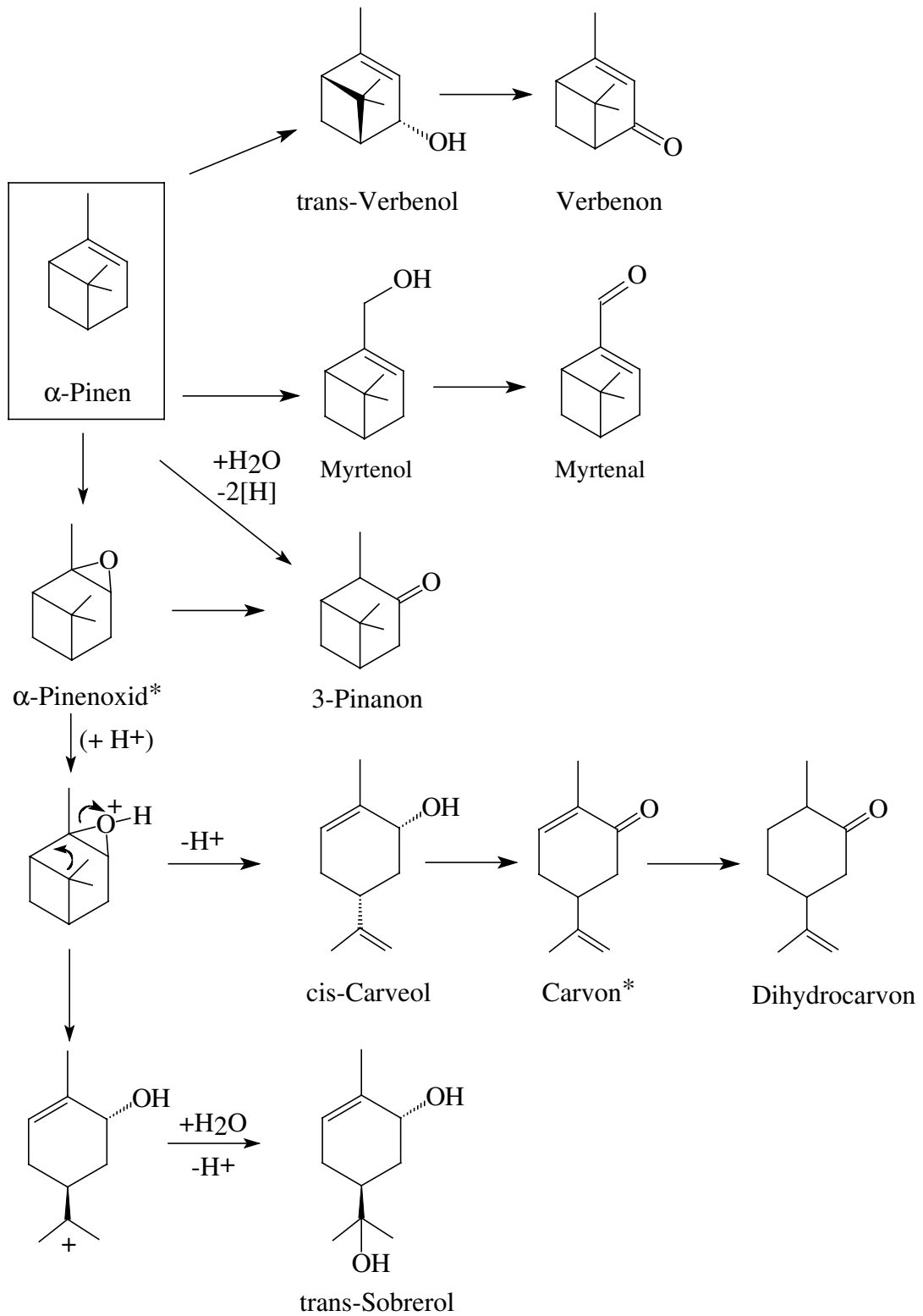
Dies führte zu den Hauptprodukten Verbenol, trans-Pinocarveol bzw. Carveol. Dagegen wurden die doppelbindungsisomeren Produkte nur beim  $\beta$ -Pinen (Myrtenol, 86% im Vergleich zum Hauptprodukt trans-Pinocarveol) und beim Limonen (cis/trans-p-2,8-Menthadien-1-ol, 55 % im Vergleich zu den Carveolen) nachgewiesen (vgl. 2.1.2, Tab. 2-3, 2-4).

Auffällig war bei diesem Pilz, daß eine Selektivität für die Hydroxylierung von Ringkohlenstoffatomen bestand: Eine Hydroxylierung allylischer exocyclischer C-Atome (Methylgruppe am C-1, beim Limonen zusätzlich die Methylgruppe der Isoprenyl-

gruppe) trat nur bei der  $\alpha$ -Pinen-Transformation auf. Das dabei gebildete Myrtenol betrug jedoch nur 6% bezogen auf die Summe Verbenol + Verbenon (vgl. Tab. 2-2).

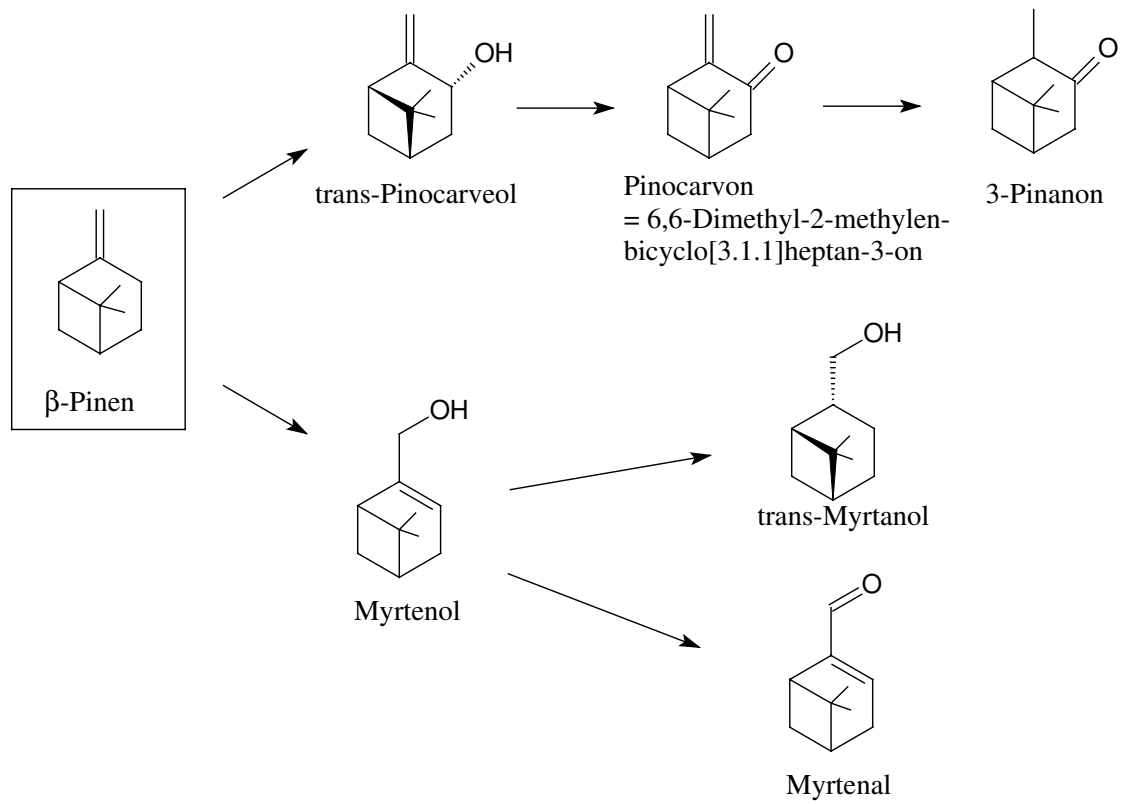
Eine andere Selektivität zeigten dagegen *Trametes hirsuta* und auch *Meripilus giganteus*: Sie setzten  $\alpha$ -Pinen durch Hydroxylierung der exocyclischen Doppelbindung zu Myrtenol als Hauptprodukt um.

Die Transformation von  $\alpha$ -Pinen bzw. Limonen durch *C. carcharias* führte zusätzlich zu den allylischen Produkten (Myrtenol, Verbenol, Verbenon) zum trans-Sobrerol als Hauptprodukt. Beim Limonen zeigte dieser Pilz eine Hydroxylierung der exocyclischen Methylgruppe zum Perillaalkohol. Hauptprodukte waren jedoch auch hier nicht die allylischen Oxidationsprodukte, sondern die vicinalen Diole. Die Hauptprodukte bei diesem Pilz waren typische Epoxid-Abbauprodukte (s. 3.2.2.3).

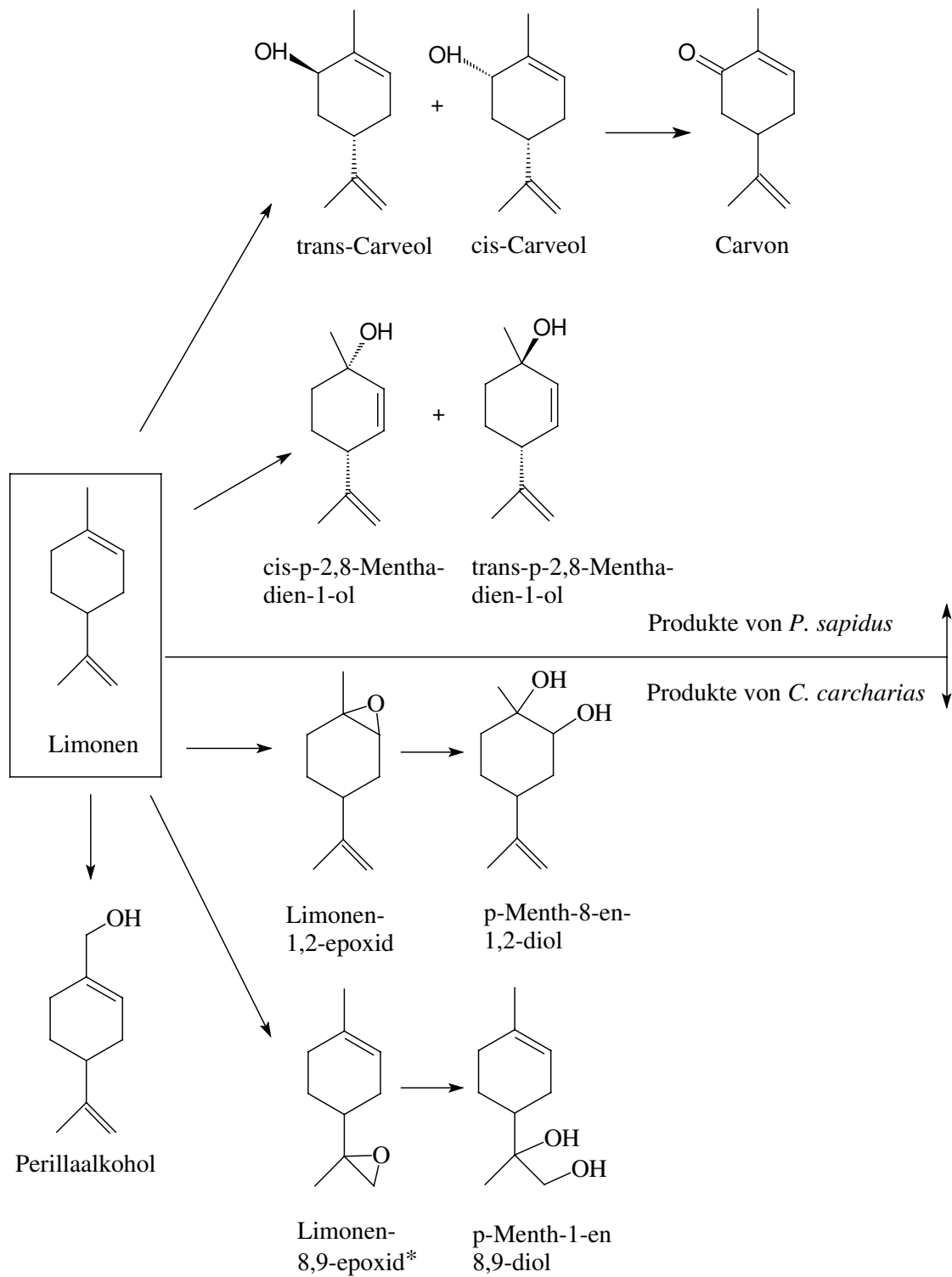


**Abb. 3-5:** Transformationsprodukte von  $\alpha$ -Pinen durch Basidiomyceten und ihre möglichen Bildungswege (\* = nicht identifizierte Zwischenprodukte)





**Abb. 3-6:** Transformationsprodukte von  $\beta$ -Pinen durch *P. sapidus* und ihre möglichen Bildungswege

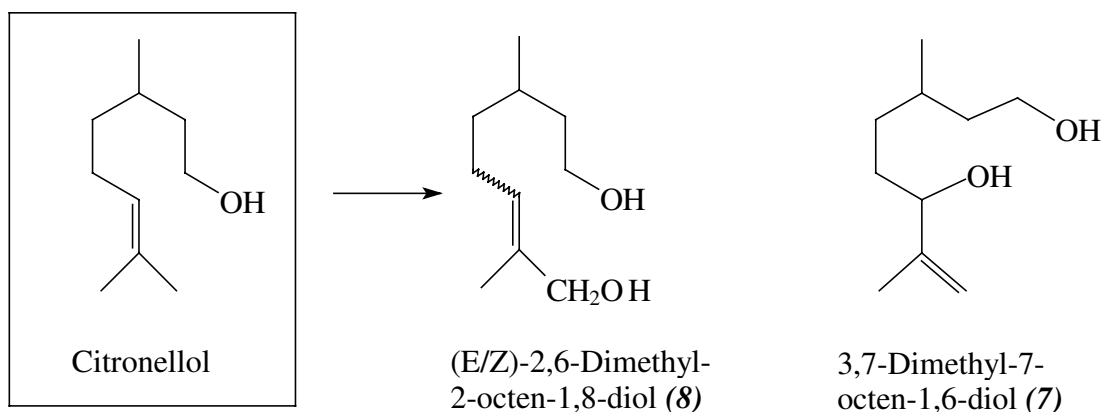


**Abb. 3-7:** Transformationsprodukte von Limonen durch *P. sapidus* und *C. carcharias* sowie mögliche Bildungswege (\* = nicht identifizierte Zwischenprodukte)

### 3.2.2.1.2 Allylische Hydroxylierungen von Monoterpenalkoholen

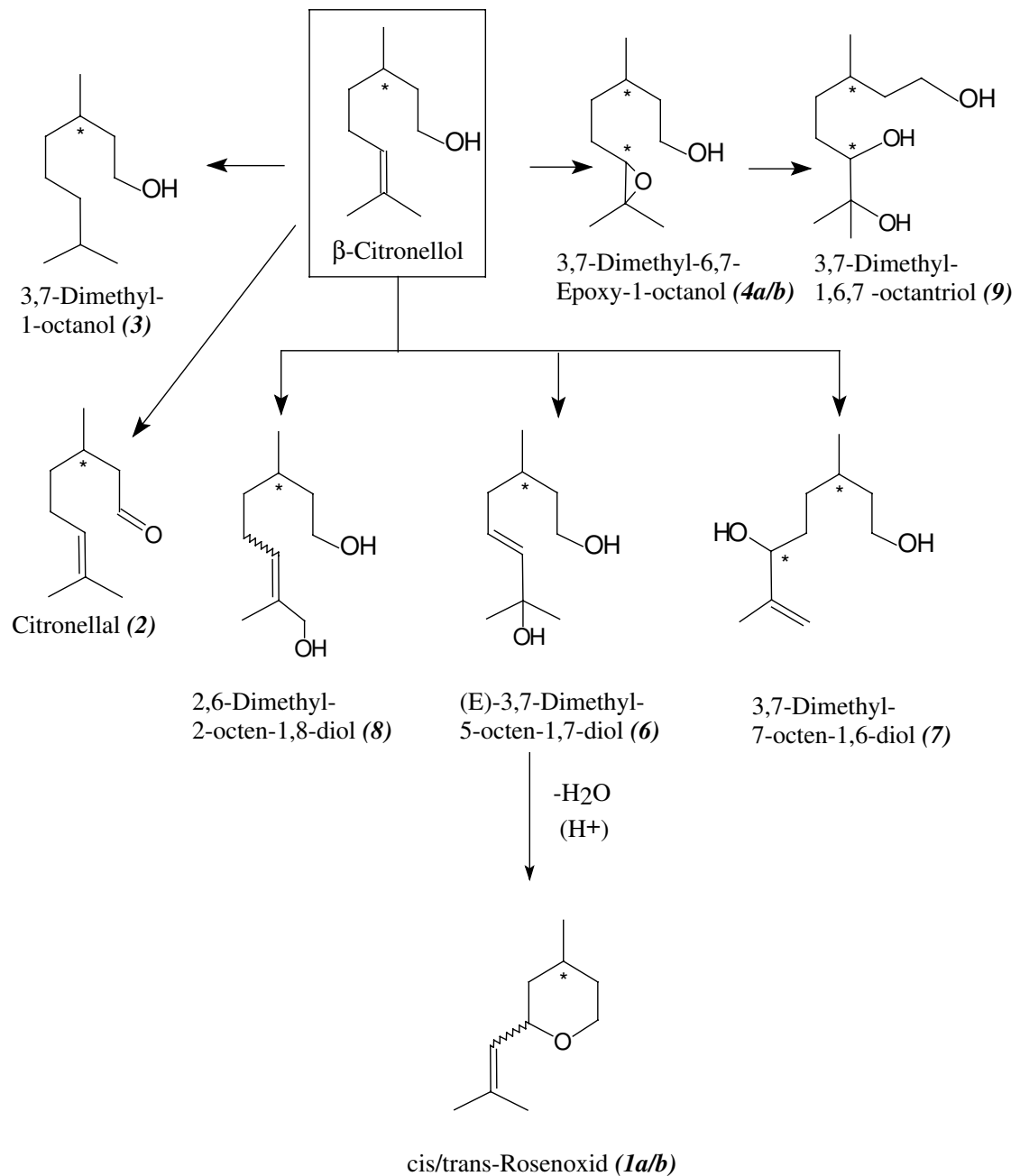
Die mikrobielle Hydroxylierung von Monoterpenalkoholen war bisher, verglichen mit den Monoterpenkohlenwasserstoffen, seltener Gegenstand der Untersuchung von Terpentranformationen. Grund dafür ist zum einen, daß hier die Substrate nicht in so großen Mengen aus Pflanzenmaterial gewonnen werden können, wie es bei den Pinenen und beim Limonen der Fall ist, zum zweiten sind die Produkte in den meisten Fällen als Aromastoffe weniger interessant, da eine zweite Funktionalisierung hier zu Produkten führt, die kaum flüchtig und daher auch sensorisch weniger wirksam sind. Die als Substrate eingesetzten Monoterpenalkohole (Citronellol, Geraniol, Nerol) sind dagegen hochwirksame Aromastoffe mit blumigen Noten, die große Bedeutung für die Duft- und Aromaindustrie haben.

Die Biotransformation von Citronellol durch *Botrytis cinerea* wurde von BRUNERIE et al. [32, 57] sowie von RAPP und MANDERY [58] beschrieben. Sie ergab als allylische Oxidationsprodukte (neben anderen Produkten) den  $\omega$ -hydroxylierten Allylalkohol (**8**) (Abb. 3-5) sowie das Diol (**7**), ein allylisches Oxidationsprodukt vom Photooxidationstyp, das unter Umlagerung der Doppelbindung des Citronellols gebildet wird. Rosenoxid konnte bei den Citronelloltransformationen von diesen Autoren ebenfalls als Produkt nachgewiesen werden. Das Diol (**6**) als direkter Rosenoxidprecursor wurde jedoch nicht identifiziert. Analoge Ergebnisse wurden bei *B. cinerea* für die Transformation von Geraniol und Nerol erhalten.



**Abb. 3-8:** Allylische Hydroxylierungsprodukte aus der Transformation von Citronellol durch *Botrytis cinerea* (nach [32, 57, 58])

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Pilzen wurden bei fast allen Stämmen (vgl. Tab. 2-13) allylische Hydroxylierungsprodukte identifiziert. 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (**6**) und 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (**7**) (vgl. Abb. 3-9) wurden ebenso nachgewiesen wie das  $\omega$ -Hydroxylierungsprodukt Diol (**8**). Das Diol (**6**) wurde als Biotransformationsprodukt damit erstmalig identifiziert. Zur Bildung der Rosenoxide aus diesem Diol vgl. 3.2.2.8.



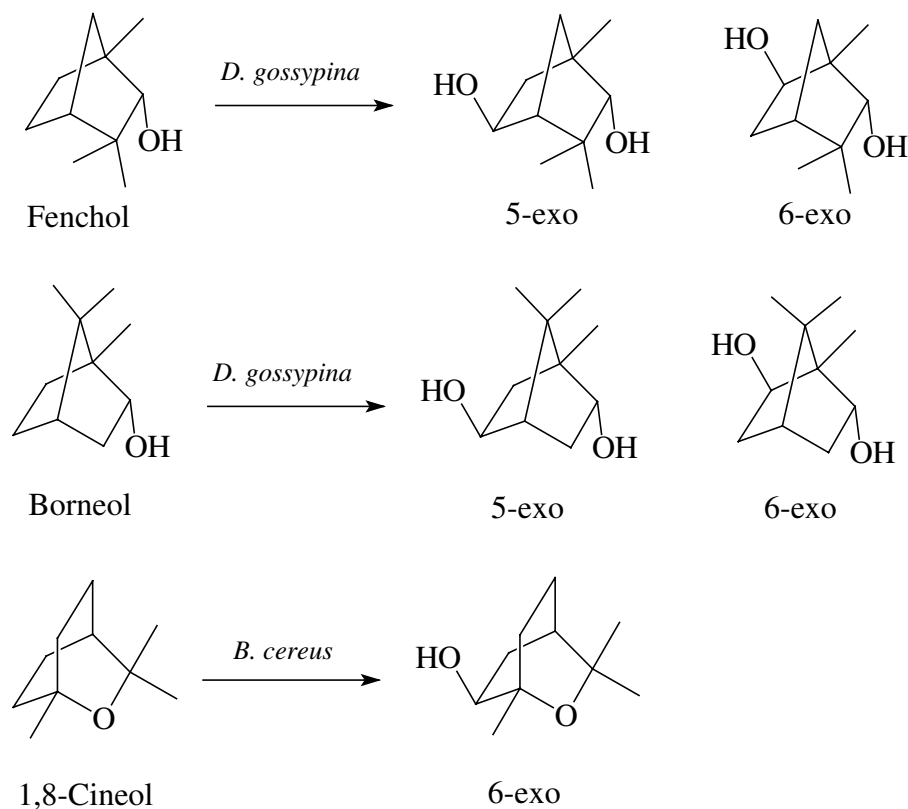
**Abb. 3-9:** Transformation von Citronellol durch Basidiomyceten

### 3.2.2.2 Hydroxylierung an nicht-aktivierten C-Atomen

Hydroxylierungen an nicht-aktivierten C-Atomen wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten Terpententransformationen nicht beobachtet. Da alle eingesetzten Substrate Doppelbindungen aufwiesen, war die Oxidation an aktivierten C-Atomen bevorzugt.

Als Beispiele für solche Oxidationen aus der Literatur seien die von ABRAHAM et al. [59] dokumentierten Transformationen der bicyclischen Monoterpenalkohole Fenchol und Borneol durch den Deuteromyceten *Diplodia gossypina* (ATCC 10936) genannt (Abb. 3-10). Dieser Pilz hydroxyliert Fenchol und Borneol und andere ähnliche Substrate stereospezifisch in 5- bzw. 6-exo-Position.

Als weiteres Monoterpen ohne Doppelbindung kann 1,8-Cineol durch einen *Bacillus cereus*-Stamm hydroxyliert werden (Abb. 3-10) [60].



**Abb. 3-10:** Hydroxylierung von Fenchol und Borneol durch *Diplodia gossypina* und von 1,8-Cineol durch *Bacillus cereus*

### 3.2.2.3 Epoxidierungen von Doppelbindungen und ihre Folgereaktionen

Epoxidierungen sind typische Cytochrom-P450-vermittelte Reaktionen. Sie wurden bei einer großen Zahl von Terpenttransformationen als Zwischen- oder Endprodukte nachgewiesen.

Während ABRAHAM et al. [59] bei der Citronelloltransformation durch *Streptomyces griseus* (DSM 40881) das Epoxid (**4**) (Abb. 3-9) als Hauptprodukt (20% Umsatzrate) fand, erhielten NANKAI, MIYAZAWA et al. [61, 62] bei der Transformation von Citronellal bzw. Citronellol durch *Glomerella cingulata* das aus dem Epoxid gebildete vicinale 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (**9**).

Epoxide sind in neutralen bis sauren wäßrigen Lösungen sehr instabil. Das Epoxid aus Citronellol (Abb. 3-9 Nr. **4a/b**) ist im Neutralen relativ stabil (vgl. Abb. 2-106), während bei niedrigeren pH-Werten eine sehr schnelle Hydrolyse stattfindet (bei 10 mg L<sup>-1</sup> vollständiger Abbau innerhalb eines Tages). Diese führt zum vicinalen *trans*-Diol, im Falle des Citronellols zum o.g. Triol (**9**).

Das Epoxid (**4**) konnte im Screening bei 14 der 21 Pilze nachgewiesen werden (vgl. Tab. 2-13). Sowohl bei *P. sapidus* als auch bei *C. carcharias* traten bei der Untersuchung der Zeitverläufe (Abb. 2-107 und 2-108) Mengen von 50-70 mg L<sup>-1</sup> auf.

Das Triol (**9**) als Hydrolyseprodukt wurde bei den weiteren Untersuchungen an *C. carcharias* in hohen Konzentrationen gebildet. Weitere Folgeprodukte des Epoxids wurden nicht nachgewiesen.

Bei  $\alpha$ -Pinenoxid wirkt sich die Ringspannung des Oxiranringes durch die tricyclische Struktur dieser Verbindung noch ungünstiger auf die Stabilität aus. Untersuchungen von GRIFFITHS et al. [63] sowie eigene Versuche (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigten, daß dieses Epoxid auch bei pH 7,0 sehr schnell abgebaut wird. Hauptabbauprodukte sind dabei nach Öffnung und Umlagerung der Kohlenstoffbrücke des Pinenoxids das Campholenaldehyd, das *trans*-Sobrerol und das *cis/trans*-Carveol, während das vicinale Diol (2,3-Pinandiol) keine Rolle spielt.

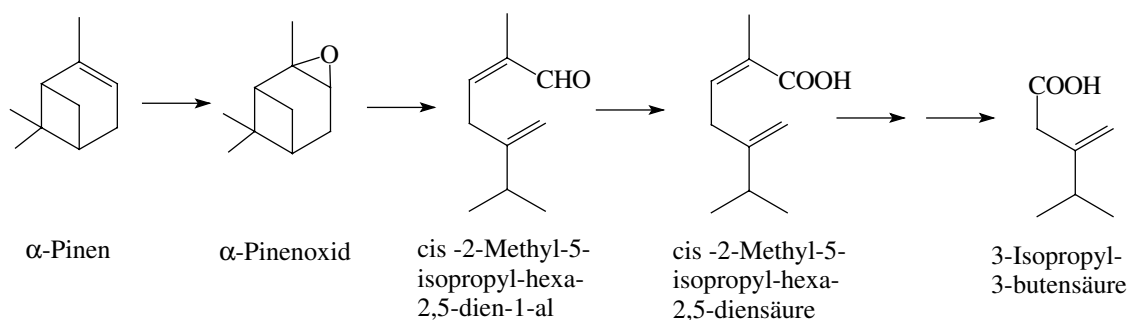
Aus den sauren Pilzkulturmedien (ca. pH 3-5) konnte diese Verbindung daher nicht isoliert werden. Das Carveol als ein Nebenprodukt der  $\alpha$ -Pinentransformation durch *P. sapidus* (vgl. Tab. 2-2) deutet aber auf  $\alpha$ -Pinenoxid als Intermediat der Transformati-

on hin (vgl. Abb. 3-5). Ein solcher Bildungsmechanismus wurde schon 1962 von PREMA und BHATTACHARYYA [53] postuliert.

Die Umlagerung des Pinenoxids zum 3-Pinanon (Abb. 3-5) ist eine weitere mögliche Reaktion. Dieses Produkt wurde ebenfalls bei *P. sapidus* als Nebenprodukt nachgewiesen.

Auch die Bildung von trans-Sobrerol als Hauptprodukt der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *C. carcharias* verläuft über das Epoxid: Es entsteht durch enzymatische oder nichtenzymatische Ringöffnung und nachfolgende Anlagerung einer OH-Gruppe.

Neben den genannten Umlagerungen von  $\alpha$ -Pinenoxid ist auch die durch eine Lyase vermittelte Umlagerung von  $\alpha$ -Pinenoxid durch *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 11671) [64] sowie durch *Nocardia* sp. (Strain 18.3) [63, 65] bekannt, die zu cis-2-Methyl-5-isopropyl-hexa-2,5-dien-1-al führt (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11:** Transformation von  $\alpha$ -Pinen durch *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 11671) und *Nocardia* sp. (Strain 18.3) [63, 64, 65]

Die Epoxidierung von Limonen ist an beiden Doppelbindungen denkbar. Bei der Transformation durch *C. carcharias* konnte Limonen-1,2-epoxid und als Hauptprodukt das korrespondierende Diol (p-Menth-8-en-1,2-diol) nachgewiesen werden (2.2.7, Abb. 2-138, Tab. 2-15).

Das aus der Isopropenylgruppe abgeleitete Epoxid wurde nicht identifiziert, jedoch trat das resultierende vicinale Diol (p-Menth-1-en-8,9-diol, 56% im Vergleich zum Hauptprodukt) auf. Bei der Limonentransformation durch *P. sapidus* konnten die Epoxide bzw. die resultierenden vicinalen Dirole nicht nachgewiesen werden.

Das 1,2-Diol ist typisches Transformationsprodukt der Limonentransformation durch viele Pilze (z.B. *Corynespora cassiicola* und *Diplodia gossypina* [26, 27]), während das

von *C. carcharias* gebildete 8,9-Diol bisher noch nicht dokumentiert ist. Die genannten Diole weisen jedoch keine Aromastoffeigenschaften auf.

#### 3.2.2.4 Oxidation von primären und sekundären Monoterpenalkoholen zu Aldehyden und Ketonen

Dieser Reaktionsschritt ist neben den allylischen Hydroxylierungen von besonderer Bedeutung für die Bildung oxyfunktionalisierter Aromastoffe, da viele Monoterpenaldehyde und -ketone (z.B. Carvon, Verbenon) aufgrund ihrer leichteren Flüchtigkeit interessantere sensorische Eigenschaften aufweisen als die zugehörigen Alkohole (Carveol, Verbenol). Diese durch Dehydrogenasen oder Oxidasen vermittelte Oxidation tritt bei vielen terpentransformierenden Mikroorganismen auf.

Die Dehydrierung von primären und sekundären Alkoholen wurde besonders bei *P. sapidus* beobachtet, während sie bei *C. carcharias* nicht festgestellt wurde.

Citronellol wurde in geringen Mengen zu Citronellal oxidiert (Abb. 3-9), Verbenol (aus  $\alpha$ -Pinen) zu Verbenon (Abb. 3-5), Myrtenol (aus  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Pinen) zu Myrtenal (Abb. 3-6), Carveol (aus Limonen) zu Carvon (Abb. 3-7).

Bei trans-Verbenol wurde bei *T. hirsuta*, *G. frondosa* und besonders bei *P. sapidus* im Kulturverlauf häufig eine 80-90%-ige Umsetzung zu Verbenon festgestellt (z.B. Abb. 2-45 bis 2-48, Abb. 2-76). Die Umsetzung von Myrtenol zum Aldehyd (Myrtenal) war dagegen kaum feststellbar, sondern der Terpenalkohol wurde ins Medium abgegeben.

Cis/trans-Carveol wurde durch *P. sapidus* im Kulturverlauf zu maximal 40-50% zum Carvon oxidiert (vgl. Abb. 2-56, 2-87, 2-88).

#### 3.2.2.5 Oxidation von Monoterpenaldehyden und -ketonen zu Carbonsäuren und weitere Mineralisierung

Die Bildung von Carbonsäuren aus Terpenoiden wurde für die  $\alpha$ -/ $\beta$ -Pinen- und die Limonentransformation durch *P. sapidus* (2.1.5) sowie für die Citronelloltransformation durch *C. carcharias* (2.2.1.2.4) untersucht. Bei keiner dieser Transformationen konnten saure Abbauprodukte im Medium oder im Myzel nachgewiesen werden.

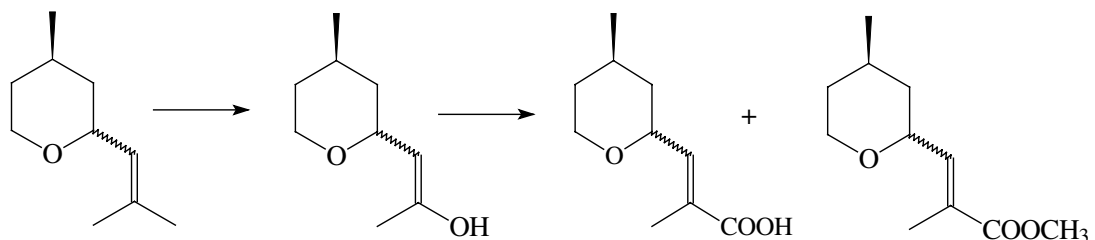


Die zu den Carbonsäuren führenden Oxidationsschritte treten bei den meisten terpen-transformierenden Bakterien auf, da sie häufig mit dem Terpen als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können, indem sie es in den  $\beta$ -Oxidationszyklus einbringen und schließlich zu Kohlendioxid und Wasser metabolisieren. Ein Beispiel ist die Oxidation des aus  $\alpha$ -Pinenoxid gebildeten Aldehyds zu den entsprechenden Carbonsäuren (Abb. 3-11).

Bei den Pilzen, die eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zum Wachstum benötigen, also die Terpene nur cometabolisieren können, sind aus der Literatur kaum Transformationen zu sauren Produkte bekannt. So transformierte *Aspergillus niger* cis- und trans-Rosenoxid zu den 9-Carbonsäuren bzw. deren Methylestern (Abb. 3-12) [66].

Andere Kohlenwasserstoffe, z.B. unverzweigte Alkane, können von Pilzen zu den Fettsäuren oxidiert werden. So konnten *Cladosporium resinae* [67] und *Penicillium* sp. [68] auf Alkanen als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen.

Der fehlende Nachweis von sauren Produkten schließt auch bei anderen Pilzen nicht zwangsläufig eine Mineralisierung von Terpenoiden aus, da die intrazellulären Konzentrationen möglicherweise um ein Vielfaches geringer sind als die Konzentrationen der Transformationsprodukte im Medium.



cis/trans-Rosenoxid

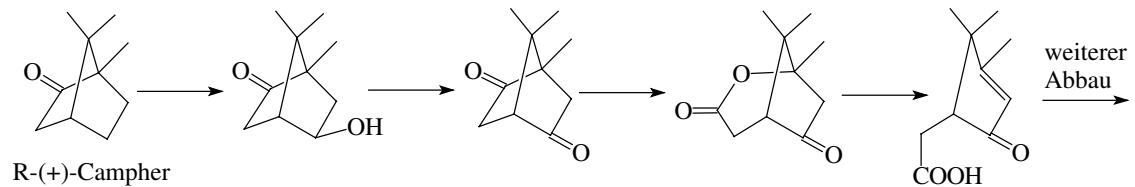
**Abb. 3-12:** Oxidation von cis/trans-Rosenoxid zur 9-Carbonsäure und deren Methylester durch *Aspergillus niger*

### 3.2.2.6 Baeyer-Villiger-Oxidationen

Als Baeyer-Villiger-Oxidationen bezeichnet man Oxidationen von Ketonen, bei denen in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe ein Sauerstoffatom eingefügt wird. Die Reaktionsprodukte sind Ester. Wenn die Edukte cyclische Ketone sind, entstehen Lactone. Diese Art von Reaktionen wurde im Bereich der Terpentransformationen schon seit Ende der

50er Jahre von GUNSALUS und seinen Mitarbeitern beim Campher-Abbau durch verschiedene *Pseudomonas putida*-Stämme ausführlich untersucht [69, 70] (Abb. 3-13).

Baeyer-Villiger-Oxidationen durch Pilze sind bisher nicht bekannt und traten bei den hier untersuchten Basidiomyceten ebenfalls nicht auf.



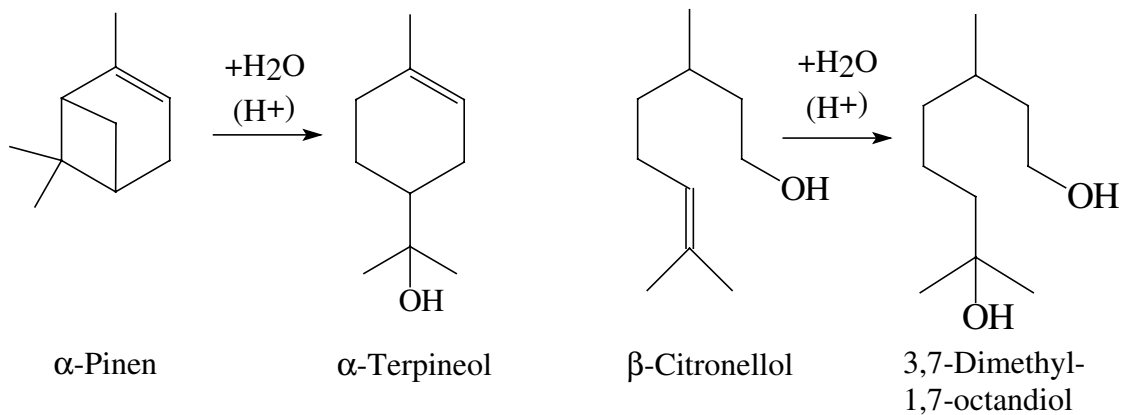
**Abb. 3-13:** Baeyer-Villiger Oxidation von R-(+)-Campher durch *Pseudomonas putida* (ATCC 17453) [69, 70]

### 3.2.2.7 Hydratisierungen von Doppelbindungen und Ringbrücken

Hydratisierungen sind typische säurekatalysierte Reaktion, die bei Terpenen in sauren wäßrigen Lösungen immer auftreten, die jedoch auch enzymkatalysiert sein können.

Blindwertuntersuchungen an  $\alpha$ -Pinen und Citronellol zeigten, daß erst bei pH-Werten <4,0 nennenswerte Mengen an Hydratationsprodukten gebildet werden (vgl. Abb. 2-10 und Abb. 2-103).

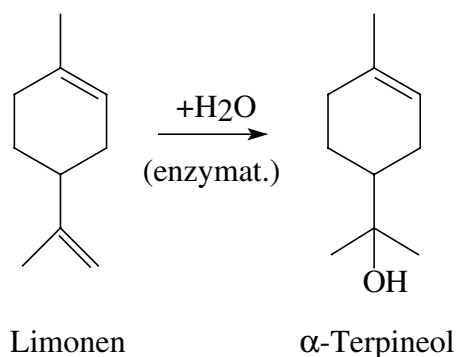
Aus  $\alpha$ -Pinen wird dabei durch Aufspaltung der Ringbrücke unter Wasseranlagerung  $\alpha$ -Terpineol gebildet und aus Citronellol entsteht 3,7-Dimethyl-1,7-octan-diol (5) (vgl. Abb. 3-14). Da bei einigen Pilzen (z.B. *Fomitopsis pinicola*, s. Tab. 2-13) sehr niedrige pH-Werte von 2-4 auftreten, sind diese Nebenreaktionen hier nicht zu vernachlässigen. Die Entscheidung, ob z.B. durch *F. pinicola* das 3,7-Dimethyl-1,7-octan-diol (5) ausschließlich chemisch oder auch enzymatisch gebildet wird, ist bei diesen pH-Werten nicht ohne weiteres möglich.



**Abb. 3-14:** Säurekatalysierte Hydratisierungen von  $\alpha$ -Pinen und Citronellol

Während also bei den hier untersuchten Basidiomyceten enzymkatalysierte Hydratisierungen von Terpenen nicht nachgewiesen wurden, sind solche Reaktionen bei einigen Mikroorganismen bekannt: *Penicillium digitatum* hydratisiert R-(+)-Limonen mit guter Ausbeute (46% Umsatz) zum  $\alpha$ -Terpineol (Abb. 3-15) [28], das als Impact-Verbindung in Fliederdüften auftritt und daher als Aromastoff interessant ist.

Aus *Pseudomonas gladioli*, der die gleiche Transformation durchführt [71], wurde die beteiligte  $\alpha$ -Terpineol-Dehydratase bereits isoliert [72]. Bei *Bacillus stearothermophilus* gelang CHANG und ORIEL 1995 [73] die Expression der limonentransformierenden Enzyme in *Escherichia coli*. Dies war der erste bekannte rekombinante Stamm, der Terpene transformieren konnte. Die Transformationsleistung dieses Stammes war im Vergleich zu *P. digitatum* und *Ps. gladioli* jedoch nur gering und bedarf der Verbesserung vor Anwendung in einem Bioprozeß.



**Abb. 3-15:** Enzymatische Hydratisierung von Limonen zu  $\alpha$ -Terpineol

### 3.2.2.8 Veretherungen

Die Veretherung des 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diols (**6**) unter Wasserabspaltung führt zum cis/trans-Rosenoxid (Abb. 3-9). *Enzymatische* Reaktionen dieser Art sind aus der Literatur nicht bekannt. Die Herstellung des Rosenoxids aus dem Diol (**6**) erfolgt jedoch bei der industriellen Erzeugung dieses Aromastoffes säurekatalysiert [38, 74], so daß in sauren Pilzmedien eine chemische Bildung aus dem biokatalytisch gebildeten Diol (**6**) wahrscheinlich ist (vgl. Abb. 3-9). Rosenoxid wurde als Minorkomponente bei der Citronelloltransformation durch 17 von 19 untersuchten Basidiomyceten in Konzentrationen von 0,03 bis 2,2 mg L<sup>-1</sup> gefunden. Bei den eingehenderen Untersuchungen an *C. carcharias* konnte jedoch eine Steigerung der Rosenoxidmengen über 2,5 mg L<sup>-1</sup> hinaus in der wäßrigen Phase (Abb. 2-108) nicht erreicht werden.

### **3.2.3 Enantioselektivität von Terpenbiotransformationen**

Die hohe Enantioselektivität vieler Enzyme stellt potentiell einen der größten Vorteile von Biotransformationen gegenüber chemischen Synthesen dar. Da die sensorischen Eigenschaften von Aromastoffen häufig von ihrer optischen Konfiguration abhängig sind (z.B. R(-)- und S(+)-Carvon, vgl. 3.1.1), sollten die Zielsubstanzen von Terpenbiotransformationen eine möglichst hohe Enantiomerenreinheit aufweisen.

Bei vielen der bisher beschriebenen Terpentransformationen fand keine Untersuchung der optischen Konfiguration statt, für einige Mikroorganismen wurden jedoch hohe Enantioselektivitäten bei den Umsetzungen festgestellt.

In Bezug auf allylische Oxidationen ist *Corynebacterium* sp. interessant, das R(+)-Limonen zu S(-)-Carvon (99% Reinheit) transformierte [75]. Die allylische Hydroxylierung von Limonen durch *Bacillus stearothermophilus* an der exocyclischen Methylgruppe führte bei Verwendung von R-(+)-Limonen als Substrat unter Erhalt der Konfiguration zum R(+)-Perillaalkohol [76].

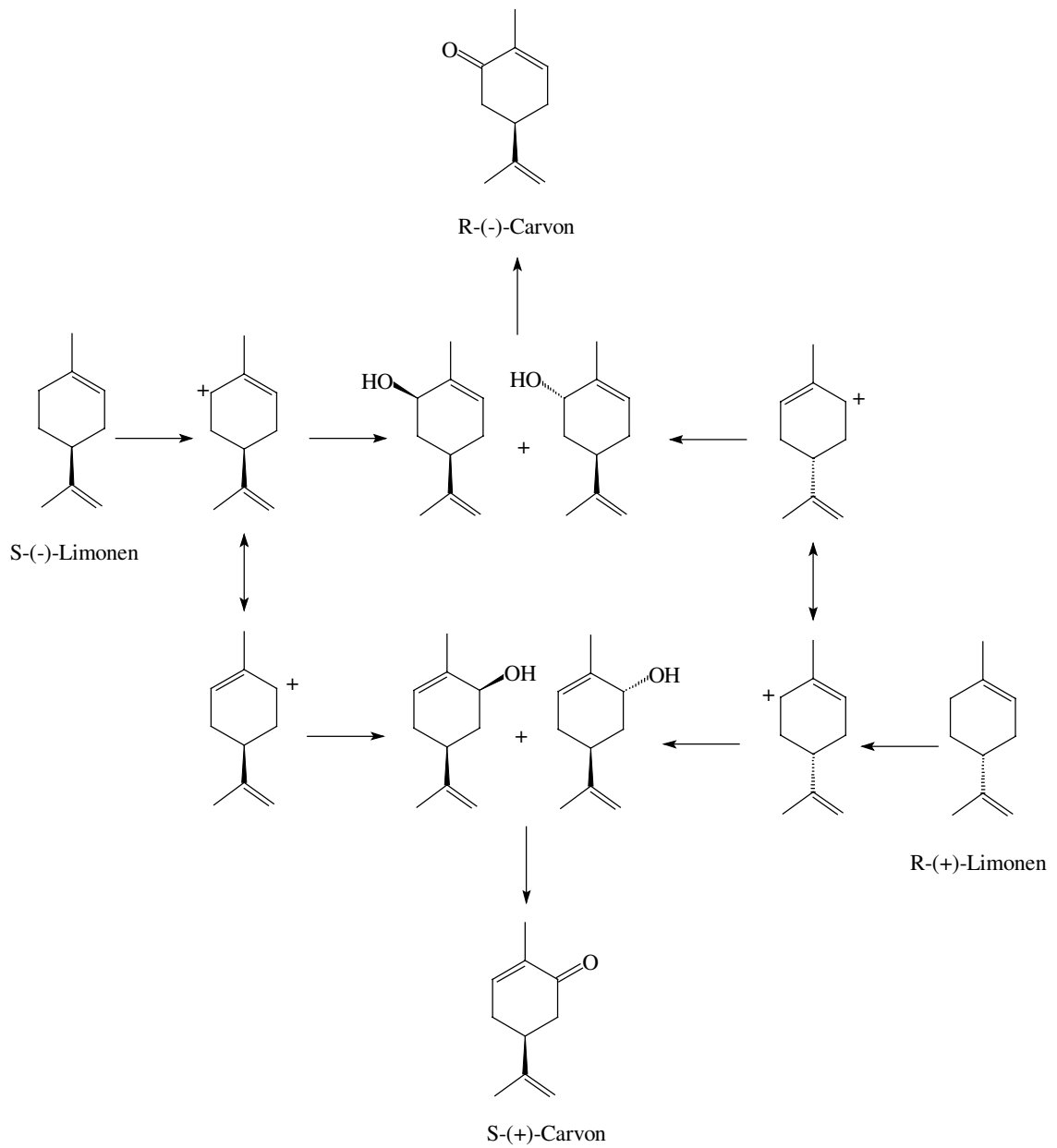
Die Hydratisierung von R(+)-Limonen durch *Pseudomonas gladioli* ergab R(+)- $\alpha$ -Terpineol und S(-)-Limonen wurde zu S(-)- $\alpha$ -Terpineol umgesetzt [71]. R(+)-Limonen wurde durch diesen Stamm 10 mal so schnell hydratisiert wie S(-)Limonen [77].

Auch *Penicillium digitatum* (DSM 62840) transformierte R(+)-Limonen zu R(+)- $\alpha$ -Terpineol. Bei diesem Pilz wurde festgestellt, daß auch beim Einsatz racemischen Limonens nur das R(+)-Terpineol aus R(+)-Limonen gebildet wurde, während das S(-)-Limonen wahrscheinlich auf anderem Wege metabolisiert wurde [28].

Von *Pseudomonas fluorescens* (NCIB 11671) wurde die selektive Transformation von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Pinen zu S-(+)-Carvon beschrieben [78].

Die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersuchte Limonentransformation durch den Basidiomyceten *P. sapidus* ergab beim Einsatz enantiomerenreiner Substrate für die im ersten Oxidationsschritt stattfindende Hydroxylierung zu cis/trans-Carveol eine vollständige Racemisierung. Dies ist anhand des enzymatischen Bildungsmechanismus der Carveole zu erklären, der vermutlich über ein Allylkation bzw. ein Allylradikal verläuft (vgl. 3.2.2.1). Abb. 3-16 zeigt die daraus resultierende Racemisierung von R(+)- bzw. S(-)-Limonen zu den Enantiomerenpaaren der cis- und trans-Carveole. In gleicher Weise könnte der Mechanismus auch über eine radikalische Stufe, wie sie bei Monooxygenasen auftritt (vgl. 3.2.5.2), formuliert werden. Die Racemisierung erfolgt hier durch die Umlagerung der 1-2-Doppelbindung des Limonens. Da es sich bei beiden möglichen Grenzstrukturen um sekundäre Allylkationen (bzw. -radikale) handelt, liegen die daraus gebildeten cis- und trans-Carveol-Enantiomere im Verhältnis 1:1 vor. Eine solche Doppelbindungsumlagerung trat in gleicher Weise bei der Bildung von cis/trans-p-2,8-Menthadien-1-ol aus Limonen auf. Sie führte hier jedoch bevorzugt zum stabileren tertiären Allylkation und dem daraus gebildeten Alkohol (Hydroxylierung von C-1), während eine direkte Hydroxylierung von C-3 nicht auftrat (vgl. 2.1.2, Abb.2-2).

Das bei *P. sapidus* beobachtete Produktspektrum läßt darauf schließen, daß der beteiligte Enzym-Substrat-Komplex, in dem das Substrat als Radikal oder Kation vorliegt, eine Umlagerung von Doppelbindungen zuläßt, weil möglicherweise die Stabilität der Enzym-Substrat-Bindung und die Reaktionsgeschwindigkeit nicht ausreicht, um dies zu verhindern.



**Abb. 3-16:** Bildung der cis-/trans-Carveol- und der Carvon-Enantiomere aus R(+)- bzw. S(-)-Limonen

### 3.2.4 Problematik der Terpenbiotransformationen

#### 3.2.4.1 Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit

Viele Terpene wurden aufgrund ihrer stark lipophilen Eigenschaften lange Zeit als „wasserunlöslich“ eingestuft. Tab. 3-5 zeigt, daß die Wasserlöslichkeit der Terpenkohlenwasserstoffe äußerst gering ist, wobei eine deutliche Zunahme von den Bicyclen  $\alpha$ -/ $\beta$ -Pinen über den doppelt ungesättigten Monocyclus Limonen bis zum Myrcen, einem dreifach ungesättigten Acyclus mit zwei konjugierten Doppelbindungen, festzustellen ist. Werden bei Biotransformationen Mengen oberhalb dieser Sättigungskonzentrationen eingesetzt, bilden die Terpene Emulsionen. Dadurch können Terpentropfchen in direkte Wechselwirkung mit dem transformierenden Organismus treten. Um eine gleichmäßige Dispergierung von Terpenen in der wäßrigen Phase auch oberhalb ihrer Sättigungskonzentration zu erreichen, können Tenside eingesetzt werden (vgl. 2.1.9.1.5).

Die einfach oxyfunktionalisierten Terpene weisen gegenüber den Kohlenwasserstoffen eine 10-100-fache Löslichkeit auf und liegen im Bereich von 300 bis fast 3000 mg L<sup>-1</sup>. Dabei ist die Löslichkeit von Alkoholen (Carveol, Myrtenol) im Vergleich zu den korrespondierenden Carbonylverbindungen (Carvon, Myrtenal) 3-6 mal größer, da die OH-Gruppe Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die Löslichkeit von Transformationsprodukten ist daher normalerweise nicht der limitierende Faktor für Terpenbiotransformationen.

**Tab. 3-5:** Wasserlöslichkeit einiger Terpenoide bei 25°C [79, 80]

|                                      | [mmol L <sup>-1</sup> ] | [mg L <sup>-1</sup> ] |  | [mmol L <sup>-1</sup> ] | [mg L <sup>-1</sup> ] |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|--|-------------------------|-----------------------|
| <i>(-)-<math>\alpha</math>-Pinen</i> | 0,037                   | 5,0                   | <i>(-)-<math>\alpha</math>-Pinenoxid</i> | 3,51                    | 534                   |
| <i>(-)-<math>\beta</math>-Pinen</i>  | 0,083                   | 11,3                  | <i>Carvon</i>                            | 3,97                    | 596                   |
| <i>R(+)-Limonen</i>                  | 0,15                    | 20,4                  | <i>(+)-Limonenoxid</i>                   | 4,53                    | 690                   |
| <i>Myrcen</i>                        | 0,22                    | 30,0                  | <i>(+)-Fenchol</i>                       | 5,37                    | 828                   |
| <i>Myrtenal</i>                      | 2,03                    | 305                   | <i>Myrtenol</i>                          | 6,63                    | 1010                  |
| <i>Nerol</i>                         | 2,15                    | 332                   | <i>(+/-)-Linalool</i>                    | 9,72                    | 1499                  |
| <i>Geraniol</i>                      | 2,62                    | 404                   | <i>(-)-Carveol</i>                       | 19                      | 2893                  |
| <i>1S(-)-Borneol</i>                 | 3,06                    | 472                   |  |                         |                       |

Neben der geringen Wasserlöslichkeit ist die Flüchtigkeit der Terpene eine weitere charakteristische Eigenschaft (Tab. 3-6). Dies führt besonders bei den C<sub>10</sub>-Kohlenwasserstoffen als Substraten dazu, daß bei aeroben Biotransformationsprozessen große Substratmengen über die Gasphase verloren gehen, da auf eine Belüftung der Kulturen nicht verzichtet werden kann.

Das  $\alpha$ -Pinen weist den größten Dampfdruck auf, da es durch seine bicyclische Struktur kompakter ist als das Limonen oder das Myrcen.

Eine Bestimmung der Substratmenge zur Erstellung einer Gesamtbilanz der Biotransformation war beim Pinen aus diesem Grund nicht möglich. Es konnte jedoch nach direkter Zugabe von  $\alpha$ -Pinen in den Kulturkolben (meist 2 x 100  $\mu$ l im Abstand von 24 h) schon 3 Tage nach der letzten Terpenzugabe nur noch 8% und nach 7 Tagen gar kein Substrat mehr in der wäßrigen Phase nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2-14)

Bei der Gasphasendosierung von Limonen ergab eine Bilanzierung der Gasphasenverluste (s. Abb. 2-8), daß innerhalb von 2 Tagen Transformationsdauer 24,5 % des dem Gasphasenreservoir zugesetzten Limonens (500  $\mu$ L) über die Gasphase verloren gingen.

Die Dampfdrücke der Monoterpenalkohole betragen nur 1-5% der Dampfdrücke der Kohlenwasserstoffe. Ihre geringere Flüchtigkeit, verbunden mit der besseren Wasserlöslichkeit, bewirkt, daß die Verluste aus wäßriger Lösung z.B. im Verlauf von Biotransformationen relativ gering sind. So betragen die Verluste an Myrtenol, Verbenol und Verbenon innerhalb von 7 Tagen 10-20% der Anfangskonzentrationen von 10-11 mg L<sup>-1</sup> (Abb. 2-20). Vom Terpenaldehyd gingen dagegen innerhalb dieser Zeit 30% verloren. Dies ist sowohl auf die leichtere Flüchtigkeit von Aldehyden zurückzuführen als auch auf mögliche Reaktionen der Aldehydgruppe mit nukleophilen Bestandteilen aus dem Kulturmedium.

Die Verluste an Carveol und Carvon (Anfangskonzentrationen von 50-55 mg L<sup>-1</sup>) betragen nach 7 Tagen ca. 8% des Carveols und 11% des Carvons, nach 18 Tagen waren es ca. 15 % des Carveols und 35% des Carvons (Abb. 2-21). Ursache für die schnellere Abnahme der Carvon-Konzentration ist die leichtere Flüchtigkeit und die schlechtere Wasserlöslichkeit des Terpenketons im Vergleich zum Alkohol.



**Tab. 3-6:** Dampfdrücke einiger Terpenoide und organischer Lösungsmittel (25 °C)

| (aus [79])               | [kPa] | (aus [81])   | [kPa] |
|--------------------------|-------|--------------|-------|
| (-)- $\alpha$ -Pinen     | 0,47  | Hexan        | 20    |
| Myrcen                   | 0,25  | Cyclohexan   | 13    |
| R(+)-Limonen             | 0,20  | Benzen       | 12,7  |
| (-)- $\alpha$ -Pinenoxid | 0,15  | Heptan       | 6,1   |
| (+)-Limonenoxid          | 0,08  | Toluen       | 3,8   |
| (+)-Fenchol              | 0,01  | Octan        | 1,9   |
| 1S(-)-Borneol            | 0,01  | Cyclohexanon | 0,53  |
| Carvon                   | 0,01  | p-Cymen      | 0,19  |
| Carveol                  | 0,003 | Cyclohexanol | 0,1   |

### 3.2.4.2 Reaktionen von Terpenen in wäßrigen Lösungen und Substratblindwerte

$\alpha$ -Pinen und andere ungesättigte Terpenkohlenwasserstoffe unterliegen unter Sauerstoffeinfluß der *Autoxidation* zu Verbindungen, wie sie auch bei der enzymatischen Oxidation auftreten können. Typische Autoxidationsprodukte sind trans-Pinocarveol, trans-Verbenol, trans-Carveol, Verbenon, Myrtenal und  $\alpha$ -Pinenoxid. Letzteres kann in leicht sauren wäßrigen Lösungen schnell zum trans-Sobrerol hydratisiert werden.

Die Autoxidation erfolgt bei den Terpenen, ähnlich wie bei ungesättigten Fettsäuren, durch intermediäre Bildung allylischer Hydroperoxide, die durch Folgereaktionen (Reduktion, Umlagerung, Dehydratisierung) zu den o.g. Produkten umgesetzt werden können [82].

Daneben können in wäßrigen, sauren Kulturmedien, z.B. bei Biotransformationen durch Pilze, auch *säurekatalysierte Hydratisierungen* und *Umlagerungen* auftreten.

Hydratisierungsprodukte von  $\alpha$ -Pinen sind  $\alpha$ -Terpineol (unter Ringöffnung) sowie in geringerem Maße  $\alpha$ -Fenchol und Borneol (unter Aufweitung des 4-Rings zum 5-Ring), Umlagerungsprodukte sind Camphen, Limonen und Terpinolen.

Hydratisierungsprodukte von Limonen sind  $\alpha$ -Terpineol, und  $\beta$ -Terpineol, Umlagerungsprodukte sind  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen, p-Cymen, und Terpinolen [83, 84].

Bei Untersuchungen der Biotransformationen von Terpenen muß daher ein besonderes Augenmerk auf die Art und Menge der im Substrat als Verunreinigungen enthaltenen

und der nichtenzymatisch während der Transformation gebildeten Produkte gerichtet werden, um diese von Biotransformationsprodukten zu unterscheiden.

Die Untersuchung der Substratreinheit von verschiedenen  $\alpha$ -Pinenen ergab, daß bereits hier deutliche Unterschiede bestehen. Aufgrund der verwendeten Substratmengen von  $2 \times 100 \mu\text{L}$  pro  $100 \text{ mL}$  (insgesamt  $1716 \text{ mg L}^{-1}$ ) bei den Pinentransformationen würden sich z.B. aus den Blindwerten für (+/-)- $\alpha$ -Pinen I (s. Tab. 2-6) im Kulturmedium Gehalte von  $0,34 \text{ mg L}^{-1}$  für trans-Verbenol und  $0,17 \text{ mg L}^{-1}$  für Verbenon und Myrtenal allein aus dem eingesetzten Substrat ergeben.

Für die Pinen-Transformationen wurde auch die pH-Wert-Abhängigkeit der Blindwerte ausführlich untersucht (2.1.5.2). Die mengenmäßig größte Bedeutung hatte das Hydratisierungsprodukt  $\alpha$ -Terpineol, das bei den pH-Werten 3,0 und 3,5 in Mengen von  $1-4,5 \text{ mg L}^{-1}$  auftrat (Abb. 2-10).

Als Autoxidationsprodukte traten trans-Verbenol, Verbenon und Myrtenal auf. Während die Myrtenol- und Verbenongehalte nur zwischen  $0,1$  und  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  lagen, wurden beim trans-Verbenol bei pH-Werten von 5,0-7,0 Mengen zwischen  $2,5$  und  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  gemessen. Bei niedrigeren pH-Werten blieben die Konzentrationen geringer, wahrscheinlich wegen eines säurekatalysierten Abbauschrittes.

Pilzmyzel weist einen beträchtlichen Speichereffekt für schlecht wasserlösliche Terpene auf (vgl. 2.1.4). Dies könnte eine Erhöhung von Blindwerten zur Folge haben, weil durch diese Speicherung trotz Gasphasenverlusten eine Terpensättigung in der wäßrigen Phase über längere Zeit durch einen Substratübergang aus der Myzelphase gewährleistet werden könnte. Dies würde die nichtenzymatischen Reaktionen in der wäßrigen Phase begünstigen. Je nach Gesamtmenge an Myzel und nach Menge der darin enthaltenen Membranlipide kann durch die bevorzugte Löslichkeit in der Myzelphase allerdings auch die Substratkonzentration in der wäßrigen Phase herabgesetzt werden. Dies hätte dann eine Verringerung der Blindwerte zur Folge.

Die zweite Annahme wurde durch den Vergleich der Pinengehalte im myzelfreien sowie im myzelhaltigen Medium von *P. sapidus* gestützt (Abb. 2-14). Im myzelfreien Ansatz wurde nach zweimaliger Pinenaddition ein maximaler Gehalt von  $320 \text{ mg L}^{-1}$  erreicht, der 3 Tage später auf etwa  $20 \text{ mg L}^{-1}$  abgenommen hatte. Im myzelhaltigen Blindwert führte dagegen der Speichereffekt trotz gleicher Pinendosis zu einer Abpufferung der

Pinenkonzentration in der wäßrigen Phase, so daß hier eine Konzentration von 1-3 mg L<sup>-1</sup> aufrechterhalten wurde.

Die Myzelblindwerte für verschiedene Pilze bei pH 5,0 (Abb. 2-15 bis 2-19) waren demzufolge für trans-Verbenol mit einem Maximalwert von 0,9 mg L<sup>-1</sup> (bei *G. applanatum*) deutlich niedriger als die myzelfreien Blindwerte. Myrtenol lag mit 0,1 mg L<sup>-1</sup> ähnlich wie ohne Myzel und Verbenon mit einem Maximalwert von 0,22 mg L<sup>-1</sup> etwas höher.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß bei pH-Werten >4 nur trans-Verbenol in größeren Mengen gebildet wurde. Da es sich dabei jedoch um ein wichtiges Produkt der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch Basidiomyceten handelt, war eine *quantitative* Einbeziehung des Substratblindwertes notwendig. Dies muß bei allen Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen beachtet werden.

Bei der Citronelloltransformation wurde das Hydratisierungsprodukt 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol bei sehr niedrigen pH-Werten (hier pH 2,5) in bedeutenden Mengen gebildet (vgl. Abb. 2-100). In geringeren Mengen von 0,2-0,5 mg L<sup>-1</sup> waren einige Autoxidationsprodukte (3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol, 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol, 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol) sowie geringe Mengen an Rosenoxiden nachweisbar (s. Tab. 2-13).

### 3.2.4.3 Terpentoxizität in Mikroorganismen

#### 3.2.4.3.1 Die toxische Wirkung von Terpenen

Die antimikrobielle Wirkung der etherischen Ölen vieler Pflanzen ist in fast allen menschlichen Kulturen schon seit langem bekannt. Die darin enthaltenen Terpenoide sind gut lipidlöslich und lösen sich daher auch sehr gut in den Membranen von Mikroorganismen [85]. Dies wurde für Basidiomyceten durch die getrennte Untersuchung von Myzel und Medium der  $\alpha$ -Pinen- bzw. Limonen-supplementierten Kulturen von *P. sapidus* bestätigt (s. Tab. 2-5, Abb. 2-4 und Abb. 2-6). Eine Separation von Zellwand und Membranmaterial war mit den durchgeführten Experimenten zwar nicht möglich. Eine Trennung des Myzels in eine Membran/Zellmaterial-Fraktion und eine cytosoli-

sche Fraktion (Abb. 2-5) zeigte jedoch eindeutig die bevorzugte Löslichkeit (90% des  $\alpha$ -Pinen) in der Fraktion, welche die Membranbestandteile enthielt.

Als Maß für die Verteilung von lipophilen Substanzen zwischen einer wäßrigen und einer organischen Phase (hier der Lipidmembran) wird häufig der dekadische Logarithmus des n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (=  $\log P$ ) verwendet.

Tab. 3-7 zeigt die  $\log P$ -Werte für verschiedene Monoterpenoide sowie einige organische Lösungsmittel. Hydrophile Lösungsmittel mit  $\log P$ -Werten  $<1$  (z.B. kurzkettige Alkohole) sind so gut wasserlöslich, daß ihre Konzentration in den Membranen und damit auch ihre Membrantoxizität gering ist.

Sehr hydrophobe Lösungsmittel mit  $\log P$ -Werten  $>5$  sind ebenfalls wenig membrantoxisch (z.B. Hexadecan, Pflanzenöle), da sie einerseits aufgrund ihrer Molekülgröße nicht so leicht in die Lipiddoppelschicht der Membran eindringen können und sich außerdem aufgrund ihrer langkettigen, den Membranlipiden ähnlichen Raumstruktur parallel zwischen die Phospholipidmoleküle der Membran lagern können und dadurch die Membranintegrität weniger beeinflussen als kleinere, nichtlineare Moleküle.

**Tab. 3-7:**  $\log P$ -Werte von Monoterpenen [86] und organischen Lösungsmitteln [87, 88]

| Monoterpene              |          | verschiedene Lösungsmittel |          |
|--------------------------|----------|----------------------------|----------|
|                          | $\log P$ |                            | $\log P$ |
| R(+)-Limonen             | 4,83     | Methanol                   | -0,76    |
| (-)- $\alpha$ -Pinen     | 4,27     | Ethanol                    | -0,28    |
| (-)- $\beta$ -Pinen      | 4,35     | Benzen                     | 2,13     |
| Myrcen                   | 4,88     | Toluen                     | 2,48     |
| 1S(-)-Borneol            | 2,85     | Hexan                      | 3,50     |
| (+)-Fenchol              | 2,85     | Decan                      | 5,60     |
| (-)- $\alpha$ -Pinenoxid | 2,87     | Olivenöl                   | 7,5      |
| (+)-Limonenoxid          | 3,43     | Hexadecan                  | 8,80     |
| (-)-Carveol              | 3,29     |                            |          |
| (+/-)-Linalool           | 3,38     |                            |          |

Solche Moleküle, die im log-P-Bereich zwischen 1 und 5 liegen, weisen die größten Toxizitäten auf [87]. Sie lösen sich bevorzugt im Innern der Lipiddoppelschicht und lassen diese anschwellen. [89]. Neben den monocyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und den kurzkettigen Alkanen gehören auch die Monoterpenkohlenwasserstoffe sowie die einfach funktionalisierten Monoterpenoide in die Gruppe dieser toxischen Substanzen.

Außer den log P-Werten haben auch die Eigenschaften der Membran sowie die Struktur der gelösten Moleküle Einfluß auf die Toxizität. So weisen Aromaten mit hydrophilen Substituenten (z.B. Phenol, log P=1,45) eine viel größere Membrantoxizität auf als reine Kohlenwasserstoffe mit ähnlichem log P (z.B. Benzen), weil ihre amphiphile Struktur denen der Membranphospholipide ähnlich ist.

Die Permeabilität der Zelle für organische Lösungsmittel wird hauptsächlich durch die Zusammensetzung und den Aufbau der Cytoplasmamembran bestimmt, während die Zellwand als Barriere für diese Substanzen kaum eine Rolle spielt [90].

Wenn ein Lösungsmittel sich in der Membran gelöst hat, bewirkt es dort eine Zerstörung der Membranintegrität und damit auch der Membranfunktion. Die Membranfläche wird vergrößert und die Membranfluidität (=reziproke Viskosität) nimmt zu.

Eine Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Lösungsmittel in Biomembranen führte zu dem Ergebnis, daß ein kritische Membrankonzentration (*critical membrane concentration*) von  $200 \text{ mmol L}^{-1}$ , unabhängig von der Art der toxischen Substanz, einen vollständigen Verlust an Bioaktivität bewirkt [88].

Die Zerstörung der Membranintegrität führt zu einer Hemmung oder Entkopplung der Elektronentransportkette, dies wiederum bewirkt einen Zusammenbruch von Protonengradienten und letztlich der Atmungskettenphosphorylierung [87], so daß der Energiestoffwechsel der Zelle zum Erliegen kommt. Die Erhöhung der Membranfluidität kann außerdem zu einer Zerstörung membrangebundener Enzymkomplexe führen. Die Interaktion des membrangebundenen Enzymkomplexes von Cytochrom-P450 mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase erfordert einen vergleichsweise langlebigen Komplex, um einen Elektronenübergang zu ermöglichen. Wird dies durch die Membranschädigung verhindert, wird dadurch das Cytochrom-P450-System inaktiviert [91].

Liegen Lösungsmittel in großem Überschuß vor, so kann sich eine zweite organische Phase um die Zelle herum ausbilden, die zu einer vollständigen Zerstörung der Membran und zu einem Verlust des Zellinhalts führen kann [88]. Dieser Toxizitätsmechanismus wird auch als „Phasentoxizität“ bezeichnet und damit von der oben erläuterten „molekularen Toxizität“ unterschieden, die auch schon unterhalb der wäßrigen Sättigungskonzentration des Lösungsmittels auftreten kann.

Bei lösungsmitteltoleranten *Pseudomonas putida*-Stämmen wurden Resistenzmechanismen festgestellt, die einer Erhöhung der Membranfluidität durch toxische Lösungsmittel entgegenwirken. Die Isomerisierung von cis- zu trans-Fettsäuren erwies sich hier als effektiver Mechanismus, der zur Aufrechterhaltung einer für die Zelle günstigen Membranfluidität führt. Der Vorgang ist durch eine Isomerase katalysiert. Die gebildeten trans-Fettsäuren haben eine geradkettige Struktur und stabilisieren die Membran besser als die cis-Fettsäuren, die einen Knick in ihrer Molekülstruktur aufweisen und deshalb die parallele Anordnung der Acylreste der Phospholipide in den Lipiddoppelschichten der Membranen stören [87, 92].

Die Erhöhung des Gehaltes an gesättigten Fettsäuren in den Membranen [93], wie sie auch bei der Temperaturadaption von anderen Mikroorganismen stattfindet [94], tritt bei toxischen organischen Lösungsmitteln ebenfalls auf, und führt aufgrund der geradkettigen all-trans-Struktur der gesättigten Fettsäuren – wie die cis-trans-Isomerisierung – zu einer Abnahme der Membranfluidität.

#### 3.2.4.3.2 Substrattoxizität

Die Untersuchung von *P. sapidus* ergab eine geringe Terpentoleranz (2.1.7.1). Die in den Transformationsversuchen eingesetzte hohe Dosis von 2 x 100 µL pro 100 mL Kultur (=2 x 858 mg L<sup>-1</sup>) lag bei weitem über der wäßrigen Sättigungskonzentration (vgl.

Tab. 3-5). Dies führte nicht nur zu einer vollständigen Wachstumshemmung, sondern es trat auch starke Abnahme der Trockenmasse um bis zu 10 g L<sup>-1</sup> auf. Unterschiede zwischen den verschiedenen Terpenkohlenwasserstoffen α-Pinen, β-Pinen und Limonen waren nicht feststellbar.

Die Trockenmasseabnahme ist wahrscheinlich auf eine Zerstörung von Zellmembranen zurückzuführen, die durch die extraktive Wirkung der in der wäßrigen Phase emulgierten Terpentropfchen bedingt ist (Phasentoxizität, s.o.). Dadurch wird ein Teil des Zellinhaltes in das Kulturmedium abgegeben. Erst nachdem die Membrankonzentration der Terpensubstrate durch Gasphasenverluste und durch die Biotransformation so weit wieder abgenommen hat, daß keine toxische Wirkung mehr gegeben ist (ca. 2 Tage nach der letzten Substrataddition), wachsen die Kulturen wieder an (Abb. 2-22).

Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der  $\alpha$ -Pinentoxizität bei *P. sapidus* und *G. applanatum* ergab keine Wachstumshemmung für Konzentrationen bis  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Abb. 2-23 und 2-24). Bei  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  trat jedoch bei beiden Pilzen eine Abnahme der Trockenmasse auf. Für eine nähere Betrachtung des Konzentrationsbereiches bis  $500 \text{ mg L}^{-1}$  wurde Tween 80 als Tensid zur besseren Emulgierung des  $\alpha$ -Pinens eingesetzt. Dies ergab bei 5 verschiedenen Pilzen deutliche stammspezifische Unterschiede (Abb. 2-25 bis 2-29).

*G. applanatum* zeigte bei  $250$  und  $500 \text{ mg L}^{-1}$  kein Wachstum mehr. *T. hirsuta* und *G. frondosa* zeigten bei zunehmender Konzentration eine Abnahme des Wachstums, jedoch betrug die Trockenmassezunahme auch bei  $500 \text{ mg L}^{-1}$  noch ca. 15-25% des Wachstums ohne Pinenzusatz. Als unempfindlich erwies sich *M. giganteus*, der auch bei  $500 \text{ mg L}^{-1}$  noch keinen negativen Einfluß auf Trockenmassezunahme und Glucoseverbrauch erkennen ließ. *P. sapidus* war bezüglich der Trockenmasse der empfindlichste Pilz. Schon  $50 \text{ mg L}^{-1}$  bewirkten ein geringeres Wachstum,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  führten zu einer deutlichen Zellschädigung, erkennbar an der Abnahme der Trockenmasse.

Trotz der für diesen Pilz ungünstigen Terpentoleranz erwies er sich in Bezug auf die Terpenttransformationseigenschaften günstiger als die anderen Pilze. *T. hirsuta* und *M. giganteus* zeigten sehr gutes Wachstum und in einigen Versuchen auch gute Produktbildung, im Vergleich mehrerer Versuchsreihen war aber die Produktbildung nicht ausreichend reproduzierbar. *G. frondosa* wuchs sehr langsam und die Produktbildung war gering, während *G. applanatum* schnell wuchs und die Produktbildung geringer war als bei *P. sapidus*, aber ähnlich reproduzierbar.

Für die Mehrzahl der Versuche wurde daher *P. sapidus* aufgrund seiner besseren Transformationseigenschaften verwendet.

Wurden bei der  $\alpha$ -Pinentransformation durch *P. sapidus* zur Minimierung der Substrattoxizität kleinere Substratmengen dosiert (2.1.9.1.1, Abb. 2-49, 2-50), so verringerte sich die Transformationsrate deutlich. Auch die Länge der Transformationsphase wurde nicht erhöht, sondern betrug immer maximal 4 Tage. Eine Verringerung der Toxizität durch kleinere Substratmengen erwies sich folglich bei diesem Pilz in Bezug auf die Terpententransformation als ungünstig, weil sie nicht zu einer verbesserten Transformationsleistung führte.

Bei dem Monoterpenalkohol Citronellol wurde ebenfalls eine stark toxische Wirkung festgestellt. Die einmalige Addition von 50  $\mu\text{L}$  des Substrates zu 100 mL Kulturvolumen ( $=427 \text{ mg L}^{-1}$ ) führte bei *C. carcharias* zu einer starken Zellschädigung und Trockenmasseabnahme (vgl. Abb. 2-109). Aufgrund des geringeren Dampfdruckes von Citronellol, traten hier kaum Gasphasenverluste auf, so daß im Gegensatz zu den Kohlenwasserstoffen eine toxische Wirkung auch bei einmaliger Fütterung über die gesamte Transformationsdauer anhielt. Eine Verringerung der Substratdosis ging bei Citronellol mit einer verbesserten Transformationsleistung einher, so daß eine Zugabe von 2 x 20  $\mu\text{L}$  pro 100 mL ( $=341,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) einen fast vollständigen Umsatz zum Triol ergab (vgl. z.B.

Abb. 2-113). Bei dieser Substratmenge blieb die Trockenmasse über den Transformationsverlauf konstant. Dies ist außer auf die geringere Substratdosis ( $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$  Citronellol im Vergleich zu  $12,6 \text{ mmol L}^{-1}$   $\alpha$ -Pinen) auf die bessere Wasserlöslichkeit des Citronellols im Vergleich zu den Kohlenwasserstoffen zurückzuführen, die zu einer geringeren Konzentration im Myzel und damit in den Membranen führte (vgl. 2.2.4). Im Gegensatz zu den Kohlenwasserstofftransformationen durch *P. sapidus* konnte *C. carcharias* bei Wahl der optimalen Substratmenge eine gute Transformationsleistung bei konstanter Trockenmasse aufrechterhalten und die toxischen Wirkungen konnten ohne Verlust an Transformationsleistung minimiert werden.



### 3.2.4.3.3 Produkttoxizität

Die Produkttoxizität wurde für niedrige Konzentrationen von Verbenol und Verbenon (bis  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , s. 2.1.7.2) sowie für höhere Konzentrationen von Carveol und Carvon (bis  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , s. 2.1.7.3) untersucht. Die in diesen Experimenten zugesetzten Mengen führten bei *P. sapidus* nicht zu einem negativen Einfluß auf das Wachstum, eine Membranschädigung in diesem Konzentrationsbereich bis  $250 \text{ mg L}^{-1}$  (Carveol oder Carvon) trat also nicht auf.

Für die Produkte der Citronelloltransformation durch *C. carcharias* wurden keine separaten Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Bei Produktmengen bis zu  $866 \text{ mg L}^{-1}$  des Triols im Reaktorversuch (2.2.6, Abb. 2-134) war jedoch ein negativer Einfluß auf die Transformationsleistung nicht feststellbar.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Produkttoxizität im Vergleich zur Substrattoxizität aus folgenden Gründen keine Rolle spielt:

- Die Substratmengen der Kohlenwasserstoffe überwiegen die Produktmengen meist bei weitem und die Substratkonzentration in den Membranen ist weit höher als die Produktkonzentration (s. 2.1.4, Tab. 2-5, Abb. 2-6 und Abb. 2-8 ).
- Bei der Citronelloltransformation ist das Triol so gut wasserlöslich, daß nur eine geringe Membranlöslichkeit gegeben ist.

## 3.2.5 Enzyme der oxidativen Metabolisierung von Terpenen

### 3.2.5.1 Beteiligte oxidierende Enzyme

Enzyme, die eine direkte Einführung molekularen Sauerstoffes in die Substratmoleküle katalysieren, werden als Oxygenasen bezeichnet. Diese Oxygenierungsreaktionen können durch folgende Enzyme katalysiert werden:

Monooxygenasen fügen ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff in das Substratmolekül ein, während das andere Atom unter Verbrauch eines Donors (NADH oder NADPH) reduziert und zu Wasser umgesetzt wird. Aufgrund ihrer großen Bedeutung

für die Fremdstoffmetabolisierung sollen sie im nächsten Abschnitt (3.2.5.2) noch näher erläutert werden.

Dioxygenasen fügen simultan beide Sauerstoffatome aus O<sub>2</sub> in das Substrat ein. Auch wenn Dioxygenasen viele verschiedene Substrate oxidieren können, so konzentriert sich doch ihre Bedeutung für Biotransformationen vor allem auf die Dioxygenierung aromatischer Substrate. Die erhaltenen *cis*-Dihydrodirole werden meist über die Dicarbonsäuren weiter abgebaut. Besonders effektive Dioxygenierungen aromatischer Verbindungen sind von gramnegativen Bakterien bekannt, z.B. *Pseudomonas sp.* [95], *P. putida* [96], *P. fluorescens* [97], *Sphingomonas yanoikuyae* [98].

Reaktionen, die auf Dioxygenasen zurückzuführen sein könnten, wurden bei den in dieser Arbeit untersuchten Basidiomyceten nicht festgestellt und sind auch von anderen Pilzen bislang noch nicht bekannt.

Peroxidasen: Sie abstrahieren 1 Elektron vom Substratmolekül und übertragen es auf Wasserstoffperoxid oder andere Peroxide als Cofaktor. Das Substrat (Phenol, aromat. Amin, Aminophenol, Thiol) geht dabei in ein Radikalkation über, das durch Dimerisierung, Reaktion mit nukleophilen Substraten (Wasser, intramolekulare OH-Gruppe usw.) oder Umlagerung stabilisiert werden kann. Durch die Reaktion des Radikalkations mit sauerstoffhaltigen Nukleophilen kann auch Sauerstoff in das Substrat eingeführt werden. Auf die Bedeutung von Peroxidasen für Biotransformationen soll unten noch näher eingegangen werden (3.2.5.3).

Neben den oxygenierenden Enzymen sind noch folgende Enzyme für oxidative Biotransformationen wichtig:

Oxidasen: Sie übertragen 2 bzw. 4 Elektronen vom Substrat auf Sauerstoffmoleküle. Dabei wird Wasserstoffperoxid bzw. Wasser gebildet. Das Peroxid ist einerseits zytotoxisch (Zerstörung durch Katalase), kann aber auch als Cofaktor für andere Enzyme fungieren – z.B. für Peroxidasen. Die Beteiligung oxidasevermittelter Reaktionen an Terpenttransformationen durch Mikroorganismen wurde bislang noch nicht dokumentiert. Eine Oxidation von Terpenalkoholen zu den Ketonen und von dort weiter zu den Carbonsäuren ist jedoch denkbar.

Dehydrogenasen: Sie bewirken am Substrat die gleichen Oxidationen, wie die Oxidasen. Allerdings werden die dem Substrat entzogenen Elektronen von ihnen nicht auf Sauerstoff als Akzeptor übertragen, sondern auf NAD<sup>+</sup> als Coenzym (in einigen Fällen

fungieren auch  $\text{NADP}^+$  oder die Flavinnucleotide FMN oder FAD als Elektronenakzeptoren). Neben ihrer großen Bedeutung im Energiestoffwechsel der Zelle (Citratcyclus und Atmungskette) sind Dehydrogenasen auch als oxidative Enzyme im Rahmen von Biotransformationen bedeutsam. Beispielsweise wird die 1,2-Dehydrierung von Steroiden durch *Arthrobacter simplex* selektiv durch eine Steroid-1,2-Dehydrogenase katalysiert [99]. Über die Bedeutung von Dehydrogenasen bei Terpentransformationen ist ebenfalls noch wenig bekannt, eine Beteiligung an der Oxidation von Terpenalkoholen zu den Ketonen oder Aldehyden ist jedoch wahrscheinlich.

### 3.2.5.2 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen

Die Oxyfunktionalisierung von Terpenen oder anderen lipophilen Stoffen stellt in biologischen Systemen häufig eine Entgiftungsreaktion im Sinne einer Phase I-Metabolisierung dar. Ziel dieser Reaktionen ist es, lipophile Substrate besser wasserlöslich und damit besser ausscheidbar zu machen oder zumindest funktionelle Gruppen in nur wenig reaktive Verbindungen einzuführen, die in weiteren enzymatischen Reaktionen (Phase II-Reaktionen) dann mit hydrophilen Substanzen konjugiert werden können. Die wichtigsten Enzyme in diesem Prozeß sind die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen. Das aktive Zentrum dieser Enzyme enthält ein Häm-Molekül, dessen zentrales  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion eine stark elektrophile Bindungsstelle darstellt. Das Enzym greift daher an den elektronenreicheren Stellen der Substratmoleküle an und folgt damit den aus der organischen Chemie bekannten Regeln der elektrophilen Substitution.

Die Oxidation mit Cytochrom-P450-Monooxygenasen erfordert neben molekularem Sauerstoff noch eine NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, die im Verlaufe eines Oxidationscyclus NADPH verbraucht. Die beteiligten Enzyme liegen meist in der Membran des endoplasmatischen Reticulums als Enzymkomplex vor, jedoch sind auch einige cytosolische Cytochrom-P450-Monooxygenasen bekannt. Wird der Enzymkomplex zerstört (z.B. durch eine Membranschädigung), so wird das Cytochrom-P450-System inaktiviert (vgl. 3.2.4.3.1).

Die eigentliche Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat erfolgt im Verlauf des Oxidationscyclus über einen radikalischen Übergangszustand. Dies kann die bei allylischen Hydroxylierungen in dieser Arbeit häufig beobachteten Umlagerungen der Doppelbindungen erklären (vgl. 3.2.2.1).

Die verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme besitzen unterschiedliche, oft überlappende Spezifität, die es den Organismen ermöglicht, nahezu jede organische Substanz zu oxidieren. Während einige Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine hohe Spezifität besitzen (z.B. die am Steroidstoffwechsel beteiligten), weisen die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten eine geringere Substrat- und Reaktionsspezifität auf, da das Ziel dieser Reaktionen in erster Linie eine schnelle Metabolisierung und Entfernung aus dem Organismus ist, die keine enantiomerenreinen Produkte erfordert. Die Substrate und die Produkte sind dementsprechend vielfältig (Position der eingeführten Oxyfunktion, cis/trans- und optische Isomerie).

Folgende oxidative Reaktionen werden durch die verschiedenen Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert:

Hydroxylierung aliphatischer C-Atome: Die Hydroxylierung erfolgt bevorzugt an sekundären oder tertiären C-Atomen. Im Gegensatz zu nichtenzymatischen radikalischen Reaktionen ist die Reaktion an sekundären C-Atomen stärker begünstigt als an tertiären. Die Oxidation primärer C-Atome wird am wenigsten katalysiert. Durch Doppelbindungen in Allylstellung (Aromaten, Alkene, ungesättigte Terpene u.a.) sowie durch O- oder N-Substituenten in  $\alpha$ -Stellung wird die Oxidation an diesen Positionen begünstigt.

Epoxidierung von C-C-Doppelbindungen: Die Einführung von Sauerstoff ist nicht auf C-H-Bindungen ( $\sigma$ - $\sigma$ -Bindungen) beschränkt, sondern es werden auch Doppelbindungen ( $\pi$ - $\pi$ -Bindungen) angegriffen, die zu den entsprechenden Epoxiden (Oxiranen) führen. Diese Epoxide sind sehr elektrophile und reaktive Spezies, die durch Addition von Nucleophilen weiterreagieren können. Neben enzymatischen Reaktionen (Phase II-Metabolisierungen, hydrolasevermittelte Wasseranlagerung) kommen dabei ebenso nichtenzymatische Additionen in Frage: Wenn als Nucleophile bei diesen Reaktionen Proteine oder Nucleinsäuren (DNA, RNA) auftreten, so sind toxische Wirkungen die Folge. So ist auch die mutagene und kanzerogene Wirkung vieler Epoxide (z.B. von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen) zu erklären.

Außer Additionsreaktionen sind auch Umlagerungen zu Aldehyden oder Ketonen – gegebenenfalls unter Umlagerung des C-Gerüsts – häufig beobachtete Reaktionen der Epoxide. Sie können enzymatisch, durch Lyasen vermittelt (vgl. Abb. 3-11), oder auch nichtenzymatisch (z.B. Umlagerung von  $\alpha$ -Pinenoxid zu Campholenaldehyd, s. 3.2.2.3) ablaufen.

Oxidationen an Heteroatomen: Neben Oxidationen am C-Atom können durch Cytochrom-P450-Enzyme auch Oxidationen an Schwefelatomen (zu Sulfoxiden) und Stickstoffatomen (zu N-Hydroxy-Verbindungen bzw. N-Oxiden) katalysiert werden.

Einige weitere Reaktionen werden ebenfalls von Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert. Dazu zählen oxidative N-Dealkylierungen, oxidative Deaminierungen und oxidative Dehalogenierungen, die Bedeutung bei der Metabolisierung pharmazeutisch wirksamer Substanzen haben [100].

#### 3.2.5.3 Andere Monooxygenasen

Neben den Cytochrom-P450-Monooxygenasen, denen die meisten enzymatischen Hydroxylierungen und Epoxidierungen zugeschrieben werden, gibt es noch eine Reihe weiterer Monooxygenasen. Dazu zählen die flavinabhängigen Monooxygenasen, die Flavin als Cofaktor zur Aktivierung und Bereitstellung des in das Substrat eingeführten Sauerstoffes enthalten. Sie sind vor allem für Hydroxylierungen aromatischer Substrate bekannt, können aber neben N- und S-Oxidationen auch Baeyer-Villiger-Oxidationen von Ketonen katalysieren. Baeyer-Villiger-Oxidationen, wie sie von Terpentransformationen durch *P. putida* (3.2.2.6) bekannt sind, werden nur durch diese flavinhaltigen Monooxygenasen katalysiert, nicht jedoch durch Cytochrom-P450-abhängige.

Als weitere spezielle Oxidasen mit Bedeutung für Biotransformationen sind eisenhaltige Monooxygenasen zu nennen, deren aktives Zentrum im Gegensatz zu den Cytochrom-P450-Enzymen kein Häm enthält. Dazu gehört die Monooxygenase aus dem alkanmetabolisierenden Bakterium *Pseudomonas oleovorans*. Sie katalysiert die Epoxidierung terminaler Olefine und die Hydroxylierung terminaler Methylgruppen linearer Kohlenwasserstoffe [101].

#### 3.2.5.4 Peroxidasen

Peroxidasen spielen eine wichtige Rolle bei biologischen Oxidationen. Sie katalysieren die Oxidation einer großen Zahl organischer und anorganischer Verbindungen durch Wasserstoffperoxid oder andere Peroxide.

Peroxidasen sind sowohl bei Pflanzen als auch bei Pilzen wichtige Enzyme zur Oxidation von Phenolen aber auch von anderen Substraten. Die am besten untersuchte Peroxidase ist die Peroxidase aus Meerrettich. Sie benötigt einen hämhaltigen Cofaktor und oxidiert das Substrat durch einen Einelektronen-Transfer zum Radikalkation, das dann mit Nukleophilen zu hydroxylierten Verbindungen, zu Dimeren, oder – ausgehend von den Phenolen – zu den Chinonen reagieren kann.

Der Monoterpenalkohol Citronellol wurde unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase transformiert [102]. Ziel war es, über die allylische Hydroxylierung des Citronellols Rosenoxidvorstufen zu erhalten. Identifiziert wurden jedoch ausschließlich Produkte, bei denen die Doppelbindung oxidiert war. Neben dem auch bei der Transformation durch *C. carcharias* identifizierten Triol (**9**) wurden die durch Hydratisierung der Doppelbindung entstehenden Diole gefunden. Als Hauptprodukte bei dieser Transformation traten die schon genannten Produkte in methylierter Form auf. Dies war auf die Reaktionen des intermediär gebildeten Radikalkations mit Methanol aus dem Transformationspuffer zurückzuführen.

Große Bedeutung haben Peroxidasen bei ligninabbauenden Pilzen, eine Beteiligung dieser Enzyme an Terpenttransformationen konnte jedoch bislang noch nicht nachgewiesen werden. Die oxidativen Enzyme von Pilzen werden separat im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### 3.2.5.5 Der oxidative Metabolismus bei Pilzen

Der oxidative Metabolismus bei Pilzen ist einerseits für das Lignin als natürlichem Substrat und andererseits für eine große Zahl von Xenobiotika gut untersucht. Trotz der Vielfalt an bekannten Terpenttransformationen durch Pilze ist über die an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme bislang nur wenig bekannt.

Bei *Säugetieren* wird die Oxidation und die nachfolgende Eliminierung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und anderen Xenobiotika durch

Cytochrom-P450-Monooxygenasen, Epoxidhydrolasen, Glutathion-S-Transferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen vermittelt [103].

Über die Bedeutung und Funktion dieser Enzyme in *eukaryotischen Mikroorganismen* ist dagegen vergleichsweise wenig bekannt. Am besten untersucht wurde Cytochrom-P450 bisher bei Hefen ( z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) und es wurden hochaufgereinigte Enzyme gewonnen [104-106].

Auch in einer Reihe myzelbildender Pilzen wurde Cytochrom-P450 nachgewiesen. Gut untersucht ist der saprotrophe, zu den *niederen Pilzen* zählende Zygomycet *Cunninghamella elegans*, der zu Cytochrom-P450-vermittelten Oxidationen verschiedener Substrate (Naphthalen, Benz[*a*]anthracen, Biphenyl, Benzo[*a*]pyren, 3-Methylcholanthren) zu einer komplexen Mischung hydroxylierter und konjugierter Produkte fähig ist. Das Produktspektrum hat dabei große Ähnlichkeit mit den Produkten im Säugetiermetabolismus. Auch eine Epoxidhydrolaseaktivität wurde bei diesem Pilz nachgewiesen. Die ebenfalls identifizierten wasserlöslichen Konjugate (Glucuronide und Sulfatester von Naphthalen und Biphenyl) weisen auf das Vorhandensein von UDP-Glucuronosyltransferase- und Sulfotransferase-Aktivitäten hin [103, 107].

Bei *Cunninghamella bainieri* wurde ebenfalls eine Cytochrom-P450-Aktivität gefunden, die große Ähnlichkeit mit der in Säugetierlebern aufweist [108]. Der Zygomycet *Mortierella isabellina* ist zu sehr effektiven Hydroxylierungsreaktionen fähig (Epoxidierung von Doppelbindungen und nachfolgende Hydrolyse), deren oxidativer Schritt alle Charakteristika Cytochrom-P450-vermittelter Reaktionen aufweist [109].

Bei den *höheren Pilzen* wurden *imperfekte Pilze* der Gattung *Aspergillus* untersucht:

Bei *A. fumigatus* sind Cytochrom-P450-Aktivitäten an Hydroxylierungen von Benzo[*a*]pyren [110] und Steroiden [111] sowie Dealkylierungen von Atrazin [112] beteiligt. Bei *A. ochraceus* wurde eine mikrosomale Cytochrom-P450-Monooxygenase gefunden, die Benzo[*a*]pyren u.a. PAK sowie Steroide in Gegenwart von Sauerstoff und NADH hydroxyliert. PAK wie z.B. Benzo[*a*]pyren, 3-Methylcholanthren, und  $\beta$ -Naphthoflavon induzieren dieses Enzym [113].

Steroidhydroxylierungen durch Pilze sind z.T. von ökonomischer Bedeutung [114], und auch hier ist die Beteiligung von Cytochrom-P450 belegt [115, 116].

Bei den *Basidiomyceten* lag der Schwerpunkt der Untersuchungen bislang vor allem auf der Untersuchung extrazellulärer Phenolasen (Peroxidasen, Laccase, Tyrosinase) von Weißfäulepilzen, die wichtige Katalysatoren für den Abbau von Lignin sind. Dabei spielen Ligninperoxidasen (LNP) die wichtigste Rolle [117, 118]. Sie werden von Pilzen bevorzugt in nährstofflimitierten Medien (Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefellimitierung) gebildet. Besonders eine Stickstofflimitierung fördert den Ligninabbau, während er bei Stickstoffüberschuß nicht stattfindet.

Neben LNP wurden u.a. bei *Coriolus versicolor* eine Beteiligung von manganabhängigen Peroxidasen (MNP) sowie Phenoloxidasen (Laccase) am Ligninabbau festgestellt [119]. MNP katalysierte bei diesem Pilz außerdem die Oxidation von Phenanthren und Fluoren [120], Laccase oxidierte Anthracen und Benzo[*a*]pyren [121].

Meist sind es jedoch vor allem die Ligninperoxidasen, die neben der Oxidation von Lignin und anderen phenolischen Verbindungen auch die Umsetzung von Xenobiotika katalysieren. Sie sind in der Lage, PAKs mit Ionisationspotentialen  $<7,6$  eV zu oxidieren [122]. So oxidiert z.B. der ligninolytische Pilz *Bjerkandera* sp. Anthracen [123, 124], *Phanerochaete chrysosporium* transformiert eine Vielzahl PAK, 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT), polychlorierte Biphenyle, DDT [125, 126] und andere schwer abbaubare Verbindungen. Phenanthren wird durch diesen Pilz zu 7,7 % zu CO<sub>2</sub> mineralisiert [125], ist jedoch nicht Substrat von Ligninperoxidasen [127]. An der oxidativen Metabolisierung von Xenobiotika sind hier also höchstwahrscheinlich noch andere oxidative Enzyme beteiligt.

Diese Annahme wird auch durch Untersuchungen an *Pleurotus ostreatus* gestützt. Dieser ligninolytische Pilz bildet sowohl Laccase als auch Ligninperoxidase. Eine Korrelation der Enzymaktivitäten dieser Enzyme mit der Mineralisierung von Catechol, Phenanthren, Pyren, Benzo[*a*]pyren, Anthracen und Fluoren zu CO<sub>2</sub> konnte jedoch nicht festgestellt werden [128]. Die Cytochrom-P450-Inhibitoren SKF-525 A, Proadifen und Kohlenmonoxid hemmten die Oxidation von Phenanthren zum Phenanthren-*trans*-9,10-dihydrodiol in cytosolischen und mikrosomalen Fraktionen des Pilzes. Diese Ergebnisse belegen, daß am oxidativen Fremdstoffmetabolismus hier Cytochrom-P450 beteiligt ist, während die typischen ligninolytischen Enzymsysteme keine Rolle zu spielen scheinen [34].



Auch für *Pleurotus pulmonarius* wurde belegt, daß die Benzo[*a*]pyren-Hydroxylierung durch Cytochrom-P450 katalysiert wird. Sowohl in der cytosolischen als auch in der mikrosomalen Fraktion wurden im reduzierten Kohlenmonoxid-Bindungs-Spektrum Maxima bei 448 bzw. 450-452 nm gemessen. Beide Fraktionen zeigten bei Zusatz von Benzo[*a*]pyren typische Substratbindungsspektren und durch Kohlenmonoxid wurde die Hydroxylierung inhibiert [25]. Bei diesem Pilz führte der Zusatz von Mangan zum Kulturmedium zu einer Erhöhung der Aktivitäten der Peroxidasen und der Lipoxygenase sowie des Cytochrom-P450-Gehaltes. Damit verbunden war eine erhöhte Aktivität für die Dealkylierung und die Propylhydroxylierung von Atrazin. Diese Reaktionen können sowohl von Cytochrom-P450-Enzymen als auch von Peroxidasen katalysiert werden, so daß eine eindeutige Zuordnung der an der Transformation von Atrazin beteiligten Enzyme noch nicht möglich war [129, 130].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten nicht in erster Linie die Aufklärung der beteiligten Enzyme zum Ziel. Es sprechen jedoch einige Ergebnisse dafür, daß die durchgeführten Terpenttransformationen durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert werden:

Bei *C. carcharias* wurde eine signifikante Hemmung der Citronellol-Transformation durch SKF-525 A und Proadifen – zwei Cytochrom-P450-Inhibitoren – festgestellt (s. 2.2.5.5).

Bei allen untersuchten Pilzen wurde die Transformation 2,5 Tage nach Inokulation der experimentellen Kulturen – also noch in der Wachstumsphase – gestartet. Eine Peroxidaseaktivität tritt bei Pilzen jedoch im allgemeinen erst nach Auftreten eines Stickstoffmangels (in der Idiophase) auf, weil dadurch die Peroxidasen induziert werden.

Zusätzlich wurde festgestellt, daß auch ein früher Zeitpunkt der Substratzugabe zu deutlichen Transformationsleistungen führte (s. 2.1.9.1.2 und 2.2.5.9). Für *P. sapidus* wurde anhand der trockenmassespezifischen Transformationsraten (vgl. Abb. 2-53) eine hohe Anfangsaktivität mit einem Maximum nach 1 Kulturtag festgestellt, die zum Ende der Wachstumsphase hin abnahm.

Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Beteiligung von Ligninperoxidasen oder manganabhängigen Peroxidasen an den Terpenttransformationen.

Auch der Nachweis von Epoxiden als Transformationsprodukten, vor allem bei der Citronelloltransformation durch *C. carcharias* und *P. sapidus* und auch bei der Limo-

nenstransformation durch *C. carcharias*, deutet auf eine Beteiligung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen hin, da diese Produkte für peroxidasevermittelte Reaktionen nicht typisch sind.

### 3.2.5.6 Nichtoxidative fremdstoffmetabolisierende Enzyme in Pilzen

Epoxidhydrolasen katalysieren die Reaktion hochtoxischer und hochreaktiver Epoxide zu *trans*-Dihydrodiolen. Sie wurden bisher vor allem in Säugetierlebern untersucht und nehmen eine wichtige Position in der Detoxifikation von Xenobiotika ein [35]. Bei *Pleurotus ostreatus* wurde die Beteiligung von Epoxid-Hydrolase an der Oxidation von Phenanthren zum 9,10-Dihydrodiol nachgewiesen. Mit Cyclohexenoxid als Enzym-inhibitor wurde bei diesem Pilz eine Hemmung der Produktbildung erreicht [34].

Die Beteiligung von Glutathion-S-Transferasen, Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen, Glucosyltransferasen, N-Acetyltransferasen u.a. an der Metabolisierung von Fremdstoffen bei Pilzen ist möglich, die direkten Nachweise von Enzymaktivitäten und Produkten sind jedoch bisher nur in sehr wenigen Fällen gelungen.

Bei dem Zygomyceten *Cunninghamella elegans* wurde für Naphthol die Konjugation durch Aryl-Sulfotransferase zum Sulfat, durch UDP-Glucuronosyltransferase zum Glucuronid und durch UDP-Glucosyltransferase zum Glucosid sowie für 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen die Glutathion-Konjugation mittels Glutathion-S-Transferase dokumentiert [107].

Bei verschiedenen Basidiomyceten der Gattung *Crinipellis* wurden 6-Hydroxypyren-1-sulfat, Pyren-1,6-disulfat und Pyren-1-sulfat und bei *Marasmiellus ramealis* (einer *Crinipellis* nahe verwandten Gattung ) nur Pyren-1-sulfat als Produkte der Biotransformation von Pyren identifiziert. Eine direkte Messung von Enzymaktivitäten wurde jedoch hier nicht durchgeführt [131, 132].

Die Fähigkeit von *Cystoderma carcharias* zur Epoxidierung von Citronellol konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Identifizierung des Epoxids (**4**) nachgewiesen werden. Die Beteiligung einer Epoxidhydrolase an der darauf folgenden Umsetzung zum Hauptprodukt, dem 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol, konnte jedoch nicht belegt werden. Eine Hemmung der Epoxidhydrolyse durch Cyclohexenoxid trat nicht auf. Aufgrund der niedrigen pH-Werte im Kulturmedium (pH 3-4) konnte eine chemische Umsetzung des

Epoxids jedoch nicht verhindert werden, so daß eine Unterscheidung zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen Reaktionen nicht möglich war.

### 3.3 Optimierung von Terpenttransformationen durch Basidiomyceten

Die Auswahl von geeigneten Stämmen für eine bestimmte Biotransformation erfolgt im allgemeinen nach einem bezüglich der Transformationsbedingungen einheitlichen Screening-Verfahren. Daran schließt sich für die ausgewählten Organismen eine individuelle Optimierung der Transformationsbedingungen an. Dies erfordert sowohl die Wahl der günstigsten Umgebungsbedingungen für den transformierenden Organismus als auch die Optimierung der Substratdosierung sowie der Produktgewinnung, besonders im Falle toxischer, instabiler oder flüchtiger Substrate oder Produkte [14].

Die zunächst zu optimierenden *Umgebungsbedingungen* umfassen Parameter wie Medienzusammensetzung, Belichtung, Temperatur, Schüttelbedingungen und auch die Art der Vorkulturführung einschließlich der Adaption der verwendeten Organismen an das Transformationssubstrat. Ziel ist es, ein möglichst gutes Wachstum und eine möglichst hohe Enzymaktivität zu erreichen.

Die Optimierung der *Substratdosierung* umfaßt die Wahl der geeigneten Bedingungen zur Erzielung einer möglichst großen Produktausbeute in kurzer Zeit und unter Erhalt der Transformationsfähigkeit der eingesetzten Kulturen über einen möglichst langen Zeitraum.

Aus den Untersuchungen der Kohlenwasserstofftransformationen wurde *P. sapidus* und aus dem Screening von 21 Pilzsämmen für die Citronellooltransformation wurde *C. carcharias* für die weitere Optimierung ausgewählt.

### 3.3.1 Optimierung der Umgebungsbedingungen

#### 3.3.1.1 Einfluß der Medienzusammensetzung auf Terpenttransformationen

##### 3.3.1.1.1 Wachstumsmedien

Zur Optimierung der Wachstumsmedien wurden 12 verschiedene Medienparameter in einem Plackett-Burman-Design untersucht (s. Tab. 2-8). Als Optimierungskriterien wurden das Kulturwachstum (charakterisiert durch die Trockenmasse) und die gebildeten Mengen an Transformationsprodukten verglichen.

##### 3.3.1.1.1.1 Essentielle Nährstoffe von Pilzen

Pilze sind kohlenstoff-heterotrophe Organismen, benötigen zum Wachstum also organisch gebundenen Kohlenstoff. Die individuellen Nährstoffansprüche können für Pilze sehr unterschiedlich sein. Dies gilt vor allem für die Stickstoff-Quellen, die Vitamine sowie die essentiellen Mineralstoffe und Spurenelemente.

##### Kohlenstoff-Quellen:

Glucose ist eine Kohlenstoff-Quelle, die von allen Pilzen, bis auf wenige Ausnahmen, metabolisiert werden kann und die meist zu schnellem, unverzögertem Wachstum führt. Di-, Oligo- oder Polysaccharide als Kohlenstoff-Quellen erfordern dagegen häufig eine Adaptionszeit, bevor ein Wachstum auftritt, da zunächst hydrolytische Enzyme induziert und synthetisiert werden müssen. Diese nicht direkt verstoffwechselbaren Kohlenstoff-Quellen sind jedoch häufig besser als die Glucose geeignet, um Transformationen mit ruhenden, nichtwachsenden Zellen durchzuführen.

Hauptbestandteile des für die Medien-Variation eingesetzten Malzextraktes sind Maltose (ca. 52 %), Glucose (ca. 19%) und Dextrin (ca. 15%) [133]. Als Nebenbestandteile sind in diesem komplexen Zusatz u.a. Proteine (ca. 5%) enthalten.

### Stickstoff-Quellen:

Stickstoff wird im Pilzmetabolismus in seiner reduzierten Form als Aminostickstoff benötigt. Viele Pilze sind jedoch in der Lage, auch Stickstoff höherer Oxidationsstufen (Nitrat) aufzunehmen und enzymatisch zu reduzieren. Pilze, die nicht über die notwendigen Enzyme (Nitrat- und Nitritreduktase) verfügen, müssen Stickstoff in Form von Ammonium oder als organisch gebundenen Stickstoff aufnehmen – sie sind stickstoffauxotroph.

Das hier für die Kultivierungen eingesetzte Standardmedium (SNLH) enthielt Asparagin als Stickstoff-Quelle (und auch als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle). Pilze können aus einer aufgenommenen Aminosäure die anderen benötigten Aminosäuren durch Transaminierung gewinnen, daher ist die Gabe einer einzigen Aminosäure ins Medium für das Wachstum normalerweise ausreichend.

Komplexe Stickstoff-Quellen wie z.B. Pepton oder auch Hefeextrakt haben den Vorteil, daß die benötigten Aminosäuren direkt zur Verfügung stehen und eine Wachstumslimitierung minimiert wird. Aus diesem Grund wurde im faktoriellen Versuchsplan neben Hefeextrakt (enthält 65% Pepton aus Hefeprotein [134]) ein Universalpepton (Gemisch aus Casein-, Fleisch- und Sojamehlpepton) als komplexer Zusatz untersucht.

### Vitamine:

Obwohl die Pilze zur Biosynthese der meisten Vitamine in der Lage sind, treten auch hier Auxotrophien auf. Dies ist besonders für Thiamin und Biotin (vor allem bei einigen Ascomyceten) belegt. Auch wenn ein Pilzstamm ein bestimmtes Vitamin synthetisieren kann, so kann ein definierter oder komplexer Zusatz zum Medium zu einer Erhöhung der Stoffwechselaktivität und damit der Wachstums- oder Transformationseigenschaften führen. Aufgrund der zentralen Aufgaben der verschiedenen Vitamine im Pilzstoffwechsel (vgl. Tab. 3-8) muß eine ausreichende Vitaminversorgung bei den Biotransformationen durch Basidiomyceten sichergestellt werden.

**Tab. 3-8:** Bedeutung von Vitaminen im Pilzmetabolismus [133, 135]

| Vitamin                                    | Funktion                          | Aktive Form  |
|--|-----------------------------------|--|
| Thiamin                                    | Coenzym der Pyruvat-Decarboxylase | Thiaminpyrophosphat                                |
| Biotin                                     | Coenzym für Carboxylierungen      | kovalent über die Carboxylgruppe am Enzym gebunden |
| Nicotinsäure (Niacin),<br>Nicotinsäureamid | Coenzym für Dehydrogenasen        | NAD, NADP  |
| Panthsäure                                 | Coenzym für 2-C-Transfers         | Coenzym A  |
| Riboflavin                                 | Coenzym für Dehydrogenasen        | FMN, FAD   |
| Pyridoxin, Pyridoxal                       | Coenzym für Transaminierungen     | Pyridoxalphosphat,<br>Pyridoxaminphosphat          |
| Folsäure (oder p-Aminobenzoessäure)        | Coenzym für 1-C-Transfers         | Tetrahydrofolsäure                                 |
| Cyanocobalamin                             | Coenzym für Methyltransfers       | verschiedene Cobalamin-derivate                    |

Der Hefeextrakt im Standardmedium (SNLH) enthält die wichtigsten Vitamine, vor allem Niacin und Thiamin (vgl. Tab. 3-9). Mit der Erhöhung der Hefeextraktkonzentration und der Addition einer definiert zusammengesetzten Vitaminmischung (2.1.8.1, vgl.

Tab. 2-8) sollte überprüft werden, ob die Terpenttransformationen trotzdem noch durch Vitaminmangel limitiert wurden.

**Tab. 3-9:** Mittlere Vitamingehalte von Hefeextrakt [133]

| Vitamin    | Gehalt [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] |
|------------|---------------------------------|
| Thiamin    | 50                              |
| Riboflavin | 35                              |
| Niacin     | 550                             |
| Pyridoxin  | 25                              |
| Panthsäure | 100                             |
| Biotin     | 2                               |

### Essentielle Mineralstoffe und Spurenelemente:

Zu den essentiellen Mineralstoffen (Makroelementen) werden bei Pilzen die Elemente gezählt, deren Konzentration im Nährsubstrat für eine optimale Stoffwechselaktivität mindestens  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  betragen muß. Dazu zählen neben dem schon diskutierten Stickstoff und Kohlenstoff zusätzlich Kalium, Phosphor, Schwefel und Magnesium, deren Aufgaben im Pilzstoffwechsel der Tab. 3-10 zu entnehmen sind. Ihre Konzentrationen wurden bei der Medienuntersuchung variiert (bei Schwefel vor allem über den Gehalt an  $\text{MgSO}_4$ ).

Die Essentialität von Calcium für Pilze ist nicht eindeutig geklärt. Es wird aufgrund seiner allgemeinen Bedeutung für Enzymaktivierung, Membranstruktur und als Signalstoff in den Zellen jedoch meist zu den essentiellen Mikroelementen gezählt, die im Nährsubstrat von Pilzen in Konzentrationen von  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  oder weniger enthalten sein müssen. Da es dem Standardmedium nicht zugesetzt wird, wurde es bei der Medienvariation zusätzlich eingesetzt.

Zu den Mikroelementen zählen auch Eisen, Mangan, Kupfer, Zink und Molybdän. Im Zusammenhang mit Oxyfunktionalisierungen sind hier besonders Mangan (als Bestandteil von manganabhängigen Peroxidasen) und Eisen (als Bestandteil von Cytochromen und Peroxidasen) interessant. Ihre Konzentration wurde durch unterschiedliche Mengen an Spurenelementlösung variiert.

**Tab. 3-10:** Essentielle Mineralstoffe und Spurenelemente in Pilzen [135]

| Element              | metabolisierbare Form                 | Funktion   |
|----------------------|---------------------------------------|--|
| <u>Makroelemente</u> |                                       |  |
| Kalium               | KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Ionengleichgewicht, Enzymaktivität, Kohlenhydrat-metabolismus                              |
| Phosphor             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | Nukleinsäuren, Energietransfer, intermediärer Stoffwechsel, Membranlipide                  |
| Magnesium            | MgCl <sub>2</sub>                     | Enzymaktivierung, ATP-Metabolismus   |
| Schwefel             | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>        | Aminosäuren, Vitamine und andere SH-Verbindungen   |
| <u>Mikroelemente</u> |                                       |  |
| Calcium              | CaCl <sub>2</sub>                     | Cofaktor von Enzymen (z.B. Proteasen), Membranstruktur                                     |
| Eisen                | FeCl <sub>3</sub> , FeSO <sub>4</sub> | Cytochrome, andere häm-haltige Enzyme, Pigmente  |
| Kupfer               | CuSO <sub>4</sub>                     | Laccase, Enzymaktivität, Pigmente  |
| Mangan               | MnCl <sub>2</sub>                     | Mn-abhängige Peroxidasen Cofaktor verschiedener Enzyme, Citratcyclus, Nukleinsäuresynthese |
| Zink                 | ZnCl <sub>2</sub>                     | Enzymaktivität, Intermediärmetabolismus von organischen Säuren                             |
| Molybdän             | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>      | Enzymaktivität, Nitratmetabolismus, Cyanocobalamin   |

### 3.3.1.1.1.2 Einflüsse der Medienzusammensetzung auf Wachstum und Terpententransformationsleistung

#### Limonen-Transformation durch *P. sapidus*:

Für *P. sapidus* wurde ein leicht positiver Wachstumseffekt von Pepton, Hefeextrakt und Calcium festgestellt (vgl. 2.1.8.1, Abb. 2-34). Bei Limonenzugabe führte die Membranschädigung jedoch dazu, daß nur noch für Hefeextrakt ein positiver Wachstumseffekt feststellbar war (Abb. 2-35).

Die Mengen an Carveol und Carvon, betrachtet nach 24 h Transformationsdauer wurden durch Glucose, Malzextrakt und Pepton leicht erhöht (Abb. 2-36 und 2-37). Bei der Va-



riation der Mengen dieser Medienbestandteile wurden jedoch nur in den ersten 24 h der Transformation geringe Effekte festgestellt (Abb. 2-38 bis 2-40).

Kalium wies bei *P. sapidus* in Konzentrationen weit über den Konzentrationen des Standardmediums (ab ca.  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ , vgl. Abb. 2-41) einen signifikanten negativen Effekt auf die Transformationsleistung auf. Kalium ist für Pilze essentiell und hat u.a. Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts in den Pilzzellen (Tab. 3-10). Für dieses Kation sind bei Ascomyceten der Gattung *Neurospora* ein aktiver Transportmechanismus bekannt. Eine zu hohe Kaliumkonzentration im Medium führt möglicherweise zu einer Störung des Ionengleichgewichtes und dadurch zu einer Verminderung der Transformationsaktivität.

#### Citronellol-Transformation durch *C. carcharias*:

*C. carcharias* erwies sich bei vorsichtiger Dosierung des Substrates als sehr effektiver Terpententransformierer. Schon im Standardmedium (SNLH-Medium) war eingesetztes Substrat meist ca. 2 Tage nach der letzten Zudosierung vollständig umgesetzt (s. Abb. 2-113). Dies deutet auf eine hohe Grundaktivität der terpententransformierenden Enzyme hin.

Eine Optimierung der Medienzusammensetzung konnte daher zwei verschiedene Ziele haben:

1. Verlagerung des Produktspektrums hin zum Rosenoxid-Precursor-Diol und dadurch eine Erhöhung der Rosenoxid-Bildung,
2. weitere Verbesserung der Transformationsgeschwindigkeit hin zum Triol.

Das Plackett-Burman-Design führte bei dieser Transformation zu dem Ergebnis, daß eine Verbesserung der Diol- und Rosenoxidbildung durch Variation der Medienzusammensetzung nicht möglich war.

Aufgrund der bereits hohen Transformationsleistung konnte auch die Triolbildung auf diesem Wege nicht weiter verbessert werden, weil wahrscheinlich mit dem Standardmedium (SNLH) die Kapazität der Pilzzellen zur Bildung der beteiligten Enzyme bereits ausgeschöpft war.

Calcium schien im Designversuch einen gewissen positiven Einfluß auf die Diolbildung aufzuweisen. Eine separate Untersuchung des Calciumeinflusses auf die Produktbildung

des Diols (6) und des Triols (9) ergab jedoch, daß ein signifikanter Einfluß zugunsten des Diols nicht bestätigt werden konnte (2.2.5.2).

Die schwierige Einschätzung von Effekten in dem Designversuch liegen erstens in den deutlichen Schwankungen der Dummyvariablen, die im Idealfall Nullwerte sein sollten, und zweitens in den Störeinflüssen anderer Parameter dieses stark vereinfachten faktoriellen Designs begründet. Derartige Versuchspläne sind folglich nur zur Eingrenzung sehr deutlicher Effekte geeignet, während schwache Effekte häufig nicht von Dummyeffekten unterscheidbar sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den beiden untersuchten Pilzstämmen *C. carcharias* und *P. sapidus* weder die Variation der Kohlenstoff- oder Stickstoff-Quelle, noch die Versorgung mit zusätzlichen Vitaminen, Mineralstoffen oder Spurenelementen zu Verbesserungen in der Transformationsleistung im Vergleich zum SNLH-Medium führte.

Das mit diesen Versuchen verfolgte Ziel einer Einschätzung der Bedeutung der Medienzusammensetzung für die Transformationen wurde insofern erreicht, als eine Beibehaltung des verwendeten halbkomplexen Standard-Mediums (SNLH) damit begründbar war.

#### 3.3.1.1.2 Transformationsmedien

Die Überführung der in einem Wachstumsmedium gebildeten Zellmasse in ein einfacher zusammengesetztes Transformationsmedium und die Durchführung der Transformation mit nichtwachsenden (ruhenden) Zellen kann folgende Vorteile haben [14]:

- Längere Stabilität der Kulturen, da die Kulturen nicht wachsen und nur für die Transformation notwendige Substrate zur Verfügung stehen
- Vereinfachung der Produktisolierung aufgrund der einfacheren Medienmatrix im Vergleich zum komplexen Wachstumsmedium
- Die separate Optimierung der Wachstumsbedingungen und der Transformationsbedingungen ist möglich
- Eine sterile Kultivierung der Mikroorganismen ist nicht zwingend notwendig, da aufgrund der fehlenden Nährstoffe (Mineralstoffe, Stickstoffquelle) auch Kontaminationen kaum auftreten.

Die Versuche mit *C. carcharias* (vgl. 2.2.5.3) zeigten, daß ein einfacher Phosphatpuffer als Transformationsmedium nicht ausreichte, sondern daß Glucose als leicht metabolisierbare C-Quelle notwendig war, um einen Citronellolumsatz zu erreichen. Hefeextrakt als komplexe Vitamin- und Stickstoffquelle hatte jedoch keinen zusätzlichen Einfluß.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß auch effektiv transformierende Pilze wie *C. carcharias* Terpene nicht als alleinige C-Quelle verwerten können, sondern eine Cometabolisierung mit leicht verwertbaren Energiequellen durchführen.

In Bezug auf den Nachweis des Epoxids erwies sich die Einstellung eines leicht alkalischen pH-Wertes als vorteilhaft, da die gepufferten und glucosehaltigen Ansätze hohe Gehalte von ca.  $40 \text{ mg L}^{-1}$  aufwiesen. Im weiteren Transformationsverlauf fand jedoch durch den Glucoseabbau trotz Pufferung eine Säuerung des Mediums statt, so daß nach 5 Transformationstagen die pH-Werte in den glucosehaltigen Transformationsmedien sich annähernd dem pH-Wert der Kontrolle (SNLH-Medium) angeglichen hatten.

Am 3. Transformationstag trat ein deutlicher Anstieg der Triolbildungsrate von ca.  $8 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  auf durchschnittlich  $30 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  bis zum 9. Transformationstag auf.

Dies läßt den Schluß zu, daß nach dem Umsetzen des Pilzes in das Transformationsmedium zunächst eine Anpassung an die neuen Umgebungsbedingungen notwendig war, die hier ca. 3 Tage dauerte. Danach war die Transformationsrate nur etwas geringer als in der Kontrollkultur, hielt bis zum 9. Transformationstag an und führte zu deutlich geringeren Triolkonzentrationen.

Beim Diol (**6**) waren die Ergebnisse aufgrund der etwa um Faktor 20 niedrigeren Konzentrationen weniger deutlich als beim Triol, die beschriebenen Tendenzen waren jedoch gleich.

Eine Durchführung von Terpententransformationen mit *C. carcharias* unter Verwendung glucosehaltiger Pufferlösungen als Transformationsmedien erscheint daher unter Inkaufnahme geringerer Produktausbeuten ohne weiteres möglich. Eine Verbesserung der Transformationseigenschaften wäre eventuell durch die Einstellung von sauren Anfangs-pH-Werten möglich, so daß die pH-Wert-Anpassung an das neue Medium entfielen. Neben dieser pH-Anpassung muß der Pilz aber wahrscheinlich noch andere Adaptionsvorgänge leisten, z.B. Anpassung an die veränderte Osmolarität des umgebenden Mediums sowie Beendigung der Stickstoffaufnahme und -metabolisierung.

### 3.3.1.2 Lichteinfluß

Über den Einfluß von Licht auf den Metabolismus von Basidiomyceten ist bislang wenig bekannt, jedoch wurden von BÖKER deutlich positive Effekte von UV-A-Strahlung auf die Bildung von Aromastoffen durch *Nidula niveo-tomentosa* festgestellt [136].

Andere bekannte Effekte von Licht auf Pilze sind z.B. die Anregung der Carotinoidbiosynthese [137, 138], die Induktion der Sporulation [139], die lichtinduzierte Fruchtkörperbildung [140] aber auch für die Transformationseigenschaften interessantere Effekte wie die Steigerung der Arylalkoholoxidase-Aktivität bei *Pleurotus eryngii* [141] und die Beeinflussung der Aktivität verschiedener Dehydrogenasen und Oxidasen bei einigen Stämmen der Gattungen *Penicillium* und *Fusarium* [142].

Die Einflüsse einer definierten UV-A-Belichtung der Kulturen bei den  $\alpha$ -Pinen-Transformationen durch *P. sapidus*, *T. hirsuta* und *G. frondosa* ergaben keine positiven Effekte auf die Produktbildung. Bei Dauerbelichtung der Kulturen waren nach 48 h die Produktmengen bei *G. frondosa* und *P. sapidus* um 30% sowie bei *T. hirsuta* um 8% niedriger als in den anderen Kulturen (2.1.8.2, Abb. 2-42 bis 2-44). Der Rückgang beruhte vor allem auf einer Verminderung der gebildeten Verbenonmenge. Dieser Effekt wurde bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes für alle drei Pilzstämme eindeutig bestätigt und trat bei längerer Transformationsdauer auch schon bei einer täglichen Belichtungszeit von 6 h auf (s. Abb. 2-45 bis 2-47). Einflüsse auf die Mengen der Terpenalkohole Verbenol und Myrtenol wurden jedoch nicht festgestellt.

Eine mögliche Erklärung für die Hemmung des oxidativen Schrittes vom Verbenol zum Verbenon ist die verringerte Aktivität des daran beteiligten Enzyms. Es kann sich dabei um eine Alkoholdehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-abhängig) oder eine Alkoholoxidase (O<sub>2</sub>-abhängig) handeln.

Bei den alkanmetabolisierenden Hefen *Candida tropicalis* und *Yarrowia lipolytica* wurde in vitro ein deutlich aktivitätssenkender Effekt von blauem Licht (430-480 nm) auf die an der Alkylalkohol-Oxidation beteiligte alkaninduzierte Alkoholoxidase festgestellt, der allerdings in vivo nicht feststellbar war. Eine lichtabhängige Senkung der Alkoholdehydrogenaseaktivität dieser Hefen trat nicht auf [143].

Verschiedene Mechanismen könnten einen solchen Aktivitätsverlust erklären:

1. Das Enzym enthält eine in Gegenwart von Sauerstoff lichtsensitive prosthetische Gruppe.
2. Eine prosthetische Gruppe des Enzyms (z.B. Flavin) bildet unter Lichteinfluß Radikale (z.B. mit Sauerstoff), die dann Aminosäuren im aktiven Zentrum angreifen und so das Enzym inaktivieren.
3. Radikale werden auf andere Art außerhalb des Enzyms unter Lichteinfluß gebildet und führen ebenfalls zu einer Schädigung des aktiven Zentrums der Oxidase.

Ob bei den hier untersuchten Pilzen eine solche direkte Hemmung von Enzymen eine Rolle spielt, konnte nicht geklärt werden. Bei niedrigeren Verbenongehalten durch Hemmung der Verbenoxidation müßte die Terpenalkoholkonzentration ansteigen; dies war jedoch nicht der Fall. Grund dafür könnte aber neben anderen, unbekanntem Abbauwegen auch eine durch die Hemmung der Alkoholoxidation bedingte erhöhte Menge an Terpenalkohol im Innern der Pilzzellen sein, die durch eine Produkthemmung die weitere Verbenolbildung verhinderte.

Ein signifikanter Einfluß von Licht auf die Citronelloltransformation durch *C. carcharias* wurde nicht festgestellt (s. 2.2.5.4, Abb. 2-124). Die etwas geringere Triolmenge bei 14-stündiger täglicher Belichtungszeit war der einzige Hinweis auf geringe negative Effekte durch UV-A-Belichtung. Da bei dieser Transformation die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen keine Rolle spielt, haben eventuelle lichtinduzierte Störungen von Alkoholoxidasen oder -dehydrogenasen bei dieser Transformation keine Auswirkungen.

Die Versuche führten zu dem Ergebnis, daß Lichteinflüsse auf die Terpenttransformationen durch Pilze gering sind, jedoch traten bei Alkoholoxidationsschritten negative Wirkungen bei Dauerbelichtung (z.T. auch schon bei geringeren Belichtungszeiten) auf. Positive Effekte durch UV-A-Belichtung konnten nicht festgestellt werden. Eine kontrollierte Belichtung von terpenttransformierenden Pilzen erschien sowohl im Hinblick auf die gebildeten Produktmengen als auch im Hinblick auf die Vergleichbarkeit verschiedener Versuchsreihen nicht geboten.

### 3.3.1.3 Einfluß der Adaption der verwendeten Vorkulturen

Die Präsenz des Substrates vor Beginn der Transformation kann zwei verschiedene Auswirkungen haben:

1. Die allgemeine Adaption des Organismus an das membrantoxische Substrat, z.B. durch Aktivierung von Mechanismen zur Regulation der Membranfluidität.
2. Die Substratinduktion von fremdstoffmetabolisierende Enzymen.

Die allgemeine Adaption beruht auf Mechanismen, wie sie bereits bei der Diskussion der Terpentoxizität erläutert wurden (vgl. 3.2.4.3.1). Eine Senkung der Membranfluidität durch Erhöhung des Anteils von gesättigten oder von trans-Fettsäuren steuert der Fluiditätserhöhung durch niederviskose Terpenkohlenwasserstoffe und damit einer Zerstörung der Membranintegrität entgegen. Dadurch wird die Kultur resistenter gegenüber dem Substrat.

Die Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen ist besonders im Bereich der Mikrosomen aus Säugetierleberhomogenaten gut untersucht.

Substratinduktion tritt sehr häufig bei Cytochrom-P450-Monooxygenasen auf. Phenobarbital und 3-Methylcholanthren, die jeweils nur bestimmte P450-Typen induzieren, sind die beiden klassischen Induktoren in der medizinischen Forschung. Viele andere Substrate dieser Enzyme, wie Benzo[*a*]pyren, 2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzo-*p*-dioxin, 5,6-Benzoflavon u.a., sind ebenfalls als Induktoren bekannt [100, 144].

Bei Mikroorganismen wurde die Substratinduktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme in einigen Fällen belegt, dies gilt bei Pilzen insbesondere für die PAK und die Steroide. So wurde bei *Aspergillus ochraceus* eine 5-10-fache Erhöhung der Aktivität der Benzo[*a*]pyren-Hydroxylase nach Induktion durch Benzo[*a*]pyren, 3-Methylcholanthren u.a. PAK festgestellt [113].

Bei *Cunninghamella baineri* konnte eine Induktion der Arylkohlenwasserstoff-Hydroxylase durch Phenanthren erreicht werden, nicht jedoch durch 3-Methylcholanthren, Naphthalen o.a. [108]. Die Progesteronhydroxylierung durch den myzelbildenden Pilz *Cochliobolus lunatus* konnte ebenfalls durch das Substrat induziert werden [116].

Bei Terpententransformationen durch Pilze wurden Substratinduktionseffekte bislang noch nicht dokumentiert. Bei Dosierung subtoxischer Konzentrationen in die experimentellen Kulturen sind jedoch ähnliche Induktionseffekte wie bei den o.g. Beispielen zu erwarten. Bei bakteriellen Transformationen ist aufgrund der häufig vorhandenen Substratresistenz und ihrer Isolierung mittels Terpenen als alleiniger Kohlenstoff-Quelle die Führung der Vorkulturen in Gegenwart des Substrates üblicher als bei Pilzen. Zur Erhaltung einer reproduzierbaren Transformationsleistung und der Fähigkeit zur Mineralisierung des Substrates ist dies in vielen Fällen sogar notwendig (z.B. [64, 71, 73]).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Basidiomyceten mußte bei den Adaptionversuchen aufgrund der toxischen Wirkungen des Substrates auf die Organismen vorsichtig vorgegangen werden. Die den Vorkulturen zugegebenen Substratmengen waren auf subtoxischem Level zu halten, um ausreichendes Wachstum zu gewährleisten, zu niedrige Mengen hätten aber für die Induktion eventuell nicht ausgereicht.

Die im Langzeitversuch mit  $\alpha$ -Pinen (2.1.10.1) angewendete Methode der Adaption in den *Vorkulturen 1* (im einfachen, hefeextraktfreien SNLB-Medium) erwies sich als nicht praktikabel. Bei den adaptierten Kulturen wurden für die fünf untersuchten Pilzstämmen *P. sapidus*, *G. applanatum*, *T. hirsuta*, *M. giganteus* und *G. frondosa* erst nach einer 6-wöchigen Adaptionszeit deutlich positive Effekte gegenüber den nicht-adaptierten Kulturen festgestellt (Abb.2-77 bis 2-86). Besonders deutlich waren diese Effekte, wie sich vor allem bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes zeigte, bei *P. sapidus* (5-fache Produktkonzentration im Vergleich zur nicht-adaptierten Kultur), *G. applanatum* (ca. 20-fache Konzentration) und *M. giganteus* (doppelte Konzentration). Diese deutlichen Effekte ließen sich nach 10 und 14 Wochen jedoch nicht bestätigen, sondern es trat eine Umkehrung der Verhältnisse auf (außer bei *T. hirsuta*). Grund für diesen Effekt war wahrscheinlich eine Schädigung der Kulturen durch die permanente Kultivierung in Gegenwart des toxischen Substrates, die zu einem sukzessiven Verlust an Transformationsaktivität führte. Im Gegensatz dazu trat bei längerer Submerskultivierung *ohne*  $\alpha$ -Pinen, vor allem nach 10 und 14 Wochen, tendenziell eine Zunahme der Transformationsaktivität auf. Die erreichten Produktkonzentrationen lagen bei *G. applanatum*, *M. giganteus*, *T. hirsuta* und *G. frondosa* fast genauso hoch wie die höchsten Konzentrationen in den adaptierten Kulturen, bei *P. sapidus* sogar höher.

Bei der Untersuchung der Limonenadaptation von *P. sapidus* traten vergleichbare Effekte auf. Wahrscheinlich bedingt durch die verbesserte Methodik bei der Vorkulturadaptation (keine Adaption in den *Vorkulturen 1* sondern erst im halbkomplexen, hefeextrakt-haltigen SNLH-Medium der *Vorkulturen 2*) führte hier bereits die einwöchige Adaption zu einer Verdreifachung der Produktmengen (2.1.10.2, Abb. 2-87 und 2-88). Auch hier hatte eine Adaption über einen längeren Zeitraum negative Auswirkungen und führte zu einer Senkung der Transformationsaktivität. Die nichtadaptierten Kulturen zeigten ein Aktivitätsmaximum nach vierwöchiger Kultivierung. Die Produktbildung war in diesen Kulturen sogar noch etwas besser als in der besten adaptierten Kultur (Abb. 2-89).

Vergleicht man beide Adaptionsserien, so ergibt sich folgendes:

1. Sowohl beim  $\alpha$ -Pinen als auch beim Limonen treten Adaptionseffekte auf, die wahrscheinlich auf eine Substratinduktion zurückzuführen sind. Dabei handelt es sich nicht um eine adaptive Erhöhung der Terpentoleranz der Pilze, denn ein Wachstum in Gegenwart der Terpene oder eine geringere Trockenmasseabnahme im Vergleich zu den nichtadaptierten Kulturen konnte nicht festgestellt werden. Es ist vielmehr eine erhöhte Aktivität der beteiligten Enzyme anzunehmen, möglicherweise eine Induktion von Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Zur Überprüfung wären Messungen von Enzymaktivitäten sinnvoll gewesen. Bei *P. sapidus* erwiesen sich Aktivitätsmessungen mit Myzelaufschlüssen jedoch aufgrund der zu geringen Gesamtaktivität als nicht durchführbar (Ergebnisse dieser Experimente nicht dargestellt).
2. Bei längerer Kultivierung tritt bei den adaptierten Kulturen die toxische Wirkung der Terpene in den Vordergrund und führt zu Aktivitäts- sowie Vitalitätsverlusten, die entweder auf membrantoxische oder auch auf mutagene Wirkungen der Terpene zurückzuführen sein könnten.
3. Eine längere Kultivierung im gleichen halbkomplexen Medium kann auch ohne Terpenzusatz zu einer verbesserten Transformationsleistung führen. Grund dafür könnte die langsame Anpassung des Pilzes an das verwendete Medium und an die Lebensbedingungen in der Submerskultur sein. Durch eine insgesamt höhere Stoffwechselaktivität könnte dann auch eine verbesserte Transformationsleistung bewirkt werden.

Bei Pilzen mit hoher Transformationsaktivität (*C. carcharias*) bringt eine Adaption keine Verbesserung (2.2.5.7, Abb. 2-127). Das liegt entweder daran, daß bei diesem Pilz



konstitutive Enzyme beteiligt sind oder, daß durch die geringeren toxischen Wirkungen der Substratzugabe auf diesen Pilz eine Enzyminduktion zu Beginn der Transformation möglich ist, während der Metabolismus von *P. sapidus* (vor allem RNA- und Proteinsynthese) bei Transformationsbeginn durch das Substrat bereits so geschädigt wird, daß eine Enzyminduktion und -biosynthese nicht mehr stattfinden kann.

Damit ist für *P. sapidus* belegt, daß eine Substratadaption sinnvoll ist. Außerdem legt dies die Beteiligung substratinduzierter Enzyme an der Terpenoxidation nahe. Bei *C. carcharias* ist dagegen eine Enzyminduktion nicht nachzuweisen.

### **3.3.2 Lösungsansätze zur verbesserten Substratzuführung**

#### 3.3.2.1 Terpensubstrate

##### *3.3.2.1.1 Wahl der Substratzugabezeitpunkte und der Substratmengen*

Das Wachstum von Pilzkulturen verläuft – im Gegensatz zum exponentiellen Wachstum bakterieller Kulturen – eher linear. Sobald ein essentieller Nährstoff limitierend wird, findet der Übergang in die Idiophase statt; die Hauptwachstumsphase ist abgeschlossen. Bei *P. sapidus* geschah dies etwa am 4. Kulturtag, danach war das Wachstum stark verlangsamt (vgl. 2.1.9.1.2, Abb. 2-51).

Die Länge dieser Wachstumsphase kann im Kulturkolben durch die geeignete Wahl von Art und Menge des limitierenden Medienparameters oder durch Ernten der Zellen und Umsetzen in ein für den Organismus minimales Medium kontrolliert werden.

Während für manche Enzyme eine Nährstofflimitierung induzierend wirkt, z.B. für die bei Weißfäulepilzen wichtigen extrazellulären Ligninperoxidasen, werden für die meisten terpentransformierenden Enzymsysteme die höchsten Aktivitäten im Verlauf der Wachstumsphase gemessen. Fast alle Organismen, die nennenswerte fremdstoffmetabolisierende Aktivitäten aufweisen, sind Saprobionten (auch Saprotrophe), verstoffwechseln also abgestorbenes Material – meist pflanzlicher Herkunft. Neben der

großen Gruppe saprotropher Pilze (aus den Klassen der Ascomyceten, Basidiomyceten, Deuteromyceten oder den niederen Pilzklassen z.B. der Zygomyceten) sind hier besonders die typischen Bodenbakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Nocardia* zu nennen.

Für diese Mikroorganismen ist es ontogenetisch sinnvoll, daß sie schon von Beginn der Besiedlung ihres Lebensraumes an in der Lage sind, auch die für sie toxischen Inhaltsstoffe aus dem Substrat effektiv zu metabolisieren und unschädlich zu machen. Erst dadurch wird ein weiteres Ausbreiten im neuen Lebensraum möglich.

Der für viele Basidiomyceten (Weiß- und Braunfäulepilze) so charakteristische Prozeß des Ligninabbaus stellt, wie die Terpenoxidation, eine Cometabolisierung dar, d.h. es werden leicht verstoffwechselbare Kohlenstoff-Quellen zusätzlich benötigt. Er hat vor allem die Nutzbarmachung von leicht verstoffwechselbaren Kohlenstoff-Quellen wie Cellulose, Cellobiose oder Glucose durch Aufschließen des natürlichen Substrates (Holz) zum Ziel [135].

Im Gegensatz dazu steht bei der Cometabolisierung von Terpenen und anderen Fremdstoffen die Detoxifikation im Vordergrund. Ausnahmen bilden hier einige der genannten Bodenbakterien, die zur Mineralisierung von Terpenen zu Kohlendioxid und Wasser in der Lage sind.

Sowohl für *P. sapidus* (2.1.9.1.2) als auch für *C. carcharias* (2.2.5.9) wurden schon zu Beginn des Wachstums in frischem Medium Transformationsaktivitäten gemessen, die zu deutlicher Produktbildung führten. *P. sapidus* zeigte in den ersten 24 h nach Inokulation zwar deutlich geringere Gesamtaktivitäten, eine Normierung auf die Trockenmasse ergab jedoch, daß die *spezifische* Produktbildungsrate bis zu einem Kulturalter von vier Tagen (mit Ausnahme eines Maximums nach 24 h, s. Abb. 2-53) annähernd konstant blieb und nach 7 Tagen deutlich abgesunken war. Die höchsten Aktivitäten fielen bei diesem Pilz also in die Hauptwachstumsphase.

Bei *C. carcharias* ergab sich ein ähnliches Bild: Die höchsten Transformationsraten wurden 12-72 h nach der Inokulation gemessen und fielen danach wieder ab (Abb. 2-132).

Diese Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit saprotropher Pilze, schon in frühen Wachstumsstadien fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme zu aktivieren. Der Grund für die geringeren absoluten Transformationsraten bei Substratzugaben eher als 2 Tage nach der Inokulation ist nicht in der spezifischen Transformationsleistung, sondern in der Sub-

stratschädigung der Kulturen zu suchen. Aufgrund der geringeren Biomasse führt eine Substratzugabe zu diesem Zeitpunkt zu deutlich höheren Terpenkonzentration in den Pilzmembranen. Der optimale Zugabezeitpunkt muß daher bei den Basidiomyceten möglichst früh liegen, damit die vorhandene Enzymaktivität möglichst gut genutzt werden kann. Er darf aber auch nicht so früh liegen, daß die Substratschädigung zu eine sofortigen Inaktivierung führt. Der Transformationsbeginn 2,5 Tage nach Inokulation wurde für *P. sapidus* und *C. carcharias* als günstigster Zeitpunkt ausgewählt.

Die Bestimmung der für die Transformationsleistung optimalen Substratmenge war bei den nur wenig terpentoleranten Basidiomyceten ein wichtiger Parameter zur Optimierung der Biotransformation.

Bei *P. sapidus* zeigte sich, daß eine hohe Dosierung trotz der dabei auftretenden starken Membranschädigung zu den besten Transformationsergebnissen führte (2.1.9.1.1), so daß bei direkter Dosierung in den Kulturkolben die zweistufige Variante (je 100 µL pro 100 mL nach 2,5 und 3,5 Kulturtagen) gewählt wurde. Interessant war, daß bei den geringeren Dosen (5, 10 und 50 µL) trotz geringerer Membranschädigung und regelmäßiger Ergänzung des Substrates (4 Dosierungen im Abstand von 24 h) die gebildeten Produktmengen proportional abnahmen (Abb. 2-49 und 2-50), obwohl eine günstige Auswirkung auf die Transformationsleistung zu erwarten gewesen wäre.

Folgende Gründe dafür sind denkbar:

1. Bei Substratzugabe tritt zunächst eine gewisse Sättigung der Cytoplasmamembran auf, bevor bei ausreichendem Konzentrationsgradienten das Substrat auch in die intrazellulären Membransysteme gelangt. Da bei Eukaryonten die fremdstoffmetabolisierenden Monooxygenasen meist membrangebunden an dem im Zellinnern lokalisierten endoplasmatischen Retikulum vorliegen, könnte so eine effektive Terpenoxidation erst bei Überschreitung einer bestimmten Sättigungsmenge stattfinden.
2. Kleine Substratmengen könnten eine Metabolisierung der oxyfunktionalisierten Terpene zu anderen, unbekanntem Verbindungen begünstigen. Dies konnte im Rahmen der Arbeit nicht nachgewiesen werden, jedoch ist es möglich, daß solche Prozesse auftreten und daß die im Medium nachgewiesenen primären Transformationsprodukte Folge einer substratbedingten Schädigung der nachfolgenden Abbau-systeme sind.

Auch eine Verlängerung der Transformationsaktivität konnte durch Senkung der Substratmengen nicht erzielt werden. Letzteres ist auf den schon diskutierten Abfall der Aktivität beim Erreichen der stationären Phase der Kultur zurückzuführen.

Bei *C. carcharias* zeigte die Wahl der Substratmenge einen noch massiveren Einfluß auf die Transformationsleistung (2.2.5.8). Citronellol führte bei Mengen von 5,5 mmol L<sup>-1</sup> zu einer nur noch sehr geringen Transformationsaktivität, während 2,2 mmol L<sup>-1</sup> einen annähernd vollständigen Umsatz zum Triol (**9**) bewirkten (Abb. 2-128).

Diesen Pilz zeichnet auf jeden Fall bei ausreichender Glucoseversorgung eine dauerhafte, wachstumsunabhängige Transformationsaktivität aus, wie im Reaktorversuch deutlich wurde. Ein direkter Zusammenhang mit dem Kulturwachstum konnte hier folglich nicht festgestellt werden.

#### 3.3.2.1.2 Dosierung über die Gasphase

Die direkte Zugabe von Terpenkohlenwasserstoffen zu Submerskulturen ist die Standardmethode bei der Durchführung von Terpenbiotransformationen.

Dabei werden im allgemeinen weit über den Löslichkeiten liegende Mengen an Substrat zugesetzt. 2000 mg L<sup>-1</sup> (=14,7 mmol L<sup>-1</sup>) [145] oder 430-500 mg L<sup>-1</sup> (=3,1-3,7 mmol L<sup>-1</sup>) [27, 28, 29, 146, 147] sind gängige Substrat-Konzentrationen bei Transformationen durch Pilze, während bei Bakterien auch höhere Konzentrationen von 3-5 g L<sup>-1</sup> (22,0-36,7 mmol L<sup>-1</sup>) [63, 148] verwendet werden, da sie häufig resistenter sind und Terpene als alleinige Kohlenstoff-Quelle verwenden können.

Die kontinuierliche Substratdosierung über die Gasphase hat den Vorteil, daß die Zellmembranen nicht innerhalb kürzester Zeit mit Substrat gesättigt und entsprechend geschädigt werden, sondern daß die Substrataufnahme langsamer, dafür aber kontinuierlich erfolgt [63, 149]. Außerdem wird ein direkter Kontakt der Zellen mit emulgierten Terpentropfchen vermieden, so daß eine Membranzerstörung durch direkte Extraktion von Membran- oder Zellbestandteilen durch das Terpen nicht auftritt.

Da jedoch auch hier eine Sättigung der Membran mit dem Terpen stattfindet, sind die anderen membrantoxischen Wirkungen auch bei Gasphasendosierung nicht zu vermeiden. Dies wurde bei *P. sapidus* festgestellt, der bei dieser Dosierungsmethode zwar die

bessere Transformationsergebnisse zeigte (2.1.9.1.3), nach Terpenzusatz jedoch auch hier – wie bei direkter Dosierung – kein Kulturwachstum mehr zeigte.

Insgesamt erwies sich die Gasphasendosierung für die Kohlenwasserstofftransformationen durch *P. sapidus* als günstig, weil auf diese Weise die Produktmengen deutlich erhöht werden konnten (ca. Verdreifachung bei Limonen, Verdoppelung bei  $\alpha$ -Pinen, 50% Erhöhung bei  $\beta$ -Pinen) und die Produktbildungsphasen beim  $\alpha$ -Pinen (um 2 Tage) sowie beim Limonen (um maximal 8 Tage) verlängert wurden. Außerdem ermöglichte dies eine einfach durchzuführende *kontinuierliche* Substratdosierung.

Die beim Limonen besonders augenscheinliche Verbesserung der Transformation hängt möglicherweise mit einem Adaption- oder Induktionseffekt zusammen, wie er bei den Versuchen zur Adaption der Vorkulturen schon erläutert wurde (3.3.1.3). Während bei direkter Substratdosierung der Pilzmetabolismus sehr schnell geschädigt wird, muß das Substrat bei der Gasphasendosierung den Luftraum des Kolbens als Barriere überwinden und die Kultur kommt zunächst mit kleinen Substratmengen in Berührung, so daß eine Adaption oder Enzyminduktion in dieser Phase eventuell noch möglich ist.

Die Gasphasendosierung von Monoterpenalkoholen erscheint aufgrund der im Vergleich zu den Terpenkohlenwasserstoffen deutlich geringeren Flüchtigkeit (vgl. 3.2.3.1, Tab. 3-6) nicht sinnvoll. Bei *C. carcharias* führte dies nur zu sehr geringen Produktkonzentrationen (2.2.3.2, Abb. 2-110), während die direkte Dosierung geringer Mengen hier sehr gute Transformationsleistungen ergab.

### 3.3.2.1.3 Einsatz organisch-wässriger Zweiphasensysteme

Der Einsatz organisch-wässriger Zweiphasensysteme für enzymatische Reaktionen mit ganzen Zellen, Zellorganellen oder Enzymen erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich, bei näherer Betrachtung werden jedoch eine ganze Reihe potentieller Vorteile erkennbar [150, 151]:

1. Bessere Löslichkeit und Verteilung schlecht wasserlöslicher Substrate und/oder Produkte,
2. Erhöhung der Produktausbeute durch Entfernen der Produkte aus der wässrigen Phase,
3. Verhinderung der Hydrolyse, Umlagerung oder anderer Reaktionen der Substrate oder Produkte in wässriger Lösung,
4. vereinfachte Produktgewinnung direkt aus der organischen Phase,
5. Verminderung der Substrat- und/oder Produktinhibierung,
6. Verminderung der Schaumbildung in Bioreaktoren.

Als Nachteil solcher Systeme ist vor allem die Schädigung des Biokatalysators durch das organische Lösungsmittel zu nennen. Eine Minimierung der Lösungsmitteltoxizität ist daher neben der Optimierung der rein physikalischen Parameter (Verteilungsverhalten von Substraten/Produkten, Stabilität der Emulsion) die wichtigste Aufgabe bei der Untersuchung von Zweiphasensystemen.

Für die Beurteilung der Toxizität von Lösungsmitteln gilt prinzipiell das bereits im Zusammenhang mit der Terpentoxizität Erläuterte (vgl. 3.2.4.3.1). Während jedoch die Terpensubstrate maximal in Konzentrationen von wenigen  $\text{g L}^{-1}$  eingesetzt werden, werden in Zweiphasensystemen organisch/wässrige Phasenverhältnisse zwischen 0,05 (= 5% organische Phase im Gesamtvolumen), 1 (50% organische Phase) und in einigen Fällen bis zu 20 (95% organische Phase) eingesetzt [152]. Aufgrund dieses großen Anteils an organischer Phase spielt neben der molekularen Toxizität, die zu einer Membranschädigung führt, hier vor allem die Phasentoxizität eine wichtige Rolle, also die Fähigkeit der Lösungsmittel, Membran- oder Zellbestandteile aus dem Organismus zu herauszulösen.

Für die Beurteilung der Eignung nichtwassermischbarer organischer Phasen ist ebenfalls der log P-Wert als erstes Auswahlkriterium geeignet.

LAANE et al. [153] stellten fest, daß hydrophile Lösungsmittel mit log P-Werten  $< 2$  meist zu einer Inaktivierung des Mikroorganismus führen, im Bereich  $\log P=2-4$  ist die Aktivität stark vom verwendeten Organismus und dem Lösungsmittel abhängig, während bei sehr hydrophoben Lösungsmitteln mit sehr niedrigen wäßrigen Sättigungskonzentrationen und  $\log P>4$  die Aktivitätsverluste bei den meisten Organismen nur gering sind. Sie sind daher für Zweiphasensysteme am besten geeignet.

Aktivitätsverluste durch organische Lösungsmittel korrelieren gut mit deren Membrankonzentrationen. Die Überschreitung einer kritischen Membrankonzentration, die substanzunabhängig ist (vgl. 3.2.4.3.1), führt zu einem vollständigen Verlust an Aktivität.

Außer der Wahl einer geeigneten organischen Phase kann eine Immobilisierung des verwendeten Biokatalysators eine Verbesserung der Stabilität und einen Erhalt der Aktivität bewirken. Der Einschluß in Gele, z.B. Alginat, Carrageen oder Agar, ist in einigen Fällen für die Immobilisierung von Mikroorganismen in organisch-wäßrigen Zweiphasensystemen geeignet. Auf diese Weise kann die Aktivität und Vitalität der Kulturen stabilisiert werden und die Diffusionslimitierung ist aufgrund der offenporigen Struktur der Gele relativ gering [150]

Die Anwendung organisch-wäßriger Zweiphasensysteme für Biotransformationen mit lebenden Zellen wurde besonders ausführlich im Bereich der Steroidtransformationen untersucht. Steroide sind aufgrund anti-inflammatorischer, diuretischer, anaboler, kontrazeptiver, anti-androgener, progestagener und anti-karzinogener Wirkungen für die Herstellung von Arzneimitteln von großer Bedeutung. An vielen Herstellungsverfahren sind biotechnologische Prozesse beteiligt [154].

So wurde die  $\Delta^1$ -Dehydrierung von 6- $\alpha$ -Methylhydrocortison-21-acetat durch *Arthrobacter simplex* mit Chloroform, n-Decan-1-ol, Toluol und n-Octan-1-ol als geeigneten organischen Phasen [155, 156] durchgeführt und die Immobilisierung in Polyurethanschaum führte zu einem besseren Aktivitätserhalt mit n-Decan-1-ol als organischer Phase [157]. Für nichtimmobilisierte Zellen von *A. simplex* wurde ein Aktivitätsmaximum bei einem log P-Wert von 9,8 gefunden. Immobilisierte Zellen erreichten gleiche Aktivitäten bereits bei Lösungsmitteln mit  $\log P \approx 4,0$ , wodurch gezeigt wurde, daß eine Immobilisierung durch die Schutzwirkung des Gels eine Verminderung der

Phasentoxizität bewirkt. Es zeigte sich jedoch auch, daß die Produktausbeute in Zweiphasensystemen geringer war als in wäßrigen Systemen und daß daher die vereinfachte Produktgewinnung hier als Hauptvorteil zu sehen war [158].

Alkantransformationen durch *Pseudomonas oleovorans* oder rekombinante *Escherichia coli* zu den entsprechenden Alkanolen oder Carbonsäuren mit dem Substrat (z.B. n-Octan) als organischer Phase führten zu sehr guten Produktausbeuten, die eine industrielle Anwendung möglich erscheinen lassen [159-163].

Auch Pilze fanden als Biokatalysatoren in Zweiphasensystemen bereits Verwendung. So wurde bei der 11 $\alpha$ -Hydroxylierung von Progesteron durch *Aspergillus ochraceus* festgestellt, daß konventionelle organische Lösungsmittel zu Zellschädigungen führten, während pflanzliche Öle und besonders Ölsäure geeignete organische Phasen darstellten [164].

Sporen von *Penicillium roquefortii* zeigten in Zweiphasensystemen sehr gute Transformationsergebnisse von C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>-Fettsäuren zu den korrespondierenden C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Methylketonen. Als organische Phase erwies sich hier ein hoher Anteil (88%) eines industriellen Paraffinöls (hauptsächlich Tetradecan) mit einem log P von 7,6 als am besten geeignet [165, 166].

Für die eigenen Untersuchungen (s. 2.1.9.1.4) erschienen aufgrund der erläuterten Literaturergebnisse der Einsatz von Triacylglycerolen sowie langkettigen gesättigten Kohlenwasserstoffen am sinnvollsten.

Das Triacylglycerol Miglyol<sup>®</sup> 812 S ist ein Kokosölfraction aus mittelkettigen Fettsäuren (56% Octan-, 42% Decan- und <2% Dodecansäure). Aufgrund seiner relativ geringen Viskosität von 28-32 mPa s<sup>-1</sup> schien es für den Einsatz in Zweiphasensystemen gut geeignet.

Dünnflüssiges Paraffinöl ist eine Fraktion langkettiger gesättigter Kohlenwasserstoffe mit einer Viskosität von 25 mPa s<sup>-1</sup>.

Bei *P. sapidus* und *G. applanatum* bewirkte die Zugabe von 5 mL Miglyol mit 100  $\mu$ L  $\alpha$ -Pinen (=2% v/v) zu 100 mL-Kulturen (=4,8 % organische Phase) eine deutliche Verminderung der Substrattoxizität, da die Membrankonzentration aufgrund der bevorzugten Löslichkeit des Terpens in der organischen Phase nur gering war. Außerdem ist mit einer guten Metabolisierung des Triacylglycerols durch Pilze zu rechnen, die zusätzlich



zu der beobachteten im Vergleich zur Kontrollkultur mehr als verdoppelten Trockenmasse beigetragen haben könnte (Abb. 2-57 und 2-58).

Der Einsatz von Paraffinöl führte bei *G. applanatum* zu einer ähnlichen Erhöhung der Trockenmasse (Abb. 2-59). Hier ist eine Verringerung der Terpentoxizität zu erwarten, nicht jedoch eine Metabolisierung der Alkane, die zu einer Erhöhung der Trockenmasse führen könnte. Es ist jedoch möglich, daß ein Teil des eingesetzten Paraffins in der Myzelphase akkumuliert wurde – entweder gelöst in den Membranen oder emulgiert im Hyphengeflecht.

Der positive Effekt auf die Terpentoxizität ging in den Zweiphasensystemen jedoch auf Kosten der Transformationsleistung. Wie auch schon bei den Untersuchungen zur optimalen Substratmenge bei direkter Dosierung diskutiert (s. 2.1.9.1.1), wäre bei einer Verringerung der Membrantoxizität eine verbesserte Kulturvitalität und damit eine erhöhte Transformationsleistung zu erwarten gewesen. Dies war jedoch bei allen hier durchgeführten Transformationen nicht der Fall:

Eine Verbesserung der Durchmischung durch Einsatz von 1- bzw. 4-Schikanekolben im Vergleich zu einfachen Erlenmeyerkolben führte bei *P. sapidus* zu einer Verbesserung um 56 % bzw. 61 %, bei *G. applanatum* war dieser positive Effekt mit 31 % bzw. 38% geringer.

Bei *P. sapidus* wurden so im günstigsten Fall 50 % der im wäßrigen System (Kontrollkultur) erhaltenen Transformationsprodukte festgestellt, bei *G. applanatum* waren es dagegen nur etwa 11%.

Der Verringerung der Membrantoxizität in den Zweiphasensystemen standen daher folgende Nachteile gegenüber:

- die verringerte Substratkonzentration in den Membranen führte zu deutlich geringeren Transformationsleistungen
- die für die Produktgewinnung notwendige Phasentrennung war z.T. schwierig (v.a. bei *P. sapidus* mit Paraffinöl)

Da der Einsatz organischer Lösungsmittel als Substratreservoir und Produktextraktionsmittel nicht zu der angestrebten Verbesserung der Biotransformation führte, wurden weitere Untersuchungen diese Methode nicht durchgeführt.

#### 3.3.2.1.4 Löslichkeitsverbesserung durch Verwendung nichtionischer Tenside

Die Verwendung von Tensiden zur Verbesserung von Biotransformationen schlecht wasserlöslicher Substanzen wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit der biologischen Reinigung von kontaminiertem Wasser oder Boden untersucht. Die Tenside bewirken durch ihre amphiphile Struktur (hydrophile Kopf- und hydrophobe Endgruppe) die Emulgierung der schlecht wasserlöslichen Substrate. Daraus resultiert eine Erhöhung der für die Mikroorganismen zugänglichen Oberfläche und eine Solubilisierung. Dies bewirkt potentiell eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit.

Tenside haben in den bisher untersuchten Biosystemen sowohl zu inhibierenden als auch zu fördernden Effekten auf das Kulturwachstum und die Transformationsleistung geführt. Allgemeingültige Regeln, die Voraussagen über die Wirkung oberflächenaktiver Substanzen auf Biotransformationen schwer wasserlöslicher Substanzen erlauben, konnten anhand der bisher erhaltenen Ergebnisse nicht aufgestellt werden [167]. Vielmehr hängen die Effekte von der Art der eingesetzten Tenside, vom verwendeten Organismus, seiner Zellwand- und Membranstruktur, von den Tensideigenschaften und -konzentrationen sowie den Substrateigenschaften und -konzentrationen ab.

Die meisten untersuchten Organismen waren gramnegative Bakterien (hs. *Pseudomonas* sp.) und Hefen (*Candida* sp., *Pichia* sp.), und als Substrate fanden vor allem Alkane, PAK und polychlorierte Biphenyle Verwendung. Myzelbildende Pilze wurden als Organismen ebensowenig untersucht wie Terpenkohlenwasserstoffe als Substrate.

Zur Beurteilung der Eigenschaften von Tensiden wird u.a. die *kritische Mizellenbildungskonzentration* ( $CMC = \text{critical micellar concentration}$ ) verwendet. Mizellen sind Aggregate von Tensidmolekülen, die durch Zusammenlagerung der hydrophoben Molekülteile gebildet werden und so in ihrem Innern eine thermodynamisch günstigere Pseudo-Kohlenwasserstoff-Phase ausbilden. In diese lipophile Phase können lipophile Substanzen eingeschlossen werden. Für eine effektive Emulgierung von schlecht wasserlöslichen Verbindungen ist folglich eine Überschreitung der CMC notwendig. Die meisten bekannten Biotransformationen mit Tensidzusatz wurden daher auch mit Konzentrationen im Bereich der CMC oder oberhalb durchgeführt.

Ein weiterer Parameter, der Tenside charakterisiert, ist der *HLB-Wert* (*hydrophile lipophile balance*). Dabei handelt es sich um eine nach einer empirischen Formel berechnete

Maßzahl, die das Molekulargewichtsverhältnis zwischen dem hydrophilen Molekülteil und dem Gesamtmolekulargewicht mit einbezieht. D.h. ein höherer HLB-Wert bedeutet ein hydrophileres Tensidmolekül, während kleine HLB-Werte hydrophobere Tenside charakterisieren, bei denen die Mizellenbildung begünstigt ist [168]. Innerhalb der kommerziell erhältlichen nichtionischen Tenside waren solche mit mittleren HLB-Werten von 10 am besten zur Mizellenbildung geeignet und führten zu den effektivsten mikrobiellen Transformationen von Kohlenwasserstoffen bzw. zum besten Wachstum auf Alkanen [169].

Aufgrund ihrer bekannten antimikrobiellen Eigenschaften wurden ionische Tenside, wie z.B. Natriumdodecylsulfat, bei den mikrobiellen Transformationen nur selten untersucht. Auch nichtionische Tenside können jedoch inhibierend auf Organismenwachstum und Transformationsleistung wirken. Unterhalb der CMC kann eine Inhibierung auf eine Erhöhung der unspezifischen Membranpermeabilität zurückzuführen sein, während die oberhalb der CMC auftretenden Effekte je nach Tensid und Organismus sehr unterschiedlich sind [170]. So ist Triton X-100 für seine membransolubilisierenden Eigenschaften bekannt, die auch seine Eignung zur Solubilisierung membrangebundener Enzyme begründen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tab. 3-11 aufgeführten nichtionischen Tenside verwendet. Die geringsten für die Transformationsversuche eingesetzten Konzentrationen lagen mit  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  im Bereich der CMC oder etwas darüber. Die höheren eingesetzten Konzentrationen von  $1,0$  und  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  lagen um ein Vielfaches über den CMC der verschiedenen Tenside und ermöglichten so eine effektivere Emulgierung des  $\alpha$ -Pinens.

**Tab. 3-11:** HLB-Werte und kritische Mizellenbildungskonzentrationen der verwendeten nichtionischen Tenside (sofern Daten verfügbar)

| Handelsname         | chemische Bezeichnung   | HLB- | CMC                     |       |
|---------------------|---|------|-------------------------|-------|
|                     |   | Wert | [mmol L <sup>-1</sup> ] | [g/l] |
| <i>Tween 65</i>     | Polyoxyethylen-Sorbitan-Tristearat                            | 10,5 | -                       | -     |
| <i>Tween 80</i>     | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat                             | 15,0 | 0,02                    | 0,03  |
| <i>Span 20</i>      | Sorbitan-Monolaurat   | 8,6  | -                       | -     |
| <i>Brij 35</i>      | Dodecylpoly(oxyethylen-glycolether) <sub>n</sub> (n=23)       | 16,9 | 0,091                   | 0,11  |
| <i>Triton X-100</i> | Octylphenolpoly(oxyethylen-glycolether) <sub>n</sub> (n=9-10) | 13,5 | 0,2                     | 0,13  |

Der Zusatz von Span 20, Triton X-100 und Brij 35 brachte mit steigender Tensidkonzentration bezüglich des Kulturwachstums in Gegenwart von  $\alpha$ -Pinen bei *G. applanatum* und *P. sapidus* zunehmende Verschlechterungen mit sich, die auf eine kombinierte membranschädigende Wirkung von Tensid und Terpen zurückzuführen sind (s. 2.1.9.1.5, Abb. 2-60 bis 2-69). Auffällig war dagegen, daß der Tween 65-Zusatz von 5 g L<sup>-1</sup> im Vergleich zu den niedrigeren Tensidkonzentrationen bei beiden Pilzen wieder zu einer höheren Trockenmasse führte (s. Abb. 2-61 und 2-66). Grund für diesen Effekt könnte sein, daß Tween 65 durch die Pilze verstoffwechselt wird, da es sich bei diesem Tensid um ein Tristearat handelt. Zumindest die Fettsäurereste könnten durch Pilzlipasen abgespalten und danach in die  $\beta$ -Oxidation eingebracht werden.

Bei niedrigeren Tween 65-Konzentrationen wurde dagegen eine deutliche Pilzschädigung festgestellt, da hier die membranschädigende Wirkung des  $\alpha$ -Pinsens durch den wachstumsfördernden Effekt des Tensids nicht überkompensiert wurde.

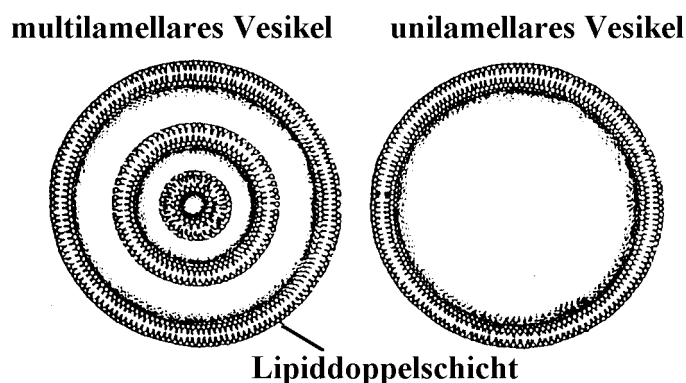
Alle Tenside bis auf Span 20 bewirkten in den eingesetzten Konzentrationen eine im Vergleich zum tensidfreien Kontrollwert verminderte Produktkonzentration. Dies kann auf die Verminderung der Trockenmasse und dadurch der Transformationsaktivität zurückzuführen sein oder auf die schlechtere Substratverfügbarkeit durch Einschluß der Pinentropfen in Tensidmizellen.

Der einzige positive Effekt auf die Transformationsleistung war die leichte Erhöhung der Produktbildung bei Zusatz von Span 20 in einer Menge von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , die bei beiden Pilzen auftrat (s. Abb. 2-62 und 2-67). Signifikante Effekte, die einen weiteren Einsatz von Tensiden für Terpententransformationen rechtfertigen würden, wurden bei diesen Untersuchungen jedoch nicht festgestellt.

#### 3.3.2.1.5 Liposomen als Vehikel für den Substrattransport

Die Verwendung von Tensiden oder organischen Lösungsmitteln zur Verbesserung der Löslichkeit schlecht wasserlöslicher lipophiler Stoffe hat den Nachteil, daß beide z.T. toxische Wirkungen haben können. Als Alternative kommt hier die Verwendung von Diacylphospholipiden (meist Phosphatidylcholin aus Eigelb oder Soja) in Frage. Diese natürlichen Verbindungen bilden in wäßrigen Lösungen spontan vesikuläre Strukturen mit Lipiddoppelschichten aus, die man als Liposomen bezeichnet. Aufgrund der Ähnlichkeit mit den Strukturen von Zellmembranen werden sie häufig als Modellsysteme für Membranen verwendet.

Man unterscheidet multilamellare Vesikel (MLVs, Durchmesser  $>500 \text{ nm}$ ), die aus vielen konzentrisch angeordneten Vesikeln zusammengesetzt sind, und einschichtige (unilamellare) Vesikel, die je nach Größe als „Small unilamellar vesicles“ (SUVs, Durchmesser  $<50 \text{ nm}$ ) oder als „Large unilamellar vesicles“ (LUVs, Durchmesser  $>50 \text{ nm}$ ) bezeichnet werden [171] (vgl. Abb. 3-17).



**Abb. 3-17:** Struktur von multilamellaren und unilamellaren Vesikeln (aus [172])

Alle Liposomen können lipophile Substanzen in ihren lipophilen Intramembranraum und hydrophile Substanzen in den wäßrigen Vesikelinnenraum einschließen und sie – je nach Stabilität und Membranpermeabilität – über einen bestimmten Zeitraum wieder an das umgebende Medium abgeben. Diese Fähigkeit macht Liposomen besonders für den Einsatz als Transportvehikel für Arzneistoffe interessant, da bei richtiger Wahl der Eigenschaften eine kontrollierte Abgabe des Stoffs am Wirkort möglich ist.

Kommerziell werden Liposomen bisher hauptsächlich im Bereich der kosmetischen Mittel zur Verbesserung der Hautresorption sonst nur schlecht resorbierbarer Bestandteile eingesetzt. Auch für Lebensmittel ist die Anwendung in einigen Bereichen von Interesse. So können Aromastoffe in Liposomen eingeschlossen in Lebensmitteln gegen Oxidation, Hydrolyse und Verluste durch Verdampfung geschützt werden. Möglich ist dies auch in Abwesenheit von Öltröpfchen, in denen die meisten Aromastoffe in ihrer natürlichen Matrix bevorzugt gelöst sind [173]. Die senkende Wirkung der Phospholipide auf den Blutcholesterinspiegel und das Phosphatidylcholin als Cholinlieferant macht sie für den Einsatz in Sport- und Energiegetränken interessant. Auch die Stabilisierung von Vitaminen (z.B. Ascorbinsäure) in wäßriger Lösung ist mit Hilfe von Liposomen möglich [174].

Die Eigenschaften von Liposomen können durch die Wahl der verwendeten Lipide und das Herstellungsverfahren in weiten Grenzen variiert werden. Einige Beispiele seien genannt [175]:

- Die Erhöhung des Anteils an gesättigten Lipiden führt zu weniger oxidationsempfindlichen Membranen und zu einer Membranstabilisierung.
- Der Einschluß von Cholesterol (bis zu einem Stoffmengenanteil von 50%) führt wie auch bei natürlichen Membranen zu einer Stabilisierung durch Herabsetzung der Membranfluidität und dadurch verminderte Permeabilität für hydrophile Stoffe.
- Geladene Lipide (z.B. negativ: Phosphatidylglycerol) verhindern die Aggregation von Liposomen durch gegenseitige Abstoßung der gleichsinnig geladenen Teilchen.

Bei dem Einsatz von Liposomen für Biotransformationen mit lebenden Zellen ist vor allem wichtig, wieviel der einzuschließenden Substanz von den Liposomen eingeschlossen werden kann und nach welchem Mechanismus die Aufnahme der Liposomen in die Zelle stattfindet.

Das Einschlußvolumen ist für *hydrophile* Substanzen stark von der Größe der Liposomen abhängig. Bei den kleinen SUVs beträgt das wäßrige Einschlußvolumen aufgrund der starken Krümmung der Membran nur  $0,2-0,8 \text{ L mol}^{-1}$  Phospholipid (bei einem Durchmesser von 25-50 nm) und bei den größeren LUVs  $2,7-17 \text{ L mol}^{-1}$  Phospholipid (bei einem Durchmesser von 100-500 nm).

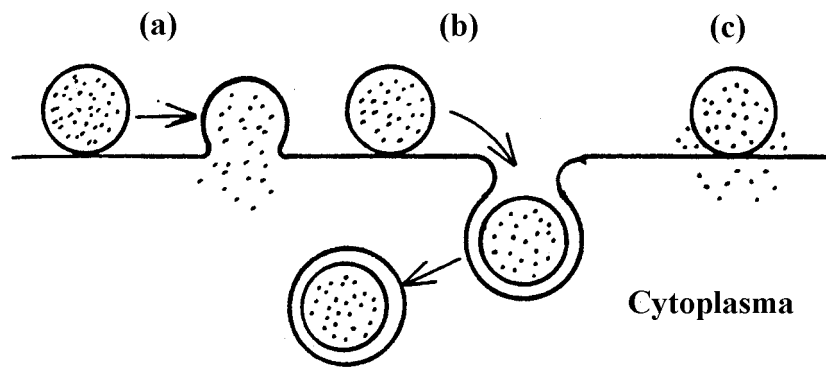
Für *lipophile* Substanzen ist dagegen für das Einschlußvolumen in erster Linie die Gesamtfläche der Lipiddoppelschichten maßgebend, die vor allem durch die Gesamtlipidmenge und weniger durch lamellare Struktur und Größe der Liposomen bestimmt wird.

Für die Aufnahme von Liposomen bzw. deren Inhalt durch lebende Zellen haben hauptsächlich drei Mechanismen Bedeutung [176] (in Abb. 3-18 für unilamellare Vesikel dargestellt):

1. *Fusion* (Abb.3-18 (a)): Hier fusionieren die Liposomen- und die Zellmembran. Die wäßrige Phase des Liposoms gelangt ins Cytoplasma und die Lipidphase löst sich in der Zellmembran.
2. *Endocytose* (Abb.3-18 (b)): Bei diesem Mechanismus wird das Liposom bei der Aufnahme durch die Zelle durch ein von der Zellmembran abgeleitetes Vesikel umhüllt. Dieses Vesikel kann dann mit einem Lysosom fusionieren und aufgelöst werden.
3. *Adsorption* (Abb.3-18 (c)): Das Liposom kann an der Zelloberfläche adsorbiert werden und so Stoffe mit dem Zellinnern austauschen. Daran ist möglicherweise ein aktiver Transport mit Hilfe von Transportproteinen beteiligt.

Für die Aufnahme lipophiler Substanzen mittels Liposomen wird meist der Fusionsmechanismus angenommen. Bei der Verwendung reiner Phospholipid-Liposomen ohne zusätzliche Membranstabilisierung (durch Cholesterol o.a.), deren Fluidität zusätzlich durch darin gelöste lipophile Stoffe (z.B.  $\alpha$ -Pinen) gemindert wird, ist ein Zusammenfließen der beiden Membranen auf jeden Fall begünstigt, während für die Endocytose oder die Adsorption stabilere Membranen notwendig sind.

Die Fusion multilamellarer Vesikel (MLVs) mit der Zellmembran würde nur die äußere Liposomenmembran mit der Zellmembran verschmelzen lassen, während die inneren Vesikel wahrscheinlich zunächst in das Cytoplasma gelangen würden. Hier könnten weitere Fusionschritte mit der Cytoplasmamembran oder mit Membranen von Organellen (Mitochondrien, Zellkern) auftreten.



**Abb. 3-18:** Aufnahme-mechanismen von Liposomen durch Zellen: a) Fusion, b) Endocytose, c) Adsorption (aus [176])

Für Biotransformationen mit Mikroorganismen wurden Liposomen bislang erst wenig eingesetzt. Sie bieten für diese Anwendung potentiell folgende Vorteile:

1. Während bei direkter Substratdosierung eine sofortige Verteilung von der wäßrigen Phase in die lipophile Zellmembran auftritt, stellen die Liposomen eine weitere lipophile Phase dar, die einen zu schnellen Übergang des Substrates in die Cytoplasmamembran verhindern kann. Voraussetzung dafür ist, daß die Fusion langsamer abläuft als die direkte Aufnahme von Terpentropfchen. Dies würde zu einer verminderten Substrattoxizität führen.
2. Durch Liposomen kann die Wasserlöslichkeit lipophiler Substrate durch Einschluß in den lipophilen Membraninnenraum stark erhöht werden.

So konnte beispielsweise die Löslichkeit von Cholesterol von  $1,8 \text{ mg L}^{-1}$  in Wasser durch die Verwendung von Liposomen aus Sojaphosphatidylcholin auf mehr als  $20 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert werden. Mit *Rhodococcus erythropolis* konnten  $10 \text{ g L}^{-1}$  dieses in SUVs gelösten Cholesterols zum Cholesteron oxidiert werden. Während die Verwendung der SUVs hier etwa eine Vervielfachung der Transformationsrate im Vergleich zur wäßrigen Substratsuspension bewirkte, wurde mit MLVs überhaupt kein Umsatz des Cholesterols festgestellt [171].

Die Dehydrierung von Hydrocortison durch *Arthrobacter simplex* mit Liposomen aus Eiphosphatidylcholin führte zu einer Verdoppelung der Transformationsrate im Vergleich zur wäßrigen Substratlösung. Die Verwendung von MLVs führte auch hier zu deutlich schlechteren Ergebnissen als die Verwendung kleinerer Vesikel [177]. Bei einem *Pseudomonas*-Stamm wurde durch die Einkapselung von Octadecan als Kohlen-



stoffquelle in SUVs aus Eiphasphatidylcholin die Wachstumsrate und die maximale Zelldichte etwa verdoppelt, die Sättigungskonstante ( $K_s$ ) betrug  $41 \text{ mg L}^{-1}$  und lag damit um Faktor 60 unter der Konstante in wässriger Substratsuspension.

Während die Substrate dieser Transformationen bei der Kultivierungstemperatur als Feststoffe vorlagen, sind liposomale Substratlösungen mit flüssigen Substraten – also z.B. Monoterpenkohlenwasserstoffen – bislang noch nicht dokumentiert.

Die kleinen unilamellaren Vesikel (SUVs) erschienen für die Terpenbiotransformationen aufgrund des erfolgreichen Einsatzes in den oben beschriebenen Beispielen und außerdem aus folgendem Grund am besten geeignet: Bei den üblichen Herstellungsverfahren für Liposomen muß in einem der Arbeitsschritte ein organisches Lösungsmittel abdestilliert werden. Daher kann das flüchtige Terpensubstrat – im Gegensatz zu den nichtflüchtigen Substraten – erst der fertigen Liposomenlösung zugesetzt werden. Würde man MLVs verwenden, wäre eine gleichmäßige Verteilung des Substrates bis in die inneren Liposomenmembranen schwierig, während dies bei unilamellaren Liposomen einfacher durchführbar ist.

Beim Standardverfahren zur Herstellung von SUVs werden zunächst durch Hydratisierung eines Phospholipidfilms (durch Schütteln mit Pufferlösung oder Wasser) MLVs hergestellt. Daraus können durch Ultraschallbehandlung (Ultraschallsonde oder -bad) SUVs gewonnen werden, die im Gegensatz zu den MLVs optisch fast klare Lösungen bilden. Diese Prozedur wurde auch für die Herstellung der liposomalen Lösungen für die in dieser Arbeit untersuchten Terpententransformationen angewendet (s. 4.6.4).

Die Gewinnung von SUVs ist auch mittels Pressen von MLV-Lösungen mit hohem Druck ( $138 \text{ MPa} = 1380 \text{ bar}$ ) durch einen engen Spalt in der Druckzelle nach FRENCH möglich [178].

Die hier untersuchten Liposomen aus Ei- und Sojaphosphatidylcholin ermöglichten bei der höchsten eingesetzten Liposomenkonzentration von  $660 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  eine  $\alpha$ -Pinenkonzentration von  $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $=449 \text{ mg L}^{-1}$ ). Dies entsprach der 90-fachen wässrigen Sättigungskonzentration von  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (s. 3.2.4.1, Tab. 3-5).

Bezogen auf die direkte Substratdosierung von insgesamt  $1716 \text{ mg L}^{-1}$  ( $= 12,6 \text{ mmol L}^{-1}$ , nicht gelöst, sondern emulgiert) wurde mit Liposomen max. 26% des  $\alpha$ -Pinsens in die Kulturen dosiert. Größere Mengen konnten liposomal nicht in Lösung gebracht werden. Dadurch kommen die insgesamt sehr geringen Produkt-

konzentrationen auch in den liposomenfreien Kontrollwerten der Liposomenversuche zustande, die bei *P. sapidus* max.  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ , bei *M. giganteus*  $1,05 \text{ mg L}^{-1}$  und bei *T. hirsuta*  $2,3 \text{ mg L}^{-1}$  betragen. Bei direkter Substratdosierung wurden dagegen Mengen von  $39 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $44 \text{ mg L}^{-1}$  bzw.  $48 \text{ mg L}^{-1}$  erhalten (vgl. 2.1.10, Abb. 2-77, 2-83, 2-81).

Bei den mit *P. sapidus*, *T. hirsuta* und *M. giganteus* durchgeführten Transformationen mit liposomalen  $\alpha$ -Pinen-Lösungen konnte bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Transformationsleistung festgestellt werden:

1. Der Phospholipidzusatz führt zu einer *Wachstumsverbesserung*, die wie folgt erklärt werden kann:
  - a) Die Phospholipide werden als zusätzliche Nährstoffquelle genutzt (Abspaltung der Fettsäurereste, des Phosphat- oder Cholinrestes durch Phospholipasen und weitere Metabolisierung der Spaltprodukte).
  - b) Der Einbau der Phospholipide in die Pilzmembranen führt zu einer Trockenmassezunahme (s. 2.1.9.1.6, Abb. 2-70). Die Dosis von  $66 \text{ } \mu\text{mol}$  Phosphatidylcholin pro  $100 \text{ mL}$  Kultur entspricht jedoch nur ca.  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , d.h. eine Trockenmassezunahme von  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  bei *P. sapidus* und  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  kann durch eine einfache Aufnahme in die Membranen nicht erklärt werden.
2. Der Einschluß von  $\alpha$ -Pinen in die Lipiddoppelschicht der Liposomen führt zu einer geringeren Substrattoxizität (Wachstum im Gegensatz zur direkten Substratzugabe nicht gehemmt), hat aber auch zu Folge, daß die Transformationsleistung verringert wird bzw. nur bei kleinen Substratmengen ( $0,82 \text{ mmol L}^{-1}$ ) im Vergleich zum Kontrollwert mit gleicher Substratmenge erhöht wird (bei *T. hirsuta* um ca. 27%).

Es bleibt festzuhalten, daß nur bei *T. hirsuta* die Verwendung von kleinen Liposomenkonzentrationen geringfügige Verbesserungen in der Transformationsleistung im Vergleich zum Kontrollwert brachte. Da jedoch die Gesamtproduktmenge aufgrund der Limitierung der eingebrachten Terpenmenge im Vergleich zu der direkten Dosierung (als Terpenemulsion) stark verringert war, erwies sich auch bei diesem Pilz die Verwendung von Liposomen als nicht sinnvoll.

### 3.3.2.2 Sauerstoff als Cosubstrat der Oxyfunktionalisierungen

#### 3.3.2.2.1 Sauerstoffversorgung in Kulturen von Mikroorganismen

Der Sauerstoff ist neben dem eingesetzten Terpen das Cosubstrat bei Oxyfunktionalisierungen. Die Löslichkeit dieses unpolaren Moleküls in Wasser ist gering. Bei 24°C (Kultivierungstemperatur) beträgt sie in reinem Wasser 1,29 mmol L<sup>-1</sup> (=41,2 mg L<sup>-1</sup>). Da außerdem bei den meisten biotechnologischen Prozessen Luft statt Sauerstoff zur Belüftung eingesetzt wird, ist unter realen Bedingungen (Sauerstoffpartialdruck: 0,212 bar, Luftdruck 1 bar) maximal eine O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,27 mmol L<sup>-1</sup> (=8,8 mg L<sup>-1</sup>) zu erwarten. Diese wird durch die im Kulturmedium gelösten Stoffe jedoch noch weiter vermindert. So führt beispielsweise eine Natriumchloridkonzentration von 1 mol L<sup>-1</sup> zu einer Verminderung der Sauerstofflöslichkeit um 30% [179].

Für eine optimale Biomasseproduktion bzw. Produktbildung in biotechnologischen Prozessen ist eine bestimmte Mindestsauerstoffkonzentration notwendig, deren Überschreiten keine weitere Verbesserung bewirkt. Diese Sättigungskonzentration wird auch als *kritische Sauerstoffkonzentration* ( $c_{\text{krit}}$ ) bezeichnet und ist vom eingesetzten Organismus abhängig. Auch Organismen mit großer respiratorischer Aktivität können noch bei Sättigungsgraden weit unter 100% ihre volle Stoffwechselaktivität entfalten. Die kritischen Sauerstoffkonzentrationen liegen für die meisten Organismen im Bereich von 2-9% Sättigung (bei Verwendung von Luft).

Basidiomyceten und die meisten anderen Pilze sind obligate Aerobier. Einige Pilze (z.B. fakultativ anaerobe Hefen oder unter Wasser lebende Schimmelpilze [135]) können jedoch auch anaerob wachsen.

Die Kultivierung aerober Pilze erfordert eine gute Sauerstoffversorgung. Sind die eingesetzten Substrate und Produkte flüchtig, so müssen darüberhinaus Vorkehrungen getroffen werden, um durch die Belüftung bedingte Verluste dieser Stoffe zu minimieren. Außerdem hat der Sauerstoffpartialdruck im Verlauf der Kultivierung nicht nur Einfluß auf das Wachstum der Organismen, sondern auch auf den biotechnologischen Prozeß, insbesondere bei oxidativen Umsetzungen.

Neben den direkten Auswirkungen auf die Transformationsrate ist besonders bei Oxygenasen Einfluß auf die Enzymsynthese bekannt. Während beispielsweise der opti-

male Sauerstoffgehalt für die Synthese von 11 $\alpha$ -Hydroxylase durch *Rhizopus nigricans* bei nur 10-15 % Luftsättigung liegt, sind die für maximale Transformationsleistungen optimalen Sauerstoffgehalte in diesem System weitaus höher [180].

In den für viele Kultivierungsversuche eingesetzten Schüttelkolben sind die Sauerstoffübergänge so gering, daß die kritische Konzentration für viele aerobe Organismen unterschritten wird. Der Übergang findet ausschließlich durch die Flüssigkeitsoberfläche und durch eventuell dispergierte Luftbläschen statt. Im 500 mL-Kolben mit 100 mL Medium und einer Schüttelgeschwindigkeit von 250 rpm wurde z.B. ein Sauerstoffübergang von 20 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> gemessen der durch Verwendung von Schikanekolben auf 50 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> gesteigert werden konnte [179].

Eigene Experimente zeigten, daß bei der  $\alpha$ -Pinen-Transformation durch *P. sapidus* im Verlauf der Transformation schon nach einem Tag Transformationsdauer (3,5 Tage Kulturalter) die Sauerstoffsättigung im Medium unter 10% lag und im weiteren Verlauf soweit absank, daß sie mit der verwendeten Sauerstoffelektrode nicht mehr meßbar war (vgl. 2.1.9.2 Abb. 2-75). Daraus wird ersichtlich, daß ein Einfluß der Sauerstoffversorgung auf die hier untersuchte Oxyfunktionalisierung von Terpenen sehr wahrscheinlich ist.

Auch bei industriellen biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Pilzen ist die Sauerstoffversorgung häufig der Faktor, der die Produktionsleistung limitiert [5]. Bei der Entwicklung von Bioprozessen mit Pilzen muß daher ein besonderes Augenmerk auf die Durchführung der Belüftung gerichtet werden, vor allem im Hinblick auf die Möglichkeiten zur Maßstabsübertragung (Scaling-up) eines Produktionsverfahrens.

#### 3.3.2.2.2 Möglichkeiten zur Belüftung von Bioreaktoren

Der am häufigsten eingesetzte Reaktortyp ist der *Rührkesselreaktor*, ein zylindrisches Gefäß mit einem an einer vertikalen Welle angebrachten Rührer. Der Gasaustausch (Sauerstoffversorgung und Kohlendioxidabtransport) erfolgt hier durch direkte Zuführung von Luft- oder Sauerstoffblasen von unten her (z.B. durch ein Belüftungsrohr oder direkt durch den Rührer).

Statt dieser direkten ist auch eine indirekte Belüftung unter Verwendung hydrophober Membranen möglich. Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Membrantypen: *Homogene Membranen* weisen keine Poren auf und der Stoffaustausch erfolgt aus-

schließlich durch Diffusion durch das Membranmaterial. Im Unterschied dazu weisen *mikroporöse Membranen* Poren auf, durch die nicht nur Diffusion, sondern bei ausreichendem Druckgefälle auch ein Transmembranfluß auftreten kann. Die Porengröße ist von der Anwendung abhängig, um eine ausreichende Sterilbarriere zu erhalten sind für Standardanwendungen 0,2 µm üblich.

Beide Membrantypen ermöglichen im Prinzip eine blasenfreie Belüftung der Kulturen. Bei Verwendung von mikroporösen Membranen ist dies möglich, solange der angewendete Gasdruck unterhalb eines bestimmten Grenzwertes (= „Bubble point“) liegt.

Außer dem Membrantyp ist auch die Membrananordnung variierbar. Die einfachsten Membranen sind *Flachbettmembranen*, deren Austauschfläche jedoch gering ist. Häufig werden daher *Hohlfasermembranen* verwendet. Sie werden meist in Bündeln angeordnet und in Kunststoffgehäuse eingebaut als *Hohlfasermembranmodule* eingesetzt. Auf diese Weise können in Gehäusen mit Gesamtvolumina von 90 bis 1000 mL Membranflächen von 0,5 bis 5 m<sup>2</sup> untergebracht werden [181]. Diese Module werden aufgrund ihrer großen Membranfläche in der Biotechnologie bevorzugt angewendet.

Homogene Membranen, z.B. aus Silikonschläuchen, ermöglichen eine einfache blasenfreie Kulturbelüftung. Sie weisen aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität eine gute Sauerstoffpermeabilität und eine gute chemische und mechanische Beständigkeit auf. Sie haben z.B. beim Einsatz in der biologischen Abwasserbehandlung den Vorteil, das flüchtige Verunreinigungen im Abwasser (z.B. Xylen) – im Gegensatz zur konventionellen direkten Belüftung – nicht über die Abluft ausgetragen werden. Die Ausbildung eines Biofilms, also einer immobilisierten Schicht von Mikroorganismen, wird in diesem Anwendungsbereich aufgrund der ausschließlich durch die Membran stattfindenden Sauerstoffversorgung begünstigt. [182-184].

Auch für Pilze können Silikonmembranschläuche angewendet werden. So konnten VENKATADRI und IRVINE [185] den Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium* auf der Wicklung eines Silikonschlauches (0,8 mm Wandstärke, insgesamt 685 cm<sup>2</sup> Membranfläche) immobilisieren und erzielten eine hohe Ligninperoxidaseaktivität. Ein Sauerstoffmangel aufgrund des Zuwachsens des Membranschlauches wurde hier nicht festgestellt.

Für die in dieser Arbeit untersuchte Transformation von Terpenen erwies sich Silikonmaterial jedoch als ungeeignet, da es eine beträchtliche Absorptionskapazität für die

Substrate aufweist. Dadurch quillt das Material auf, verliert seine mechanische Festigkeit und ist dann nicht mehr stabil genug, um den für einen guten Sauerstofftransport notwendigen Gasdrücken standzuhalten.

Dieses Problem tritt bei den mikroporösen Hohlfasern aus Polypropylen nicht auf. Auch sie können Terpene in größeren Mengen aufnehmen, behalten dabei jedoch ihre mechanische Festigkeit.

Die Verwendung mikroporöser Membranen in Hohlfasermodulen ist aufgrund der großen Oberfläche bezüglich der Effektivität des Gasaustausches im Prinzip den einfachen Wicklungen von Hohlfasern oder auch den Flachbettmembranen vorzuziehen. Bakterien-, Hefe- und auch Säugerzellkulturen können z.B. aus einem Rührkesselreaktor im Kreislauf durch solche Belüftungsmodule gepumpt werden, wobei der Faserinnenraum mit Luft oder Sauerstoff beschickt wird. Bei der sehr effektiven Dioxygenierung von Fluorbenzen durch *Pseudomonas putida* konnte dadurch ein bei direkter Belüftung auftretender Substratverlust vermieden werden [186].

Bei myzelbildenden Pilzen ist ein solch einfaches Verfahren nicht anwendbar, da sich Myzelsuspensionen nicht über längere Zeit durch Hohlfasermodule pumpen lassen. Eine andere Möglichkeit wäre die direkte Immobilisierung des Pilzes in einem Hohlfasermembranmodul, das durch zwei verschiedene Fasertypen (hydrophobe und hydrophile Membran) sowohl mit Sauerstoff als auch mit Nährstoffen versorgt wird. Dieser Ansatz führte bei *Aspergillus niger* sehr bald zu einem vollständigen Zuwachsen des Reaktors und zur Kompression der Hohlfasern, so daß der Durchfluß für Luft und Nährlösung behindert war [187].

Aus diesem Grund erschien für die hier durchgeführten Citronelloltransformationen mit dem Basidiomyceten *C. carcharias* folgende Lösung sinnvoller:

1. Statt eines Silikonmembranschlauches wurde eine mikroporöse Hohlfasermembran aus Polypropylen verwendet und
2. die Belüftung wurde mit einer Hohlfaserwicklung direkt im Rührkesselreaktor statt mit Hilfe eines hydrophoben Hohlfasermembranmodules vorgenommen.

Die Belüftung wurde dabei so durchgeführt, daß ein geringer Transmembranfluß ( $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) gewährleistet war, um ein Verschließen der Membranporen durch Partikel aus dem Medium (=Membranfouling) zu verhindern.

Die Transformation im Membranreaktor ergab dabei im Vergleich zum direkt belüfteten Reaktor für die Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* einen deutlich bessere

Sauerstoffversorgung als die direkte Belüftung. Nur bei Membranbelüftung war eine effektive Terpenttransformation feststellbar (vgl. 2.2.6). Die im 2L-Reaktor angebrachte Membran ermöglichte eine ausreichende Sauerstoffsättigung auch in dicht gewachsenen Kulturen. Diese Variante der Membranbelüftung stellt damit für Pilze die beste Möglichkeit einer indirekten Belüftung dar.

Die Anwendung solcher als *Membranreaktoren* bezeichneten Reaktoren ist jedoch nicht auf die Belüftung beschränkt, sondern bietet noch eine Reihe anderer Anwendungsmöglichkeiten, die alle gemeinsam haben, daß Zellen oder Enzyme von den Substrat- oder Produktströmen durch künstliche Membransysteme getrennt werden.

### 3.3.2.2.3 Weitere Anwendungen von Membranen in Bioreaktoren

Als weitere Anwendungsbereiche für Membranen in Bioreaktoren sind zu nennen [192]:

1. *Rückhaltung von Zellen oder Enzymen im Reaktor*: Dies ermöglicht eine kontinuierliche Kultivierung, indem die Zellen im Reaktor zurückgehalten werden, während das Medium kontinuierlich hindurchströmen und kontinuierlich ersetzt bzw. nach Produktentfernung oder Substratzuführung dem Reaktor wieder zugeführt werden kann. Dies führt zur Vereinfachung einer kontinuierlichen Kultivierung, da ein Biomasseverlust (wash-out), wie er bei einer konventionellen kontinuierlichen Kultivierung entsteht, verhindert werden kann [97, 188, 189].

Die Rückhaltung von Enzymen im Reaktor bietet auch eine Alternative zur klassischen Immobilisierung von Enzymen, weil dadurch die chemische Bindung an einen Träger nicht mehr notwendig ist, die häufig zu einer Abnahme der Enzymaktivität führt.

2. *Schutz von Enzymen oder Zellen vor mechanischem Streß*: Besonders Säugetierzellen sind gegenüber mechanischem Streß sehr empfindlich. Schon die bei der direkten Belüftung auftretenden Luftblasen können zu einer Schädigung führen. Membranreaktoren bieten die Möglichkeit, sowohl den direkten Kontakt mit Gasblasen als auch die durch mechanisches Rühren entstehenden Scherkräfte zu verhindern, indem sowohl der Nährstoff- als auch der Sauerstofftransport unter Verwendung von Membranen durchgeführt wird.

3. *Selektive Bereitstellung bzw. Entfernung von Substraten bzw. Produkten*: Einerseits erlaubt die zellfreie Abtrennung von Medium eine Ergänzung oder einen Austausch des Mediums (z.B. Ersetzen eines Wachstumsmediums durch ein Transformations-

medium). Aus dem so zellfrei abgetrennten Medium können dann die Produkte gewonnen werden. Aber auch eine direkte Abtrennung von Produkten aus dem Bioreaktor mit Hilfe von Membranen ist möglich.

Als Beispiel für die direkte Abtrennung aus dem Reaktormedium ist die *Pervaporation* zu nennen, bei der flüchtige Produkte aus dem Reaktormedium durch eine Membran diffundieren und auf der anderen Seite der Membran in die Gasphase übergehen. Der Prozeß kann durch einen Gasstrom oder durch Vakuum beschleunigt werden. Diese Methode ist sehr interessant für die Gewinnung von Aromastoffen aus wäßrigen Medien [193]. Für die Gewinnung von Transformationprodukten ist sie jedoch nicht geeignet, sofern die eingesetzten Substrate, also z.B. Terpene, flüchtig sind und ebenfalls abgetrennt würden.

Für diese Anwendung wäre stattdessen eher die *Membranextraktion* geeignet, bei der die Produkte mit einem geeigneten organischen Extraktionsmittel mit einer Membran an der Phasengrenzfläche aus dem wäßrigen Medium extrahiert werden [193-195]. Bei Verwendung des Substrates oder zumindest eines Gemisches aus Substrat und anderen geeigneten Lösungsmitteln als Extraktionsmittel wäre auf diese Weise auch eine kontinuierliche Substratergänzung möglich.

Die in 2.1.11 beschriebene Membranextraktion von Carveol und Carvon mit Limonen als Extraktionsmittel bietet die Möglichkeit, Produkte der Terpenttransformation kontinuierlich aus einem Bioreaktor zu entfernen. Die Kombination mit einer Kieselgel-Adsorptionssäule ermöglicht die selektive Entfernung der oxyfunktionalisierten Terpene aus der Kohlenwasserstoffphase, eine Verbesserung der Wiederfindungsraten wäre durch Optimierung der Desorptionsmethode oder durch die Verwendung anderer polarer Adsorbentien möglich.



Die Anwendbarkeit der Membranextraktion für Terpenttransformationen konnte anhand dieses Beispiels modellhaft gezeigt werden. Der Einsatz in einem Bioprozeß würde Kulturen erfordern, die entweder direkt durch das Membranmodul gepumpt werden können oder bei denen die Trennung von Zellmasse und Medium über einer hydrophile Membran einfach möglich ist. Dies träfe für Bakterien und auch für Hefen ohne weiteres zu.

### 3.4 Ausblick

Biotransformationen lipophiler Substrate wurden anhand der Terpententransformationen durch Basidiomyceten untersucht. Die Identifizierung der Produkte und die ausführliche Untersuchung und Optimierung der Kultivierungs- und Transformationsbedingungen für die eingesetzten Basidiomyceten stellten einen Schwerpunkt der Arbeit dar. Diese Notwendigkeit ist bei jedem für Biotransformationen eingesetzten Biokatalysator gegeben und begrenzt insoweit die modellhafte Anwendung eines biologischen Systems.

Bezüglich der erhaltenen Produkte läßt sich festhalten, daß die als Aromastoffe interessanten allylischen Alkohole und Ketone bei allen untersuchten Transformationen auftraten und daß die maximale Konzentration von ca. 100 mg L<sup>-1</sup> (Summe Carveole + Carvon) bei der Limonentransformation durch *P. sapidus* nach einwöchiger Adaption der Vorkulturen erzielt wurde. Die besten Transformationsergebnisse, die eine Anwendung des Biokatalysators in einem Bioprozeß möglich erscheinen lassen, wurden bei der Citronellol-Transformation durch *C. carcharias* erhalten, sofern das Substrat in geringen Konzentrationen zugegeben wurde. Das hier erhaltene 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol wies allerdings keine Aromastoffeigenschaften auf. Das als Duftstoff interessante Rosenoxyd wurde dagegen nur als Nebenprodukt mit max. 2,5 mg L<sup>-1</sup> gebildet.

Hauptproblem bei den Terpententransformationen durch Basidiomyceten war die Substrattoxizität, die vor allem bei den Monoterpenkohlenwasserstoffen eine Aufrechterhaltung der Transformationsaktivität über längere Zeiträume erschwerte. Resistenzmechanismen, die bei einigen anderen Terpententransformierern (*Pseudomonas* sp.) die Terpentoleranz stark erhöhen, traten bei den hier untersuchten Pilzen nicht auf.

Die Ergebnisse der Versuche zur Optimierung der Umgebungsbedingungen (vor allem der Medienzusammensetzung) lassen den Schluß zu, daß bei Gewährleistung eines guten Kulturwachstums in einem komplexen Medium zusätzliche Medienbestandteile für die Transformationsleistung kaum Gewicht haben. Stattdessen kann eine Substratinduktion der transformierenden Enzyme oder eine Adaption der Organismen einen sehr deutlichen Effekt haben, wie es für die Limonen-Transformation durch *P. sapidus* belegt wurde.

Versuche zur Verbesserung der Substratverfügbarkeit mittels organisch-wäßriger Zwei-phasensysteme, Liposomen oder nichtionischer Tenside führen nicht zu Verbesserungen der Transformationsleistung. Dies ist auf die gute Membranpermeabilität der kleinen, unpolaren Terpenmoleküle zurückzuführen. Die Transformationsleistung ist zumindest bei Monoterpenen und anderen kleinen lipophilen Molekülen (einfache Aromaten, kurzkettige Alkane) nicht durch die Verfügbarkeit des Substrates für den Mikroorganismus limitiert, sondern in erster Linie durch die vom Organismus bereitgestellte Enzymaktivität und seine Fähigkeit, durch die lipophilen Substrate bedingten Membranschädigungen entgegenzuwirken. Auf lipophile Substanzen, die bei der Kultivierungstemperatur als Feststoffe vorliegen (z.B. Steroide, Di- und höhere Terpene, langkettige Alkane, PAK) sind diese Ergebnisse jedoch so nicht übertragbar.

Der Einsatz effektiver Terpentransformierer würde die Möglichkeit zur Entwicklung eines integrierten Konzeptes bieten, daß neben einer kontinuierlichen Substratzuführung in kleinen Mengen (zur Minimierung der Toxizität) eine effektive Kulturbelüftung, kontinuierliche Versorgung mit notwendigen Nährstoffen und eine kontinuierliche Produktgewinnung umfaßt. Ziel wäre also letztlich eine Chemostatkultur.

Für die Umsetzung eines solchen Konzeptes wäre die Anwendung von Membranen sowohl für die Kulturbelüftung als auch für die Substratzuführung und Produktgewinnung denkbar. Die Belüftung bei den Reaktorversuchen mit *C. carcharias* und die Substratzuführung von Limonen und die Produktgewinnung von Carveol/Carvon (im abiotischen Versuch) mit Hohlfasermembranmodulen zeigten im Rahmen dieser Arbeit die prinzipielle Anwendbarkeit solcher Systeme.

Ein Teilziel aus dem weiten Gebiet der Transformationen lipophiler Substanzen mit Biokatalysatoren in wäßrigen Systemen konnte im Rahmen dieser Arbeit insofern erreicht werden, als eine weitgehende Eingrenzung der Problematik gelang:

Wenn effektive, einfach zu handhabende Terpentransformierer zu Verfügung ständen (z.B. rekombinante Bakterienstämme), die nicht nur zu Teiltransformationen sondern zu vollständigen Oxyfunktionalisierungen in der Lage sind, wäre die Entwicklung eines vollständigen Bioprozesses möglich. Die Optimierung müßte den Schwerpunkt dann nicht auf physiologische Untersuchungen legen, sondern könnte gezielt auf einen technischen Prozeß hinarbeiten.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Pilzkulturen

**Tab. 4-1:** Namen und Bezugsquellen der verwendeten Pilzstämmen

| Wissenschaftlicher Name         |                                  | Kultursamml. | Stammnr.       |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------|
| <i>Boletus luridus</i>          | (Schaeffer:Fries)                | CBS          | 115.42         |
| <i>Corynespora cassiicola</i> * | (Berk. & Curt.) Wei.             | DSM          | 62475          |
| <i>Cyathus africanus</i>        | Brodie                           | DSM          | 1593           |
| <i>Cyathus striatus</i>         | (Hudson:Pers.) Willdenow         | DSM          | 1652           |
| <i>Cystoderma carcharias</i>    | (Persoon) Fayod                  | CBS          | 157.47         |
| <i>Diplodia gossypina</i> *     | Cooke                            | ATCC         | 10936          |
| <i>Fomitopsis pinicola</i>      | (Swartz:Fr.) Karst.              | DSM          | 4957           |
| <i>Ganoderma applanatum</i>     | (Persoon) Patouillard            | CBS          | 250.61         |
| <i>Grifola frondosa</i>         | (Dickson:Fries) S.F. Gray        | CBS          | 480.63         |
| <i>Ischnoderma benzoinum</i>    | (Wahlenberg:Fr.) Karsten         | CBS          | 311.29         |
| <i>Lepista nuda</i>             | (Bull.:Fr.) Cooke                | DSM          | 8620           |
| <i>Meripilus giganteus</i>      | (Persoon:Fries) Karsten          | CBS          | 581.86         |
| <i>Paxillus involutus</i>       | (Batsch:Fries) Fries             | CBS          | 477.89         |
| <i>Phaeolus schweinitzii</i>    | (Fr.:Fr.) Patouillard            | DSM          | 5136           |
| <i>Phellinus pini</i>           | (Brot.:Fr.) A. Ames              | DSM          | 5238           |
| <i>Pholiota squarrosa</i>       | (Weigel:Fr.) Kummer              | DSM          | 5127           |
| <i>Pleurotubs cornucopiae</i>   | (Paulet) Rolland                 | DSM (Hübsch) | 8298 (P 125-7) |
| <i>Pleurotus columbinus</i>     | Quel. apud Bres.                 | DSM          | 3371           |
| <i>Pleurotus flabellatus</i>    | (Berkeley & Broome) Sacc.        | CBS          | 665.85         |
| <i>Pleurotus flabellatus</i>    | (Berkeley & Broome) Sacc.        | DSM (Hübsch) | 8299 (P 127-2) |
| <i>Pleurotus lampas</i>         | Berkeley                         | CBS          | 323.49         |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>      | (Jacquin:Fr.) Kummer             | DSM          | 1020           |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i>    | (Fr.:Fr.) Quélet                 | DSM          | 9558           |
| <i>Pleurotus sajor-caju</i>     | (Fr.) Singer                     | DSM (Hübsch) | 5339 (P 225-1) |
| <i>Pleurotus sapidus</i>        | (Schulz. apud Kalchbr.)<br>Sacc. | FSU          | P 226-1        |
| <i>Pleurotus sapidus</i>        | (Schulz. apud Kalchbr.)<br>Sacc. | DSM (Hübsch) | 8266 (P 226-1) |
| <i>Trametes hirsuta</i>         | (Wulfen:Fries) Pilát             | CBS          | 282.73         |

\* Deuteromyceten

**Kultursammlungen:**

CBS = Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande

FSU = Pilzkultursammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Sektion Biologie, Weimar

DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

**4.2 Chemikalien****4.2.1 Bestandteile der Kulturmedien**Tab. 4-2: **Verwendete Nährmedienbestandteile**

|  | <b>Hersteller</b> | <b>Best.-Nr.</b> | <b>Reinheit</b>     |
|--|-------------------|------------------|---------------------|
| Agar Agar                              | Merck             | 1.01614          | f. d. Mikrobiol.    |
| Asparagin-Monohydrat, L-               | Merck             | 1.01565          | reinst              |
| Biotin, (+)-                           | Fluka             | 14400            | >99%                |
| CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O | Riedel-De Haen    | 12849            | -                   |
| FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | Riedel-de Haen    | 12319            | -                   |
| Folsäure                               | Fluka             | 47620            | >97%                |
| Glucose-Monohydrat, D-(+)-             | Merck             | 1.08342          | f.d. Mikrobiol.     |
| KCl                                    | Riedel-de Haen    | 12636            | reinst              |
| Hefeextrakt                            | Merck             | 1.03753          | f. d. Mikrobiol.    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | Merck             | 1.12034          | f.d. Molekularbiol. |
| Malzextrakt                            | Merck             | 1.05391          | f. d. Mikrobiol.    |
| MgSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O | Riedel-de Haen    | 13143            | -                   |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | Fluka             | 63555            | purum p.a.          |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | Fluka             | 71502            | Microselect >99%    |
| NaCl                                   | Riedel-de Haen    | 13423            | reinst              |
| Nicotinsäure (Niacin)                  | Fluka             | 72309            | >99,5%              |
| Pantothenat, Calcium-D-                | Fluka             | 21210            |                     |
| Pyridoxal-Hydrochlorid                 | Merck             | 1.07523          | >99%                |
| Riboflavin                             | Dr. Marcus        | -                | -                   |
| Thiaminhydrochlorid                    | Fluka             | 95160            | -                   |
| Titriplex III                          | Merck             | 8418             | -                   |
| Universalpepton M66                    | Merck             | 1.07043          | f. d. Mikrobiol.    |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | Fluka             | 96500            | puriss. p.a.        |

**Tab. 4-3:** Spezielle Medienzusätze für die Substrat-Dosierungs-Versuche

|  | <b>Hersteller</b> | <b>Best.-Nr.</b> | <b>Reinheit</b>  |
|--|-------------------|------------------|--|
| Brij 35                                    | Sigma             | P-1254           | k.A.   |
| Miglyol® 812 S                             | Hüls AG, Witten   | -                | Kokosöl-Fraktion:<br>(56% Octansäure,<br>42% Decansäure<br><2% Dodecansäure) |
| Paraffinöl, dünnflüssig                    | Fluka             | 76233            | Ph Eur   |
| Phosphatidylcholin, 3-sn- (aus Eigelb)     | Fluka             | 61755            | ca. 60%  |
| Phosphatidylcholin, 3-sn- (aus Sojabohnen) | Fluka             | 61758            | >40%   |
| Span 20                                    | Fluka             | 85544            | k.A.   |
| Triton X-100                               | Sigma             | X-100            | Lab. grade   |
| Tween 65                                   | Fluka             | 93778            | k.A.   |
| Tween 80                                   | Riedel-de Haen    | 63161            | Prosynth   |

#### 4.2.2 Standardsubstanzen, Substrate und Inhibitoren

**Tab. 4-4:** Verwendete externe (S) und interne (ISTD) Standards für die GC-FID,  
GC-MS (MS) sowie Substrate (Sub.) und Inhibitoren (I) für die Biotransformationen

|                       | <b>Hersteller</b> | <b>Best.-Nr.</b> | <b>Reinheit</b> | <b>Verwendung</b> |
|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| Aminobenzotriazol, 1- | Fluka             | 07035            | purum (>98%)    | I                 |
| Campher, R-(+)-       | Sigma             | C-9380           | 99%             | ISTD              |
| Carveol, cis/trans-   | Aldrich           | 19.238-4         | 97%             | S, MS             |
| Carvon, (R)-(-)-      | Fluka             | 22060            | puriss., 99%    | S                 |
| Carvon, (S)-(+)-      | Merck             | 818410           | >99%            | S                 |
| Citronellol, (+)-β-   | Fluka             | 27478            | puriss., >99%   | Sub.              |
| Citronellol, (+/-)-β- | Fluka             | 27480            | pract. (90-95%) | S, MS, Sub.       |
| Citronellol, (-)-β-   | Fluka             | 27483            | puriss. >99%    | Sub.              |

|  | <b>Hersteller</b> | <b>Best.-Nr.</b> | <b>Reinheit</b>  | <b>Verwendung</b> |
|--|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Cyclohexenoxid   | Fluka             | 29260            | purum (99%)      | I                 |
| Dimethyl-1-octanol, 3,7-   | Fluka             | 41011            | purum (>98%)     | S                 |
| Fenchol, (+)-  | Fluka             | 46198            | puriss., >99,5%  | S, MS             |
| Heptansäuremethylester   | Sigma             | H-6754           | 99%              | ISTD              |
| Limonen, R-(+)-  | Fluka             | 62120            | purum, ca. 98%   | S, Sub.           |
| Limonen, S-(-)-  | Fluka             |                  | puriss., >99%    | Sub.              |
| Myrtaol, (+)-trans   | Fluka             | 70117            | puriss., >99%    | S, MS             |
| Myrtaol, (-)-cis   | Fluka             | 70154            | puriss., >99%    | S, MS             |
| Myrtenal   | Fluka             | 70125            | purum, > 99%     | S, MS             |
| Myrtenol, (-)-   | Fluka             | 70158            | puriss., ca. 99% | S, MS             |
| Nonansäuremethylester  | Sigma             | N-5627           | 99%              | ISTD              |
| Pinandiol, 2,3-  | Fluka             | 80594            | purum, >98%      | MS                |
| Pinen, (+)- $\alpha$ -   | Fluka             | 80604            | purum, >97%      | S                 |
| Pinen, (+/-)- $\alpha$ -   | Aldrich           | 14,752-4         | 98%              | S, Sub.           |
| Pinen, (-)- $\alpha$ -   | Fluka             | 80600            | purum, >97%      | S                 |
| Pinen, (1S)-(-)- $\beta$ -   | Aldrich           | 11,208-9         | 99%              | S, Sub.           |
| Pinocarveol, trans-  | Fluka             | 80613            | purum, ca. 98%   | S, MS             |
| Proadifen (SKF-525 A)<br>(= $\alpha$ -Phenyl- $\alpha$ -propyl-<br>benzenessigsäure 2-<br>[diethylamino]ethyl ester) | Sigma             | P-1061           | >95%             | I                 |
| Rosenoxid, (+)-  | Fluka             | 83915            | puriss., >99%    | S, MS             |
| Terpineol, (+)- $\alpha$ -   | Fluka             | 86481            | puriss., ca. 99% | S, MS             |
| Verbenol, (+)-cis-   | Sigma             | V-5755           | 95%              | S, MS             |
| Verbenon   | Fluka             | 94882            | puriss., >99%    | S, MS             |

### 4.2.3 Weitere Chemikalien

**Tab. 4-5:** Weitere Chemikalien

|  | <b>Hersteller</b>                 | <b>Best.Nr.</b> | <b>Reinheit</b> |
|--|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Bengalrosa<br>(gebunden an Polystyren)                     | Fluka                             | 11955           | k.A.            |
| Chlorperoxybenzoesäure, m-                                 | Aldrich                           | 27,303-1        | 57-86%          |
| 2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol                                  | Aldrich                           | E 455-0         | >99%            |
| Kieselgel 60 (0,063-0,200<br>mm Korngröße, 70-230<br>mesh) | Merck                             | 7734            | -               |
| N-Methyl-N-nitroso-p-toluen-<br>sulfonamid (Diazald)       | Aldrich                           | D2,800-0        | >99%            |
| N-Methyl-N-trimethylsilyl-<br>trifluoracetamid (MSTFA)     | Macherey-Nagel,<br>Düren, Germany | 70127           | k.A.            |
| Wasserstoffperoxid 30%                                     | Fluka                             | 95300           |                 |

### 4.2.4 Lösungsmittel

**Tab. 4-6:** Lösungsmittel

|                     | <b>Hersteller</b>  | <b>Best.-Nr.</b> | <b>Reinheit bzw. Reinigung /<br/>Lagerung</b> |
|---------------------|--------------------|------------------|---|
| Dichlormethan       | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |
| Ethanol, unvergällt | Kraul & W.         | -                | 96%   |
| Ether               | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |
| Ethylacetat         | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |
| Hexan, n-           | Applichem          | A 1623           | f. d. HPLC / gasdicht                         |
| Methanol            | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |
| Pentan              | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |
| Propanol, 2-        | Fluka              | 59307            | f. d. HPLC / gasdicht                         |
| Propanol, 2-        | Hochschullieferung | -                | frisch dest. / gasdicht                       |



### 4.2.5 Gase für die Gaschromatographie und sonstige Anwendungen

**Tab. 4-7:** Gase für die Gaschromatographie und sonstige Anwendungen

|             | Lieferant / Gewinnung | Qualität                                    | Verwendung   |
|-------------|-----------------------|---|--|
| Druckluft   | Kompressor            | getrocknet<br>(Silicagel):<br>ungetrocknet: | FID-Brenngas, Hilfgas<br>Reaktorbelüftung            |
| Wasserstoff | Linde AG              | 5,0   | Trärgas, FID-Brenngas                                |
| Helium      | Linde AG              | 5,0   | Trärgas (GC-MS)                                      |
| Stickstoff  | Linde AG              | 5,0   | Trärgas  |
| Sauerstoff  | Linde AG              | 5,0   | Phototoxidation von<br>Citronellol / Kulturbelüftung |

## 4.3 Geräte

### 4.3.1 Steriles Arbeiten

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Laborautoklav                    | VST 50/90, Zirbus-Apparatebau, Osterode/Harz   |
| Steril-Werkbank:                 | Laminar-Flow 821/825, Stangl Reinraum- und Prozeßtechnik, München  |
| Sterilfiltrationseinheit:        | Sartorius AG, Göttingen  |
| Sterilfilter für wäbr. Lösungen: | Membranfilter: Porengröße: 0,2 µm<br>Cellulose-Acetat, Sartorius Nr. 11107-50-N<br>Porengröße: 0,2 µm,<br>Polysulfonmembran, Art. H259.1, Roth |

### 4.3.2 Kultivierung

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Inkubationsschüttelmaschinen: | 1.) Multitron, Infors AG, Bottmingen (Schweiz)<br>mit Umlaufkühler: FC 1000, Julabo,<br>Seelbach/Schwarzwald<br>2.) Certomat HK, B. Braun Biotech, Melsungen,<br>Deutschland (für Lichtversuche) |
| UV-A-Lampen:                  | Philips TL44D25/09N, 20 W, 40 cm Länge   |
| Ultra-Turrax                  | TP 18/10, 170 W, max. 20 000 rpm (Stufe 10),<br>Janke & Kunkel   |
| Brutschrank                   | BE 500, Memmert  |

### 4.3.3 Aufarbeitung

|                  |   |
|------------------|---|
| Kühlzentrifuge:  | Varifuge 20 RS, Heraeus Sepatech, Osterode/Harz<br>Zentrifugenbecher: 250 mL Polycarbonat<br>und Polypropylen,<br>Nalgene |
| Tischzentrifuge: | Piccolo , Martin Christ, Osterode (Harz)  |
| Rotor-Blender:   | Rotor GT 800, mit 1,5 L Glasaufsatz<br>Rotor AG, Uetendorf  |
| Vortexer:        | Heidolph, Typ Reax I, 2400 u min <sup>-1</sup>  |
| Schwingmühle:    | Dangoumill 300, Prolabo, Paris<br>Aufschlußgefäße: Stahlbecher, 50 mL Füllvolumen   |

#### 4.3.4 Bioreaktor

##### *Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach*

|                      |   |
|----------------------|---|
| Kulturgefäß:         | 2 L   |
| Sauerstoffelektrode: | Ingold, Nr. 322 756 701,<br>Steinbach/Taunus  |
| pH-Elektrode:        | Mettler-Toledo Nr. 10 465-35 K9   |
| Druckluft:           | Membrankompressor (Druck: 0,6 bar)<br>sterilfiltriert über einen PTFE-Membranfilter<br>(Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm Porengröße)<br>Belüftungsmodus: s.u. |
| Abluft:              | PTFE-Membranfilter (s.o.) als Sterilbarriere  |
| Standardbedingungen: | 24 °C, 250 rpm  |

##### 4.3.4.1 Reaktorordnung 1: Direkte Belüftung

Die Belüftung erfolgte unter Verwendung des zum Bioreaktor gehörigen Luftrohres (a.D. 8 mm) mit einem Durchflußvolumen von 1-2,5 L min<sup>-1</sup>.

##### 4.3.4.2 Reaktorordnung 2: Belüftung mittels Kapillarmembran

Die Belüftung erfolgte hier durch Einleiten von Druckluft in eine im Reaktor befindliche Wicklung einer mikroporösen hydrophoben Kapillarmembran.

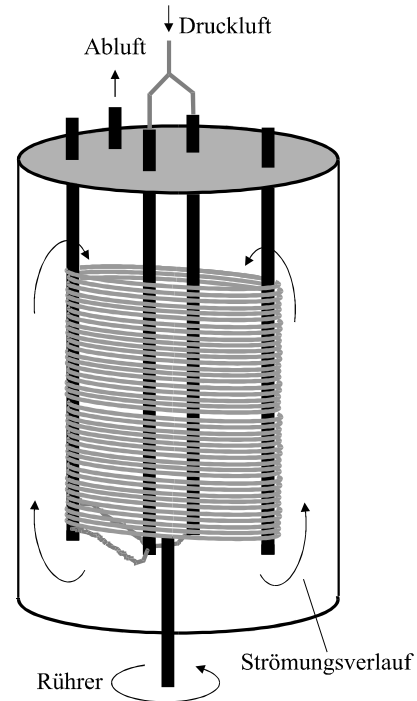
|                  |   |
|------------------|---|
| Kapillarmembran: | Accurel® PP S6/2-Kapillarmembran, Akzo Nobel Faser AG, Wuppertal<br>innerer Durchmesser: 1,8 mm, Wandstärke: 0,45 mm,<br>Porengröße: 0,2 µm   |
| Wicklung:        | 15,0 m Kapillare; gewickelt um vier Edelstahlrohre (35 cm lang, äußerer Durchmesser: 8 mm, Infors Best. Nr. 14584), die mittels Klemmstutzen im Reaktordeckel (Infors Best. Nr. ASZQ 001) in das Reaktorgefäß eingeführt wurden.<br>innerer Durchmesser der Wicklung: 10 cm |

Luftzuführung (s. Abb. 4-1):

Die beiden Enden der Kapillarmembran wurden von unten in zwei der verwendeten Edelstahlrohre eingeführt und mit Hilfe von 2 cm-Stücken von Norprene Schlauch (2 mm innerer Durchm., 1 mm Wandstärke) befestigt. Von oben wurde durch Norpene-Schläuche (Teilung des Luftstromes über einen Glas-Y-Verteiler) Druckluft in die beiden Rohre eingeführt (Regulierung über den Durchflußmesser am Reaktor).

Die beiden noch offenen Edelstahlrohre wurden zum sterilen Abschluß des Reaktors von oben mit Silikonschlauch (i.D. 6 mm i.D. , 2 mm Wandstärke: 2 mm) verbunden.

Durchfluß:  $50 \text{ mL min}^{-1}$  (Bestimmung des tatsächlichen Durchflusses mit einem 50 mL-Flußmesser)



**Abb. 4-1:** Schematischer Aufbau des Bioreaktors mit Membranbelüftung

#### 4.3.4.3 Hohlfasermembran-Extraktion mit Limonen aus dem Bioreaktor

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <u>Hohlfasermembranmodul:</u> | Plasmaflux P2S (Fresenius AG, Bad Homburg)    |
| Membran:                      | Polypropylen-Hohlfasern                       |
| Innendurchmesser:             | 330 $\mu\text{m}$                             |
| Wandstärke:                   | 150 $\mu\text{m}$                             |
| Porengröße:                   | 0,4-0,6 $\mu\text{m}$                         |
| Membranoberfläche:            | 0,5 $\text{m}^2$                              |
| Gehäusematerial:              | Polycarbonat<br>(Gehäuse vertikal aufgehängt) |

Versuchsaufbau: (vgl. Abb. 4-2, S.251)

#### Wäßrige Phase

- Bioreaktor: 24 °C, 100 rpm
- + 2 L deion. Wasser mit jeweils 100 mg L<sup>-1</sup> Carveol / Carvon
- *Kreislaufführung* vom Reaktor durch die untere Öffnung (10 mm i.D., Verbindung mit Norpreneschlauch) des Extrakapillar-Raumes des Hohlfasermoduls, dann durch die obere Öffnung (i.D. 3 mm, zum Modul gehörige Verschraubung) zurück in den Reaktor.

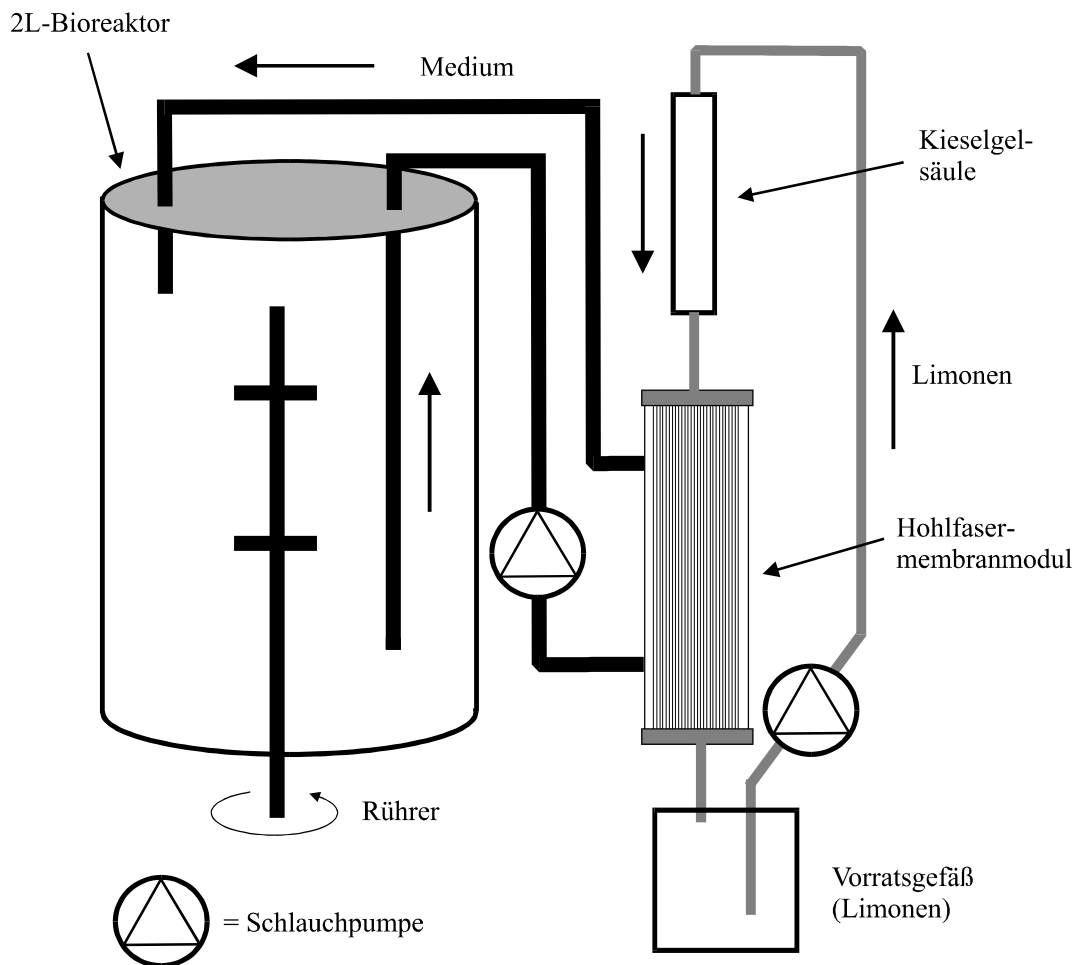
Die unterschiedlichen Innendurchmesser für Einlaß und Auslaßöffnung gewährleisteten einen ausreichenden Überdruck der wäßrigen Phase, um einen Durchbruch der Limonenphase in die wäßrige Phase zu verhindern.

- Schlauchpumpe: Janke & Kunkel PA-SF

- Schlauchmaterial: Teflonschlauch (8 mm i.D., 10 mm a.D.), Schlauchpumpe + Verbindungen: Norprene-Schlauch (8 mm i.D., 12 mm a.D.)  
Verschraubungen: Bola-Verschraubungssystem für 10 mm a.D.
- Fluß:  $100 \text{ mL min}^{-1}$

#### Organische Phase

- 100 ml Limonen im Vorratsgefäß
- *Kreislaufführung*: Vom Vorratsgefäß durch die Kieselgelsäule, dann durch den Intra-kapillar-Raum des Hohlfasermoduls und zurück ins Vorratsgefäß
- Schlauchpumpe: Meredos SP-GLV
- Schlauchmaterial: Teflonschlauch (4 mm i.D., 6 mm a.D.), Schlauchpumpe: Norprene-Schlauch (1,6 mm i.D., 4,8 mm a.D.)  
Verschraubungen: Bola-Verschraubungssystem für 6 mm a.D.
- Fluß:  $5,2 \text{ mL min}^{-1}$
- Säule: Glassäule (12 cm x 1,6-2,0 cm)  
mit Schraubgewinden für Bola-System (GL14)  
Füllung: 10 g Kieselgel 60 (Korngröße: 0,063-0,200 mm)



**Abb. 4-2:** Aufbau des Hohlfasermembran-Extraktionssystems

### 4.3.5 Sonstige Laborgeräte

|                      |  |
|----------------------|--|
| Lichtmikroskop:      | Will H-500, Hunt GmbH                                  |
| Ultraschallbad       | Sonorex 510 H, Bandelin, Berlin                        |
| Rotationsverdampfer: | R 134a, Büchi  |
| pH-Meter:            | Calimatic 761, Knick<br>mit pH-Elektrode, Knick SE 100 |

## 4.4 Kulturmedien

### 4.4.1 Herstellung steriler Kulturmedien

Zur Herstellung der sterilen Kulturmedien wurden die Medienbestandteile (s.u.) in deion. Wasser gelöst. Nach Einstellung des Medien-pH-Wertes wurden Volumina von 90 mL (300 mL Kolben) bzw. 180 mL (500 mL Kolben) abgemessen. Die mit Cellulosestopfen verschlossenen und mit Aluminiumfolie abgedeckten Kolben wurden dann für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 4.4.2 Standardkulturmedien

##### 4.4.2.1 Standardnährlösung-B<sub>1</sub> (=SNLB)

|  |                       |
|--|-----------------------|
| D-Glucose-Monohydrat   | 30 g L <sup>-1</sup>  |
| L-Asparagin-Monohydrat   | 4,5 g L <sup>-1</sup> |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 g L <sup>-1</sup> |
| MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | 0,5 g L <sup>-1</sup> |
| Spurenelementelösung   | 1 mL L <sup>-1</sup>  |
| Thiamin-Hydrochlorid (steril-<br>filtrierte Stammlösung, Zugabe nach<br>dem Autoklavieren der anderen<br>Medienbestandteile) | 2 mg L <sup>-1</sup>  |

##### Spurenelementelösung:

|  |                       |
|--|-----------------------|
| FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | 80 mg L <sup>-1</sup> |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 90 mg L <sup>-1</sup> |
| MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O   | 30 mg L <sup>-1</sup> |
| CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O | 5 mg L <sup>-1</sup>  |
| Titriplex III                          | 0,4 g L <sup>-1</sup> |

pH-Wert: vor dem Autoklavieren mit 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt

##### 4.4.2.2 Standardnährlösung-Hefeextrakt (=SNLH)

Wie SNLB, jedoch 3 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt statt Thiamin.

##### 4.4.2.3 SNLH-Agar

Wie SNLH, jedoch zusätzlich 15 g L<sup>-1</sup> Agar.

### 4.4.3 Faktorieller Versuchsplan (Plackett-Burman-Design) zur Abschätzung von Haupteffekten

*Versuche in Abschnitt 2.1.8.1 + 2.2.5.1*

Von den im Plackett-Burman-Design eingesetzten 16 Faktorkombinationen (vgl. 2.1.8.1, Tab. 2-7) für die insgesamt 12 Medienparameter und 3 Dummyvariablen wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile in der niedrigen und der hohen Konzentrationsstufe sind Tab. 2-8 zu entnehmen. Für die Vitaminmischung wurde eine Stammlösung angesetzt, die sterilfiltriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben wurde.

Als Proben wurden aus den Parallelkolben jeweils Mischproben gemäß 4.9.1.2 entnommen.

Aus diesem Versuchsplan sollten die Effekte der Faktoren auf die Zielgrößen, also Trockenmassen, die Produktkonzentrationen und die trockenmassennormierte Produktkonzentrationen, berechnet werden.

Dazu wurde für jeden der 15 Faktoren die Summe der Zielgrößen der Kombinationen mit hoher Faktorkonzentration gebildet und ebenso die Summe mit den niedrigen Faktorkonzentrationen. Die Summe aus den Kombinationen mit niedrigen Konzentrationen wurde von der Summe mit hohen Konzentrationen subtrahiert. Der mittlere Effekt jedes Faktors ergab sich aus der Division durch die Zahl der niedrigen bzw. hohen Konzentrationen eines Faktors innerhalb der 16 Kombinationen (hier: jeweils 8 pro Faktor).

### 4.4.4 Zusatz verschiedener Konzentrationen von Medienbestandteilen

Calcium:

Um verschiedene Ca-Konzentrationen einzustellen, wurde eine Stammlösung mit 2 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  / 50 mL autoklaviert und den Kulturkolben (85 mL Medium) in Mengen von 0,125 / 0,5 / 1,25 / 2,5 und 5,0 mL, entsprechend 14, 54, 136, 273  $\text{mg L}^{-1}$  berechnet als Ca, zugegeben. Die einzelnen Zugabevolumina wurden durch Zupipettieren von sterilem Wasser auf 5,0 mL aufgefüllt.



#### Glucose, Malzextrakt, Pepton:

Für die verschiedenen Konzentrationen an Glucose (10, 30, 40, 50, 60 g L<sup>-1</sup>), Malzextrakt (0, 5, 10, 20 g L<sup>-1</sup>) und Pepton (0, 4,5 , 9, 13,5 , 18 g L<sup>-1</sup>) wurden die entsprechenden Mengen in die Kulturkolben (für 90 mL Medium) eingewogen und in dem (für die Glucosevariation glucosefreien) SNLH-Medium gelöst und autoklaviert.

#### Kalium:

Für den Versuch zur Variation der Kaliumgehalte (2.1.8.1, S.44) wurde das KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> als Puffersubstanz durch NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ersetzt und die verschiedenen Kaliumkonzentrationen (0, 0,21 , 0,43 , 0,64 , 0,86 g L<sup>-1</sup>) wurden mit Kaliumchlorid eingestellt.

### **4.4.5 Transformationsmedien**

Die Transformationsmedien bestanden aus Phosphatpuffer pH 7,5 (20 mmol L<sup>-1</sup>), dem entweder keine Glucose, 10 g L<sup>-1</sup> Glucose oder 10 g L<sup>-1</sup> Glucose + 1 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt zugesetzt wurden. Der pH-Wert nach dem Autoklavieren betrug 7,3 und wurde vor der Zugabe der Zellmasse nicht erneut eingestellt.

## **4.5 Kultivierung**

### **4.5.1 Stammkulturen (Agarkulturen)**

Von jedem Pilzstamm wurden jeweils Stammkulturen in 2 Schrägagarröhrchen und auf 2 Agarplatten mit SNL-Hefeextrakt-Agar (4.4.2.3) angelegt, indem Agarröhrchen mit einem ca. 0,5 x 1 cm und die Platten mit einem ca. 1 x 1 cm großen Agarstück aus der vorhergehenden Stammkultur (bzw. der Originalkultur von externen Kultursammlungen) beimpft wurden.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 27 °C, bis zum vollständigen Bewachsen der Agaroberfläche (je nach Pilz zwischen 1 und 3 Wochen).

Danach wurden die Platten und Agarröhrchen mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank (4-7 °C) gelagert. Mindestens alle 6 Monate wurden aus den so gelagerten Kulturen nach dem gleichen Verfahren neue Stammkulturen angelegt.

#### 4.5.2 Standardbedingungen für Submerskulturen

|                          |                                   |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Kultivierungstemperatur: | 24 °C                             |
| Schüttelgeschwindigkeit: | 180 rpm                           |
| Kulturvolumen:           | 100 mL in 300 mL Erlenmeyerkolben |

#### 4.5.3 Vorkulturen

##### 4.5.3.1 Vorkulturen 1 (SNLB)

Ein 1 x 1 cm großes Stück der Agarplatten-Stammkultur wurde in einen 200 ml Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNLB-Medium (4.4.2.1) überführt.

Die Vorkultur wurde 3 Tage im Schüttler (24 °C, 180 rpm) inkubiert, und nach dem Sichtbarwerden eines Myzelflaums am Agarstück mit dem Ultraturrax für 30 sec lang homogenisiert. In der Regel wurden nach 7 Tagen Inkubation im Schüttler aus diesen **Vorkulturen 1** die **Vorkulturen 2** angesetzt. Die **Vorkultur 1** war erfahrungsgemäß etwa 4 Wochen stabil, danach wurden neue Kulturen angesetzt. Der schnellwachsende Stamm *Cystoderma carcharias* war nur ca. 2 Wochen in diesem Medium stabil.

##### 4.5.3.2 Vorkulturen 2 (SNLH)

Von der **Vorkultur 1** wurden 20 mL (= 10% v/v) steril in einen 500 mL Erlenmeyer Kolben mit 180 mL SNLH-Medium (4.4.2.2) pipettiert. Die **Vorkultur 2** wurde dann mit dem Ultraturrax 30 sec lang auf Stufe 6 homogenisiert und im Schüttler inkubiert. Die 7 Tage alten **Vorkulturen 2** wurden direkt für die Inokulation der experimentellen Kulturen verwendet.

#### 4.5.4 Experimentelle Kulturen

Von den **Vorkulturen 2** wurden steril jeweils 10 mL in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 90 mL SNLH-Medium pipettiert und ohne erneute Homogenisation im Schüttler inkubiert.

Von den experimentellen Kulturen wurden je Versuchsansatz 2 Parallelkulturen inokuliert. Proben wurden dann immer aus beiden Parallelkolben entnommen und für die Analytik als Mischproben aufgearbeitet.

Bei den Terpententransformationsversuchen erfolgte die Terpenzugabe, sofern bei den Einzelversuchen nicht anders beschrieben, nach einer Inkubationszeit von 2,5 Tagen (60 h).

#### 4.5.5 Kultivierung unter UV-A-Belichtung

In den Inkubationsschüttlern (Certomat HK, B.Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) wurden jeweils drei UV-A-Lampen (Philips TL44D25/09N, 20 W, 40 cm Länge) im Abstand von 15 cm an der Unterseite des Schüttlerdeckels angebracht. Für den Versuch mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (2.1.7.2) wurden die Kulturen nach Ablauf der täglichen Belichtungszeit (6 bzw. 12 h) in einem abgedunkelten Schüttler weiterkultiviert. Bei den unbelichteten Kulturen wurden die Kulturkolben zusätzlich in Aluminiumfolie eingewickelt.

Für den Belichtungsversuch mit *Cystoderma carcharias* (2.2.5.4) wurde die tägliche Belichtungsdauer (14 h) durch eine Zeitschaltuhr geregelt.

#### 4.5.6 Kultivierung für Adaptionenversuche

##### 4.5.6.1 $\alpha$ -Pinen-Adaption

Für die Langzeitadaptionenversuche wurden von jedem Pilzstamm jeweils nichtadaptierte und adaptierte Vorkulturen über einen längeren Zeitraum submers kultiviert. Alle Kulturen wurden als Doppelansätze geführt; die GC-Analyse erfolgte aus Mischproben dieser Doppelansätze.

Für die adaptierten Kulturen wurde den **Vorkulturen 1** nach einer Woche Wachstumszeit alle 2 Tage je 50  $\mu$ L  $\alpha$ -Pinen über die Gasphase (s. 4.6.5) zugegeben. Dadurch wurde eine permanente Substrat-Atmosphäre im Kolben gewährleistet und durch die geringe Konzentration trotzdem ein ausreichendes Kulturwachstum aufrechterhalten.

Die adaptierten wie die nichtadaptierten **Vorkulturen 1** wurden alle 4 Wochen homogenisiert und in frisches SNLB-Medium überimpft. Die weitere Adaption erfolgte dann wie oben beschrieben.

Um auszuschließen, daß die nichtadaptierten Vorkulturen mit Pinen in Kontakt kamen, wurden sie in einem separaten Schüttler kultiviert.

Für die Transformationsversuche wurden 10 mL der adaptierten und nichtadaptierten **Vorkulturen 1** in 90 mL SNLH-Medium überimpft und homogenisiert. Die adaptierten

**Vorkulturen 2** wurden nach 3 Tagen Wachstumszeit wie oben beschrieben mit Substrat behandelt.

Die **experimentellen Kulturen** wurden aus 1 Woche alten **Vorkulturen 2** angesetzt (10 mL auf 90 mL SNLH-Medium). Bis zum Beginn der Biotransformation wurden die adaptierten Kulturen nicht mehr mit Substrat belastet, da durch die Wachstumsverringering im Vergleich zu den nichtadaptierten Kulturen die Vergleichbarkeit adaptiert/nichtadaptiert weiter verschlechtert worden wäre. Die Transformation wurde nach 2,5 Tagen Inkubationszeit durch Zugabe von 2 x 100 µL α-Pinen im Abstand von 24 h gestartet.

#### 4.5.6.2 Limonen-Adaption

Im Unterschied zur α-Pinen-Adaption wurden hier die **Vorkulturen 1** als Doppelansätze wie üblich geführt, eine Adaption fand hier nicht statt, um die im dafür verwendeten SNLB-Medium (ohne komplexe Zusätze) durch Terpenzusatz verstärkt auftretenden Wachstumshemmungen zu minimieren.

Stattdessen wurden alle zwei Wochen frische adaptierte und nichtadaptierte **Vorkulturen 2** (jeweils als Doppelansätze) nach dem üblichen Verfahren inokuliert. Nach den ersten 2 Wochen Adaption wurden aus diesen Vorkulturen 2 die frischen Vorkulturen 2 inokuliert, so daß die verwendeten Vorkulturen dauerhaft in SNLH-Medium kultiviert und adaptiert wurden.

Die Adaption begann 3 Tage nach Inokulation, indem alle 2-3 Tage 50 µL R-(+)-Limonen über die Gasphase zudosiert wurde, die nichtadaptierten Kulturen wurden in einem separaten Schüttler kultiviert.

Aus diesen mindestens eine Woche alten **Vorkulturen 2** wurden dann nach 1, 2, 4 und 6 Wochen die experimentellen Kulturen beimpft, die nicht mehr adaptiert wurden, um ein möglichst vergleichbares Wachstum von adaptierten und nichtadaptierten Kulturen zu gewährleisten. Die erste Substratzugabe erfolgte nach 2,5 Kulturtagen im Gasphasenmodus (500  $\mu\text{L}$  im Reservoir). Für die Analytik wurden Mischproben aus den Doppelansätzen genommen.

#### 4.5.6.3 Citronellol-Adaption

Für die Citronellol-Adaption von *Cystoderma carcharias* wurden je 3 **Vorkulturen 1** in SNLB-Medium angesetzt. Nach einer Wachstumszeit von 10 Tagen wurden aus jeder dieser Kulturen 2 **Vorkulturen 2** beimpft. Je einer der beiden **Vorkulturen 2** wurde nach einer Wachstumszeit von 3 Tagen 50  $\mu\text{L}$  Citronellol über die Gasphase zugegeben, dies wurde jeden 2. Tag wiederholt. Die nichtadaptierten Kulturen wurden in einem separaten Schüttler kultiviert.

Aus den **Vorkulturen 2** wurden nach einer Woche 3 adaptierte und 3 nichtadaptierte experimentelle Kulturen beimpft, mit denen dann die Biotransformation nach dem Standardverfahren für Citronellol durchgeführt wurde (s. 4.6.1).

#### **4.5.7 Kultivierung mit Einstellung des pH-Wertes vor Transformationsbeginn**

Die pH-Werte der experimentellen Kulturen von *Pleurotus sapidus* wurden am 3. Kulturtag (60 h Inkubationszeit) mit KOH (1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) bzw.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) auf 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,0 steril mit einer vorher 30 min in 70% Ethanol gelagerten und mit sterilem Wasser abgspülten pH-Elektrode eingestellt.

Nach der pH-Wert-Einstellung erfolgte der Start der Biotransformation durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  (+/-)- $\alpha$ -Pinen. Nach 24 h wurden erneut 100  $\mu\text{L}$  zugegeben.

#### **4.5.8 Durchführung von Transformationsversuchen in Transformationsmedien**

Die Kulturen von *C. carcharias* wurden ebenso wie normale experimentelle Kulturen 2,5 Tage lang in 100 mL-Ansätzen (300 mL Erlenmeyer-Kolben) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Filtration in einer autoklavierten Filtrationseinheit abgetrennt, da eine Zentrifugation bei diesem Pilz nicht zu einer ausreichenden Sedimentati-

on führte. Die Zellmasse wurde je 100 mL Kultur mit 50 mL Phosphatpuffer (20 mmol L<sup>-1</sup>) gewaschen, um anhaftendes Wachstumsmedium abzutrennen.

Dann wurde die Zellmasse mit einem sterilen Spatel in die Transformationskolben überführt.

Die Transformation wurde durch Zusatz von 2 x 20 µL Citronellol im Abstand von 24 h gestartet.

#### **4.5.9 Kultivierungen im Bioreaktor**

Bei den Bioreaktorversuchen mit *C. carcharias* wurde mit 200 mL der *Vorkulturen 2* auf 1,8 L SNLH-Medium inokuliert (bei der direkten Belüftung wurden 2,0 L SNLH-Medium vorgelegt). Die Nachdosierung von Glucose erfolgte, sobald der Gehalt im Reaktor unter 0,25 % abgesunken war, nach Entnahme von 100 mL Kulturmedium durch den Probenahmestutzen des Reaktors durch Zugabe von 100 mL einer autoklavierten Glucoselösung (mit 40 g Glucose) unter sterilen Bedingungen. Eine Bestimmung der Trockenmasse war nicht möglich, da aufgrund der Pelletgröße keine repräsentativen Proben aus dem Reaktor entnommen werden konnten.

### **4.6 Dosierung von Substraten und Inhibitoren**

#### **4.6.1 Normale Substratdosierung**

Für die normale Substratdosierung wurde – soweit bei den Versuchsergebnissen nichts anderes vermerkt ist – den 100 mL-Kulturen zu Beginn der Transformation und noch einmal 24 h später jeweils eine Menge von 100 µL (Terpenkohlenwasserstoffe) bzw. 20 µL (Citronellol) direkt zupipettiert.

Bioreaktorversuche: Für die Citronelloltransformationen mit *C. carcharias* im Bioreaktor wurden je Substratdosierungszeitpunkt 400 µL Citronellol in den Reaktor gegeben.

#### **4.6.2 Dosierung mittels organisch-wäßriger Zweiphasensysteme**

Die Dosierung von  $\alpha$ -Pinen über die nicht-wassermischbaren organischen Phasen Miglyol 812 S und Paraffinöl erfolgt durch Lösung von 100 µL des Terpens je 5 mL organischer Phase (vorher autoklaviert) und Zugabe dieser nicht-wassermischbaren Lösung zu den 2,5 Tage alten experimentellen Kulturen.

### 4.6.3 Substratdosierung mit Tensidzusatz

Für die Dosierung von  $\alpha$ -Pinen in Tensidemulsionen wurden Stammlösungen der verwendeten Tenside (Brij 35, Triton X-100, Tween 65, Tween 80 und Span 20) von 0,1 , 1,0 und 5,0 g (100 mL)<sup>-1</sup> hergestellt und autoklaviert. Zu diesen Stammlösungen wurde kurz vor der Dosierung in die Pilzkulturen 1 mL einer  $\alpha$ -Pinenstammlösung von 2,5 g (10 mL)<sup>-1</sup> in unvergälltem, destillierten Ethanol gegeben und für 3 min im eisgekühlten Ultraschallbad emulgiert. Von dieser weiß-trüben Emulsion wurden 10 mL in die 2,5 Tage alten Kulturen (90 mL Kulturvolumen) dosiert.

Die Endkonzentration an Tensid betrug 0,1 , 1,0 bzw. 5,0 g L<sup>-1</sup>, die Konzentration an Pinen betrug unabhängig von der Tensidkonzentration 500 mg L<sup>-1</sup>.

Für den Kontrollwert (ohne Tensid) wurden 100  $\mu$ L der Pinen-Stammlösung (= 500 mg L<sup>-1</sup>) direkt in die wäßrige Phase dosiert.

Die Ethanolkonzentration betrug in allen Kulturen 0,1% (v/v), ein negativer Einfluß auf Kulturwachstum und Transformationsverhalten wurde nicht festgestellt.

### 4.6.4 Substratdosierung in liposomalen Lösungen

Für die Biotransformationsversuche wurde eine Methode zur Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel (=small unilamellar vesicles, SUV) verwendet [190, 191].

Für 20 mL Liposomen-Lösung wurden 66  $\mu$ mol Ei- oder Soja-Phosphatidylcholin in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und in ca. 50 mL Dichlormethan gelöst, so daß eine klare, gelb gefärbte Lösung erhalten wurde.

Das Dichlormethan wurde am Rotationsverdampfer (40 °C, 700 mbar) abdestilliert und die Lipidschicht auf der Kolbeninnenwand dann mind. 15 min im Stickstoffstrom weiter getrocknet.

Danach wurden 20 mL deion. Wasser zugegeben und der Kolben zu Ablösung der Lipidschicht intensiv geschwenkt. Die liposomale Lösung wurde danach für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Die so hergestellte Lösung war fast klar und schwach gelblich gefärbt. Bei Ansätzen von mehr als 20 mL Gesamtvolumen reichte die Leistung des eingesetzten Ultraschallbades nicht aus, um eine klare Lösung herzustellen, daher wurden die 20 mL-Ansätze verwendet. Die Lösung wurde danach sterilfiltriert (sterile Cellulose-Acetat-Filter, 0,45  $\mu$ m Porengröße).

Für die Liposomenleerwerte wurde die so erhaltene Lösung direkt weiter verwendet, während für die  $\alpha$ -Pinen-Transformationsversuche 330  $\mu\text{mol}$  (=44,9 mg)  $\alpha$ -Pinen zugegeben und für 15 min im eisgekühlten Ultraschallbad gelöst wurden.

Vorversuche ergaben, daß ein Phosphatidylcholin/Pinen-Verhältnis von  $>5$  nur zu einer unvollständigen Lösung des Terpens in der Lipidphase führt (die Pinenphase wird als zweite Phase sichtbar). Deshalb wurde ein Phosphatidylcholin/Pinen-Verhältnis von 5 gewählt.

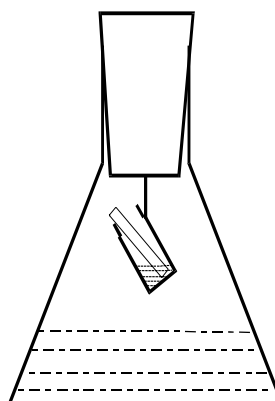
Für die Biotransformationsversuche wurden 2,5 mL (=16,5  $\mu\text{mol}$  Phosphatidylcholin, 82,5  $\mu\text{mol}$  Pinen zusätzlich 7,5 mL steriles Wasser) bzw. 10 mL (=66  $\mu\text{mol}$  Phosphatidylcholin, 330  $\mu\text{mol}$  Pinen) der liposomalen Lösungen (Leerwert bzw. Substratwert) zu Kulturen mit einem Kulturvolumen von 90 mL dosiert.

#### 4.6.5 Substratdosierung über die Gasphase

*Anwendung für Versuche in Abschnitt 2.1.4.2, 2.1.8.1, 2.1.9.1.3, 2.1.10.2, 2.2.3.2*

Für die Gasphasendosierung wurde ein braunes 4 mL-Schraubdeckelgläschen mit Draht an der Unterseite des Cellulosestopfens befestigt, so daß zwischen Stopfenunterseite und Gefäßöffnung ein Abstand von ca. 3 cm war. In das Gläschen wurde zur Gewährleistung einer besseren Verteilung des Substrats ein Chromatographiepapierstreifen-(0,5 x 3 cm) gesteckt (s. Abb. 4-3).

**Abb. 4-3:**



Gasphasendosierung  
des Substrates



Zu Beginn der Transformation wurden (soweit nicht im Einzelfall anders beschrieben) 500  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Substrates in das Reservoir gefüllt und bei Bedarf (längere Transformationszeiten) nach 5-7 Tagen nachdosiert.

#### **4.6.6 Durchführung der Sauerstoffbegasung im Kulturkolben**

Für die zusätzliche Begasung von *P. sapidus*-Kulturen während der Biotransformation von  $\alpha$ -Pinen wurden 300 mL Erlenmeyerkolben mit je 100 mL Submerskultur direkt vor den beiden Substratzugaben 5 min lang mit einem über einen Membranfilter sterilisierten Sauerstoffstrom (0,5 bar Vordruck) aus einer Druckgasflasche begast, so daß danach die Gasphase im Kolben nahezu vollständig aus Sauerstoff bestand.

Die Messung der Sauerstoffsättigung erfolgte sofort nach Probenahme von 10 mL der Kultur mit einer Sauerstoffelektrode und einer Meßeinheit des Bioreaktors (Infors, ISF 100). Die Elektrode wurde vor der Versuchsdurchführung unter den gleichen Bedingungen wie bei den Pilzkulturen (Kulturkolben mit 100 mL Medium, Probenahme von 10 mL Medium, sofortige Messung) mit stickstoffgesättigtem Medium auf den 0% (Nullpunkt) und mit sauerstoffgesättigtem Medium auf 100% (Elektroden-Steilheit) kalibriert.

#### **4.6.7 Dosierung von Terpenalkoholen, -ketonen zur Untersuchung der Produkttoxizität**

Zur Einstellung definierter Konzentrationen an Terpenen in Submerskulturen mußten die Terpene aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit in unvergälltem Ethanol vorgelöst werden.

Stammlösungen von cis-Verbenol, Verbenon, cis/trans-Carveol und Carvon wurden so verdünnt, daß zur Erreichung der gewünschten Konzentrationsstufen jeweils 200  $\mu\text{L}$  ethanolischer Lösung (=0,2% v/v) zur 100 mL-Kultur addiert werden mußten.

Kontrollversuche zeigten, daß Ethanol in dieser Konzentration keinen toxischen Effekt hatte.

#### 4.6.8 Zugabe von Cyclohexenoxid und Monooxygenase-Inhibitoren

Für den Versuch zur Epoxid-Hydrolase-Hemmung wurde den Kulturen nach 2,5 und 3,5 Kulturtagen eine der Citronellolmenge ( $20 \mu\text{L} = 0,11 \text{ mmol (100 mL)}^{-1}$ ) äquimolare Cyclohexenoxidmenge ( $11 \mu\text{L} = 0,11 \text{ mmol}$ ) direkt zugegeben.

Von den Monooxygenase-Inhibitoren wurden Stammlösungen von SKF-525 A und 1-Aminobenzotriazol in unvergälltem Ethanol angesetzt und von diesen Lösungen  $100 \mu\text{L}$  je  $100 \text{ mL}$ -Kultur verwendet, so daß eine Endkonzentration von  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  erreicht wurde.

### 4.7 Blindwerte

#### 4.7.1 Allgemeine Durchführung

Alle Blindwerte wurden analog zu den entsprechenden Biotransformationsversuchen durchgeführt. So wurden sowohl Verunreinigungen der Terpensubstrate als auch abiotische Umsetzungen im Verlauf der Transformationsdauer erfaßt.

Die so erhaltenen Konzentrationen an oxyfunktionalisierten Terpenen wurden von den in dieser Arbeit angegebenen Biotransformationsergebnissen bereits subtrahiert.

Standardblindwerte wurden mit  $100 \text{ mL}$  SNLH-Medium (pH-Wert nach dem Autoklavieren ca. 5,7) im  $300 \text{ mL}$  Erlenmeyerkolben mit Cellulosestopfen durchgeführt. Die Terpenkohlenwasserstoffe ( $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Limonen) wurden bei direkter Zugabe in Mengen von  $2 \times 100 \mu\text{L}$  im Abstand von  $24 \text{ h}$  zudosiert. Bei Gasphasenfütterungen erfolgte die Zugabe von  $500 \mu\text{L}$  über die Gasphase mit Nachdosierung der gleichen Menge nach 5-7 Tagen.

#### 4.7.2 pH-Wert-Abhängigkeit

Zur Herstellung von sterilen Kulturmedien mit definierten pH-Werten wurde zunächst SNLH-Medium (jeweils  $1 \text{ L}$  in  $1 \text{ L}$  Erlenmeyerkolben) angesetzt und autoklaviert. pH-Werte  $< 6,0$  wurden dann unter sterilen Bedingungen mit autoklavierter  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $0,33 \text{ mol L}^{-1}$ ) mit einer vorher  $30 \text{ min}$  in  $70\%$  Ethanol gelagerten pH-Elektrode eingestellt. Je  $100 \text{ mL}$  des Mediums wurden steril in autoklavierte  $300 \text{ mL}$  Erlenmeyerkolben gefüllt. Für höhere pH-Werte wurde auf diese Weise keine ausreichende Sterilität erreicht. Deshalb mußte hier nach der pH-Wert-Einstellung mit autoklavierter KOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) über

0,2 µm Membranfilter (Polysulfonmembran, Roth Art. H259.1) sterilfiltriert und dann in Erlenmeyerkolben gefüllt werden.

#### **4.7.3 Blindwerte in Gegenwart von autoklaviertem Pilzmyzel**

Für die Blindwerte in Gegenwart von Pilzmyzel wurden 7 Tage alte Submerskulturen der Pilze autoklaviert (121 °C, 20 min) und der pH-Wert wurde steril (4.5.7) auf pH 5,0 eingestellt. Die Blindwertführung erfolgte dann wie in 4.7.1 beschrieben.

### **4.8 Synthesen**

#### **4.8.1 Photooxidation von Citronellol zur Herstellung von 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (6) und 3,7-Dimethyl-7-octen-1,6-diol (7) [38, 196]**

500 µL (=512,5 mg = 3,28 mmol) (±)-β-Citronellol wurden in 50 mL Methanol gelöst und mit ca. 0,5 g Bengalrosa (gebunden an Polystyren) versetzt. Der 250 mL Reaktionskolben wurde vor Beginn der Reaktion und danach alle 30 min durch Einleiten aus einer Druckglasflasche mit reinem Sauerstoff gesättigt. Der Ansatz wurde unter ständiger Eiskühlung unter Belichtung mit einer 500 W-Foto-Lampe (Liteman Ind. Corp. L-16 N-2) gerührt. Das Ende der Reaktion wurde gaschromatographisch anhand des Citronellolgehaltes in der Reaktionslösung bestimmt. Nach 12 h Reaktionszeit war die Photooxidation beendet und die erhaltenen Hydroperoxide konnten durch Zugabe von 10 mmol Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in 50 mL deion. Wasser durch einstündiges Rühren bei 50 °C (Wasserbad) zu den Diolen reduziert werden.

Die erhaltenen Diole wurden mit Diethylether (5 x 50 mL) aus der Wasser/Methanol-Phase extrahiert. Nach Trocknung über Natriumsulfat erfolgte das Einengen der Produktlösung auf ca. 10 mL.

#### **4.8.2 Aufreinigung der Diole**

Für die NMR-Spektroskopie wurden die Diole säulenchromatographisch aufgereinigt. Dazu wurde die Produktlösung auf eine Säule (3 x 25 cm) mit 35 g Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm Korngröße, 70-230 mesh) gegeben und mit Diethylether eluiert.

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1-2 Tropfen pro Sekunde wurden 5-Minuten-Faktionen aufgefangen. Die Fraktionen 24-41 enthielten reines 3,7-Dimethyl-7-octen-

1,6-diol (109,3 mg, GC-Reinheit: 96,7 %), die Fraktionen 50-54 reines 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (30,3 mg, GC-Reinheit: 97,6%) und die Fraktionen 42-49 ein Gemisch beider Diole. Fraktion 55 wurde mit Diethylether/Methanol (9+1) eluiert. Diese Fraktion enthielt ebenfalls 3,7-Dimethyl-5-octen-1,7-diol (80 mg, GC-Reinheit 85,7%). Auf eine weitere Aufreinigung dieser Fraktion wurde verzichtet, da die anderen Fraktionen Reinsubstanzen in ausreichender Menge für die NMR-Messungen enthielten.

#### **4.8.3 Synthese von 3,7-Dimethyl-6,7-epoxy-1-octanol (4) und 3,7-Dimethyl-1,6,7-octantriol (9)**

Darstellung des Epoxids: 6,4 mmol (1,0 g) ( $\pm$ )- $\beta$ -Citronellol, gelöst in 50 mL Diethylether und eisgekühlt, wurden unter Rühren langsam zu einer Lösung von mit 6,4 mmol m-Chlorperoxybenzoesäure (mCPBA) in 50 mL Diethylether getropft.

Nach 2 Tagen Reaktionszeit (Kühlschrank, vollständiger Umsatz des Citronellols) wurde die etherische Lösung zur Entfernung der mCPBA 3 Mal mit je 50 mL Natronlauge (2 mol L<sup>-1</sup>) und danach 4 Mal mit Wasser (bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers) gewaschen und der Ether abdestilliert. Ein Teil des Produkts (103 mg, >95% GC-Reinheit) wurde zu NMR-Untersuchung verwendet.

Darstellung des Triols: 300 mg Epoxid wurden in 50 mL Salzsäure (0,1 mol L<sup>-1</sup>) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit Diethylether (5 x 50 mL) aus der wäßrigen Phase extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie. Dazu wurde das erhaltene Produkt auf Kieselgelplatten (Merck, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm) aufgetragen und in Diethylether entwickelt. Die Produktzone wurde von der Platte abgeschabt und mit Diethylether eluiert. Das Produkt lag danach in einer GC-Reinheit von 97,9% vor.

## 4.9 Analytik

### 4.9.1 Probenahmeverfahren

#### 4.9.1.1 Standard-Probenahme

*Versuche in Abschnitt* 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4.1, 2.1.4.2, 2.1.5 (saure Produkte), 2.1.6.2, 2.1.6.3, 2.2.1.2.4, 2.2.4

Am Ende der Transformation wurden jeweils zwei 100 mL-Kulturkolben als Probe genommen und aufgearbeitet. Die Submerskulturen wurden vollständig in Zentrifugenbecher (250 mL, Polycarbonat) überführt und abzentrifugiert (4000 x g). Der Überstand wurde abdekantiert und zur weiteren Aufarbeitung eingesetzt. Der Rückstand wurde zur Trockenmassebestimmung eingesetzt bzw. – bei den Versuchen zur separaten Myzelauflösung – aufgeschlossen (s. 4.9.5.1).

#### 4.9.1.2 Probenahme für die Schnellmethoden (LPME, SPME, Trockenmasse)

*Versuche in Abschnitt* 2.1.8.1, 2.1.10.2, 2.1.6.4, 2.1.7, 2.1.8.3, 2.1.8.4, 2.1.9.1.1, 2.1.9.1.2, 2.1.9.1.3, 2.1.9.2, 2.1.10.1, 2.1.11, 2.2.5, 2.2.6

Für die GC- und Trockenmasse-Schnellmethoden wurden aus den Parallelkolben jeweils mind. 2 bis max. 5 mL (bei Trockenmassebestimmung) Probe steril den Kulturen entnommen, in 10 mL-Reagenzgläsern zu einer Sammelprobe vereinigt, mit Schraubdeckeln verschlossen und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die GC aufgearbeitet, während der Rückstand zur Trockenmassebestimmung verwendet wurde.

#### 4.9.1.3 Probenahme für Sammelproben

*Versuche in Abschnitt* 2.2.1, 2.2.8

Für die Sammelproben wurden an den Transformationstagen 2, 4 und 7 jeweils 30 mL der Kulturen steril entnommen, abzentrifugiert (10 °C, 4000 x g). Das so erhaltene Medium wurde eingefroren. Nach der letzten Probenahme wurden die vereinigten Teilproben für die Analytik aufgearbeitet.

#### 4.9.1.4 Probenahme aus dem Bioreaktor

Probenahme aus der wäßrigen Phase: Je Probenahmezeitpunkt wurden 5-10 mL Medium steril über den Probenahmestutzen des Reaktors entnommen und für die Glucosebestimmung und die LPME verwendet.

Probenahme aus der Abluft: Für die Abluftadsorption wurden 2 seriell angeordnete Glasäulen (12 cm x 1,6-2,0 cm) mit je 9,5 g Lewatit OC 1064 (makroporöses Styrol/Divinylbenzen-Adsorbens, Reinigung siehe 4.9.6) befüllt. Nachdem die Abluft 24 h lang durch die Säulen geleitet worden waren, wurden die auf der ersten Säule adsorbierten flüchtigen Substanzen mit 110 mL 2-Propanol (40/40/30 mL) eluiert. Nach Zugabe von 100 µL interner Standardlösung (= 5 mg Nonansäuremethylester) wurde das Eluat gaschromatographisch untersucht. Die Säule wurde mit frischem Lewatit befüllt und wieder in den Abluftstrom eingebaut. Die zweite Säule wurde alle zwei Tage ebenfalls eluiert, um sicherzustellen, daß keine nennenswerten Mengen an Substrat oder Produkten verloren gingen.

### **4.9.2 Kulturparameter**

#### 4.9.2.1 Trockenmasse

##### *4.9.2.1.1 Filtrationsmethode*

*Versuche in Abschnitt 2.1.7.1, 2.1.7.2, 2.1.9.1.4, 2.1.9.1.6, 2.2.1*

Der Inhalt eines Kulturkolben (100 mL Kulturvolumen) wurde mittels Absaugflasche mit Filtrationsaufsatz über ein getrocknetes und tariertes Filterpapier abgesaugt, mehrfach mit Wasser gewaschen, im Trockenschrank bei 103 °C für 24 h vollständig getrocknet und ausgewogen.

#### *4.9.2.1.2 Schnellmethode (Anwendung zur Untersuchung von Kulturverläufen)*

*(Versuche in den unter 4.9.2.1.1 nicht genannten Abschnitten)*

5 mL der Kultur wurden in ein tariertes 10 mL Zentrifugengläschen pipettiert (5 mL Kolbenhubpipette), und abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen, der Rückstand durch Zugabe von 10 mL Wasser und kurzes Mischen mit einem Vortex-Mixer gewaschen, erneut zentrifugiert und abdekantiert, dann im Trockenschrank bei 103 °C für 24 h vollständig getrocknet und ausgewogen.

#### 4.9.2.2 Glucosegehalt

##### *4.9.2.2.1 Photometrische Methode (Enzymatik)*

*Versuche in Abschnitt 2.1.6.1*

*Glucose (HK) 16-UV:*                   Sigma Diagnostics, Deisenhofen  
Durchführung nach Herstelleranweisung

##### *4.9.2.2.2 Schnellmethode (Teststäbchen)*

*Anwendung bei allen anderen Versuchen.*

*Diabur-Test<sup>®</sup> 5000:*                   Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim  
Durchführung nach Herstelleranweisung

#### 4.9.2.3 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde direkt nach der Probenahme mit einem wöchentlich kalibrierten pH-Meter bestimmt.

#### 4.9.2.4 Prüfung auf Kontaminationen

Die Prüfung auf Kontaminationen erfolgte durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen der Kulturen.

### 4.9.3 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

#### 4.9.3.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion (Isolierung neutraler und saurer Metabolite)

##### *4.9.3.1.1 Pentan/Ether-Extraktion*

*Versuche in Abschnitt 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4.1, 2.1.4.2, 2.1.5 (saure Produkte), 2.1.6.2, 2.1.6.3, 2.1.9.1.4, 2.1.9.1.5, 2.1.9.1.6, 2.2.1.1, 2.2.1.2.4, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4*

Der Zentrifugenüberstand wurde mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf pH 7,2 eingestellt und nach Zugabe von 100  $\mu\text{g}$  (in 100  $\mu\text{L}$ ) des 1. internen Standards (Nonansäuremethylester) dreimal mit je 50 mL Pentan/Ether-Gemisch (azeotropes Gemisch 1+1,12 v/v) extrahiert.

Für die Untersuchung auf saure Metabolite wurde nach dem ersten Extraktionsdurchgang mit Salzsäure ( $6 \text{ mol L}^{-1}$ ) auf pH 1-2 angesäuert und nach Zugabe eines internen Standards (100  $\mu\text{g}$  Undecansäuremethylester in 100  $\mu\text{L}$ ) erneut dreimal mit je 50 mL Pentan/Ether extrahiert.

Die neutralen bzw. sauren Extrakte wurden 24 h bei 4-7 °C über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C Badtemperatur auf ca. 1 mL eingengt. Nach dem Einengen wurde als 2. interner Standard Heptansäuremethylester (100  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{L}$ ) zugegeben. Die Proben wurden in 4 mL-Schraubdeckelgläsern mit teflonbeschichtetem Septum bis zur GC-Analyse bei -18 °C gelagert.

##### *4.9.3.1.2 Dichlormethan-Extraktion*

*Versuch in Abschnitt 2.2.7*

Die Dichlormethan-Extraktion wurde nur bei der Isolierung der hydrophileren Produkte der *C. carcharias*-Transformationen angewendet und erfolgte analog der Pentan/Ether-Extraktion. Der Extraktionsdurchgang zur Isolierung saurer Produkte entfiel hier.



#### 4.9.3.2 Aufarbeitung von Pilzmyzel aus Submerskulturen

*Versuch in Abschnitt 2.1.4.1, 2.1.4.2, 2.2.4*

Der Zentrifugenrückstand aus 4.9.1.1 wurde in 50 mL 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert, kurz geschüttelt und abzentrifugiert (4000 x g). Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, um Medienreste zu entfernen.

Nach Bestimmung der Gesamtfrischmasse wurde ein Aliquot von etwa 5 g für den Zellaufschluß verwendet. Das aufzuschließende Pilzmyzel wurde schichtweise abwechselnd mit insgesamt 40 mL (=71,2 g) Glasperlen (Ø 0,5 mm) in den auf 4-7 °C gekühlten Stahl-Aufschlußbecher gegeben. Dann wurden 5 mL Wasser sowie 10 mL Methanol (= 50% v/v) zur Enzyminhibition zugegeben.

Der Zellaufschluß erfolgte für 10 Minuten in einer Schwingmühle. Das aufgeschlossene Myzel wurde einschließlich der Glasperlen in ein 250 mL Becherglas überführt und der Überstand durch wiederholtes Waschen mit 5% NaCl-Lösung (insgesamt 150 mL) in einen 300 mL Schliff-Erlenmeyerkolben von den Glasperlen abdekantiert.

In dem Versuch zur weiteren Differenzierung der Myzelfraktion (vgl. 2.1.3.1, S.11) wurde der Aufschluß ohne Zusatz von Methanol durchgeführt, um eine durch die Aufarbeitung bedingte Änderung der Substrat-/Produktverteilung zu minimieren.

Die Aufschlußlösung wurde hier in einen 50 mL Polycarbonat-Zentrifugenbecher überführt und bei 40 000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand (= cytosolische Fraktion) wurde abdekantiert, der Zentrifugenrückstand (=Zellbruchstücke, Membranfraktion) mit 40 mL deion. Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und die Waschwässer zur cytosolischen Fraktion gegeben. Die weitere Untersuchung erfolgte durch Flüssig/Flüssig-Extraktion und GC.

#### 4.9.3.3 Festphasenmikroextraktion (SPME)

*Versuche in Abschnitt 2.1.6.4, 2.1.8.3, 2.1.8.4, 2.1.9.1.1, 2.1.9.1.2, 2.1.9.1.3, 2.1.9.2, 2.1.10.1*

Faser: 100 µm Polydimethylsiloxan (Nr. 5-7300) + Manual Holder (Nr. 5-7330)  
Supelco, Bellefonte, USA

Adsorption: Raumtemperatur, 40 Minuten

Desorption: 230 °C, 3 Minuten

Durchführung:

In ein 4 mL Braunglas-Schraubdeckelgläschen wurden 1,5 g NaCl, 1 Rührfisch (2x5 mm), 1 mL interne Standardlösung (Campher,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und je nach Konzentration 100-3000  $\mu\text{L}$  Probe gegeben. Danach wurde deion. Wasser zupipettiert, so daß das Gesamtvolumen der wäßrigen Phase 4 mL betrug.

Zur NaCl-Sättigung der wäßrigen Phase wurde 2-3 Minuten auf einem Mehrplatzrührer gerührt (750 rpm), dann wurde die SPME-Faser in die Lösung eingeführt. Nach der Adsorptionszeit wurde die Faser zur Entfernung des NaCl kurze Zeit mit deion. Wasser abgespült und zur Desorption in den GC-Injektor eingeführt.

Zur Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden die Standards Verbenol, Verbenon, Myrtenol, Myrtenal, trans-Myrtanol, trans-Pinocarveol, cis/trans-Carveol und Carvon in wäßriger Lösung (max. 1% Methanol durch Verdünnung der Stammlösungen) in Mengen von 100-3000  $\mu\text{L}$  (=0,1-3,0  $\mu\text{g}$  pro Ansatz) nach oben beschriebenen Verfahren untersucht. Dies entspricht einem Konzentrationsbereich von 0,025 - 0,75  $\text{mg L}^{-1}$  im Adsorptionsansatz.

Die Auswertung und Ergebnisberechnung erfolgte durch lineare Regression der Peakflächen mittels Chromatographiesoftware (4.9.7.1).

Eine Quantifizierung der Terpenkohlenwasserstoffe  $\alpha$ -Pinen und Limonen war mittels SPME nicht möglich, da eine reproduzierbare und lineare Kalibrationsgerade nicht erstellt werden konnte. Dies war höchstwahrscheinlich auf Verluste von adsorbiertem Kohlenwasserstoff nach Beendigung der Adsorption beim Spülschritt bzw. beim Überführen in den GC-Injektor zurückzuführen. Auch ein Verzicht auf NaCl-Zusatz und Spülschritt brachte keine ausreichenden Verbesserungen.

#### 4.9.3.4 Flüssigphasenmikroextraktion (LPME)

Versuche in Abschnitt 2.1.8.1, 2.1.10.2, 2.1.11, 2.2.5, 2.2.6

400  $\mu\text{L}$  Probe und 100  $\mu\text{L}$  interner Standard (=5  $\mu\text{g}$  Campher) wurden in ein 4 mL-Schraubdeckelgläschen mit 0,2 g Natriumchlorid gegeben.

Zur Extraktion wurde 1 mL Hexan (für Limonen-,  $\alpha/\beta$ -Pinentransformationsprodukte) bzw. 1 mL Ethylacetat (für die Citronelloletransformationsprodukte) zugegeben und das verschlossene Gläschen 1 min lang kräftig geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 2  $\mu\text{L}$  der organischen Phase in den Gaschromatographen injiziert.

Für die Kalibrierung der Methode wurden nach dem gleichen Verfahren Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 10-100  $\text{mg L}^{-1}$  analysiert. Die Auswertung und Ergebnisberechnung erfolgte durch lineare Regression der Peakflächen bezogen auf den internen Standard mittels Chromatographiesoftware (4.9.7.1).

#### 4.9.3.5 Wasserdampfdestillation zur Gewinnung der Transformationsprodukte aus nicht-wassermischbaren organischen Phasen

Ein aliquoter Teil (1-2 mL) der organischen Phase (5 mL) aus den experimentellen Kulturen wurde in einen 250 mL Dreihalskolben pipettiert. Durch Einleitung von Wasserdampf aus einer Kupferdampfkanne wurden die wasserdampflichen Bestandteile über ein Glasrohr in einen eisgekühlten 250 mL Meßkolben, in dem 50 mL Pentan/Ether-Gemisch (1+1,12) vorgelegt war, überdestilliert und so vom nicht wasserdampflichen Miglyol bzw. Paraffinöl abgetrennt. Nach 1 h (150 mL wässrigen Destillats) wurde die Destillation beendet und die wässrige Phase mittels Pentan/Ether-Extraktion für die gaschromatographische Analyse aufgearbeitet.

Wiederfindungsversuche mit Standards von cis-Verbenol und Verbenon, gelöst in Miglyol, ergaben Wiederfindungsraten von 91,5 % bzw. 90,5 % der eingesetzten Menge.

#### 4.9.3.6 Reinheitsbestimmung von Terpensubstraten

Zur Bestimmung der Gehalte an Verunreinigungen in den für die Biotransformationen eingesetzten Terpensubstraten wurde die gleiche Menge, die zur Biotransformation pro Kulturkolben eingesetzt wurde ( $\alpha$ -Pinen: 200  $\mu$ L) in ein 4 mL Probenfläschchen pipetiert und genau ausgewogen. Als interner Standard wurde Nonansäuremethylester in der gleichen Menge wie bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion (100  $\mu$ g, s.4.9.3.1) zugegeben und mit Pentan/Ether-Gemisch auf ca. 1 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde direkt in den Gaschromatographen injiziert.

### **4.9.4 Derivatisierungsreaktionen für die Gaschromatographie**

#### 4.9.4.1 Methylierung

Das Diazomethan wurde in einer Apparatur nach [197] erzeugt, indem Stickstoff in ein Zweiphasensystem mit 1 mL 2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol und 1,5 mL 60%-iger KOH sowie 0,5 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluensulfonamid (Diazald) in 2 mL Diethylether eingeleitet wurde. Das Diazomethan wurde im Stickstoffstrom in die Probenlösung (3-6 mL in Diethylether), der 3 Tropfen Methanol zum Abfangen überschüssigen Diazomethans zugegeben worden waren, eingeleitet.

Sobald eine leichte Gelbfärbung der Probenlösung auftrat, wurde die Reaktion beendet. Die Diazomethanbildung im Reaktionsgefäß konnte durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig gestoppt werden.

#### 4.9.4.2 Silylierung

Zur Silylierung der Proben wurden 50  $\mu$ L Probe (gelöst in Diethylether oder Pentan/Ether) in ein Probengläschen mit 250  $\mu$ L Mikroeinsatz gegeben und mit 50  $\mu$ L MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid) gemischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur reagieren gelassen.

#### 4.9.5 Probenvorbereitung für die hochleistungsflüssigchromatographische Untersuchung schwerflüchtiger Transformationsprodukte

Für die Untersuchung der Transformationen von Citronellol durch *C. carcharias* und von Limonen durch *P. sapidus* auf schwerflüchtige Produkte wurden 100 mL-Kulturen nach dem Standardverfahren kultiviert. Von den Pilzen wurden jeweils 5 Transformationskulturen und 5 Kontrollkulturen (ohne Terpensubstrat) geführt. Nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen Transformationsdauer wurde jeweils ein 100 mL-Kolben von Transformations- und Kontrollwert als Probe genommen. Zur Trennung von Medium und Myzel wurden die Proben zentrifugiert (250 mL Polypropylen-Zentrifugenbecher, 29 min, 4000 x g), das Myzel einmal mit Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden Medium und Myzel getrennt tiefgefroren gelagert. Die Proben der verschiedenen Probenahmetage wurden vereinigt und als Sammelproben aufgearbeitet.

Aufarbeitung des Kulturmediums: Die Sammelprobe (300-400 mL) wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 6 eingestellt. Danach erfolgte die Aufarbeitung mittels Lewatitadsorption (s.u.).

Aufarbeitung des Myzels: Die Frischmasse (je Sammelprobe 100-200 g, genau abgewogen) wurde mit der gleichen Menge Methanol 3 min lang homogenisiert (Blender Stufe 7) und zentrifugiert (20 min, 4000 x g). Der Rückstand wurde erneut in Methanol (50 mL) suspendiert und zentrifugiert. Die gesammelten methanolischen Überstände wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und danach in 50 mL Wasser wieder aufgenommen. Aus dem so erhaltenen Myzelextrakt wurde dann die Lewatitadsorption vorgenommen.

#### 4.9.6 Säulenaufarbeitung mit Lewatit OC 1064 (nach [198])

30 g Lewatit OC 1064 (gereinigt durch 24 h Soxhlet-Extraktion mit Aceton, 24 h Trocknen bei 70 °C) wurden 1 h lang in 200 mL Methanol konditioniert und dann in eine Glassäule (3 x 50 cm, Fritte: Por.0) gefüllt. Das Lewatit wurde fünfmal mit 200 mL deion. Wasser gewaschen. Dabei wurde durch Anlegen eines leichten Vakuums am oberen Säulenende (Membranpumpe) und Öffnen des Auslaßhahns am unteren Säulenende Luft durch die Säule gesaugt, so daß durch Aufwirbeln des Adsorbens eine gute Durchmischung erfolgte. Mit der gleichen Methode wurde während der einstündigen Adsorp-

tionszeit der Probe, die nach dem Waschschrift auf die Säule gegeben wurde, eine gute Durchmischung gewährleistet.

Nach der Adsorption wurde mit 3 x 200 mL deion. Wasser gewaschen, die Elution erfolgte mit 3 x 100 mL Aceton. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und in 5 mL Wasser aufgenommen.

#### 4.9.7 Gaschromatographie

##### 4.9.7.1 GC-FID

Gaschromatograph: Fisons GC 8360  
Auswertestation: Digital Venturis 575  
mit Chromcard for Windows V 1.19-7β  
(CE-Instruments, Mailand, Italien)

*On column-Injektor:* (für Gesamtextrakte und LPME)

Säule: J&W CW 20 M (30 m x 0,32 mm i.D. x 0,4 µm Filmdicke)  
Vorsäule: 3 m x 0,32 mm FS-CW-desaktiviert  
(CS - Chromatographie-Service)

Trägergas: 50 kPa H<sub>2</sub> (Flußgeschwindigkeit: 2,8 mL min<sup>-1</sup>)

FID: 270 °C

H<sub>2</sub>: 50 kPa; Druckluft: 100 kPa

Temperaturprogramme:

1.) für Gesamtextrakte: 40 °C (3 min) - 3 °C min<sup>-1</sup> - 230 (10 min)

2.) für LPME-Proben (Schnellprogramme):

*Citronelloltransformationsprodukte:*

60 °C (3 min) - 5 °C min<sup>-1</sup> - 230 °C (5 min)

*Limonen, Carveol; Carvon:*

50 °C (3 min) - 5 °C min<sup>-1</sup> - 150 °C (5 min)  
(tägliches Ausheizen vor Beginn der Analysen)

*Split/splitless-Injektor (für SPME)*

Säule: Leupold (Weihenstephan)  
BC CW 20 M (30 m x 0,32 mm i.D. x 0,4 µm Filmdicke)  
Vorsäule: 3 m x 0,32 mm FS-CW-desaktiviert  
(CS - Chromatographie-Service)

Trägergas: 45 kPa H<sub>2</sub> (Flußgeschwindigkeit: 2,1 mL min<sup>-1</sup>)

Injektor: 230 °C  
Split (1:25): 3 min splitless

FID: 270 °C  
H<sub>2</sub>: 50 kPa; Druckluft: 100 kPa

Temperaturprogramm: 40 °C (3 min) - 5 °C min<sup>-1</sup> - 150 °C (5 min)

4.9.7.2 GC-MS*4.9.7.2.1 Für silylierte Proben:*

Gaschromatograph: Hewlett Packard HP 5890 Series II

Injektion: 1 µL On column

Säule: Macherey & Nagel SE 54  
(30 m x 0,32 mm i.D. x 0,4 µm Filmdicke)  
Vorsäule: 3 m x 0,32 mm FS-Phenyl-Sil,  
desaktiviert (Chromatographie-Service)

Trägergas: 50 kPa Helium

Temperaturprogramm: 60 °C(2 min) - 5 °C min<sup>-1</sup> - 290 (20 min)

Massenspektrometer: Hewlett Packard Mass Spectrometer 5989 A (Quadrupol)  
mit MS HP-UX Chemstation Auswertestation  
und B06.01 Software

Spektrbibliotheken: Wiley, NBS54K,  
institutseigene Referenzdatei

Interface: 260 °C

Ionenquelle: 260 °C

Quadrupol-Massenfilter: 100 °C

Ionisation: Elektronenstoß-Ionisation 70 eV

Massenbereich: m/z 33-300

#### 4.9.7.2.2 Für underivatisierte Proben

Gaschromatograph: Fisons GC 8000

Säule: J&W CW 20 M  
(30 m x 0,32 mm i.D. x 0,4 µm Filmdicke)  
Trägergas: 50 kPa Helium  
Injektion: 1µL On-column (Sekundärkühlung 10 sec)  
Temperaturprogramm: 40 °C(3 min) - 3 °C min<sup>-1</sup> - 230 (20 min)

Massenselektiver Detektor: Fisons MD 800 (Quadrupol) mit Masslab Version 1.3

Spekrenbibliotheken: NIST, institutseigene Referenzdatei  
Interface: 230 °C  
Ionenquelle: 200 °C  
Quadrupol-Massenfilter: 100 °C  
Ionisation: Elektronenstoß-Ionisation 70 eV  
Massenbereich: m/z 33-300

#### 4.9.7.3 Präparative Gaschromatographie

Gaschromatograph: MCS Gerstel mit Hewlett Packard GC 5890 Series II  
Datenaufnahme/Steuerung: Hewlett Packard Vectra QS/16S  
mit MCS 1.15 Software (Gerstel)  
Autosampler: Hewlett Packard 7673, Injektionsvolumen: 10 µL  
Injektor: Gerstel KAS-3 Kaltaufgabesystem  
Temp.prg.: 40 °C (30 s) - 10 °C s<sup>-1</sup> - 250 °C (240 s)  
Präp. Fraktionensammler: Gerstel PFS  
Temperaturen: Verteiler: 200 °C  
Transferleitung: 200 °C  
Fallen: 5 °C (Umlaufkühler mit 10%  
Diethylenglykol in Wasser)  
1. Säule: Leupold OV 1 Fused Silica  
(3 m x 0,53 mm i.D. x 2 µm Filmdicke)



|                         |  |               |
|-------------------------|--|---------------|
| 2. Säule:               | Leupold BC CW 20M Fused Silica<br>(25 m x 0,53 mm i.D. x 1 µm Filmdicke)   |               |
| Gase und Strömungen:    | Trägergas (H <sub>2</sub> ): 5 mL min <sup>-1</sup><br>Gegengase 1 und 2 (H <sub>2</sub> ): 10 mL min <sup>-1</sup><br>Hilfsgase 1 und 2 (H <sub>2</sub> ): 1 mL min <sup>-1</sup> |               |
| Temperaturprogramm:     | 40 (3 min) - 3 °C min <sup>-1</sup> - 200 °C (2 min)   |               |
| Schnitt (für 2. Säule): | 23,5-27,7 min  |               |
| Fallen:                 | 1 (Carvon):  | 31,4-31,9 min |
|                         | 2 (trans-Carveol):   | 33,4-33,9 min |
|                         | 3 (cis-Carveol):   | 34,2-34,7 min |
| Detektoren (FIDs):      | 250 °C   |               |

#### 4.9.7.4 Gaschromatographie zur Enantiomerentrennung

|                   |  |        |
|-------------------|--|--------|
| Gaschromatograph: | Satochrom  |        |
| Auswertestation:  | s. 4.9.7.1   |        |
| Säule:            | Macherey-Nagel Hydrodex β-3P (25 m x 0,25 mm i.D.)<br>(Trennphase: Heptakis-(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-<br>β-cyclodextrin verdünnt mit OV-1701)<br>Vorsäule: 3 m x 0,32 mm i.D. FS-CW-desaktiviert<br>(CS - Chromatographie-Service) |        |
| Trägergas:        | 100 kPa H <sub>2</sub>   |        |
| Injektor:         | 210 °C<br>Split (1:50): splitless für 0,5 min  |        |
| FID:              | 270 °C<br>H <sub>2</sub> : 50 kPa; Druckluft: 100 kPa  |        |
| Ofentemperaturen: | Limonen:   | 47 °C  |
|                   | Carvon:  | 77 °C  |
|                   | cis/trans-Carveol:   | 100 °C |

#### 4.9.7.5 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \cdot \frac{(\lg t'_A - \lg t'_N)}{(\lg t'_{N+n} - \lg t'_N)}$$

$t'$  = rel. Retentionszeiten = Retentionszeit (t) - Totzeit ( $t_0$ )

A = Analyt

N = Anzahl der C - Atome des Alkans , welches vor dem Analyten eluiert wird

n = Differenz zur Anzahl der C - Atome des nach dem Analyten eluierten Alkans

Die Alkanreihe enthielt alle Alkane von C<sub>6</sub> bis C<sub>28</sub> mit Ausnahme von C<sub>27</sub>.

### **4.9.8 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)**

#### 4.9.8.1 HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)

Pumpe: Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump

(Jasco Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt)

Degasser: Jasco DG-980-50 3-Line Degasser

Flußrate: 0,4 mL min<sup>-1</sup>

Gradientenformer: Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit

Gradient: 90% Hexan / 10 % 2-Propanol (0 min)  
in 30 min auf 50 % Hexan / 50 % 2-Propanol  
in 5 min auf 30 % Hexan / 70 % 2-Propanol (Spülschritt)  
in 5 min auf 90 % Hexan / 10 % 2-Propanol

Probenaufgabe: Rheodyne RH 7725i mit 20 µL Probenschleife

Säule: Merck Lichrospher Diol (5µm) in Merck Lichrocart 250-4 (250 x 4 mm)

Vorsäule: Merck Lichrospher Diol (5µm), Lichrocart 4-4

Diodenarray-Detektor: Jasco MD-910 Multiwavelength Detector

Wellenlängen: 210 + 230 nm

ELSD: Sedex 55 (Fa: Sedere, Alfortville Cedex, Frankreich)

Empfindlichkeit: Gain 11

Verdampfertemperatur: 40 °C

Druckluft: 2,0 bar

Auswerteeinheit: Dell Dimension 166a mit Borwin-PDA V 1.0  
(JMBS Developements, Le Fontanil, Frankreich)

#### 4.9.8.2 HPLC-MS

Bedingungen auf der HPLC-Seite: Wie unter 4.9.8.1 beschrieben.

Massenspektrometer: Hewlett Packard Mass Spectrometer 5989 A (Quadrupol)  
mit Particle Beam-LC-MS-Interface HP 59980b  
und MS HP-UX Chemstation Auswertestation und B06.01 Software  
Desolvation Chamber: 45 °C  
Helium-Vordruck für Nebulizer: 50 psi  
Ionenquelle: 260 °C, Quadrupol: 100 °C  
Ionisation: Elektronenstoß-Ionisation (EI) 70 eV  
Massenbereich: m/z 88-600

#### **4.9.9 NMR-Spektroskopie**

NMR-Spektrometer: Bruker WP-200

Lösungsmittel:  $\text{CDCl}_3$

interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

$^1\text{H}$ -NMR: 200 MHz

$^{13}\text{C}$ -NMR: 50 MHz      Meßverfahren: 1. Breitbandentkopplung  
2. attached proton test (APT)

## **4.10 Entsorgungshinweise**

### **4.10.1 Biologisches Material**

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Abtrennung des Myzels wurde das Medium in das Laborabwasser gegeben und die Myzelrückstände in den Laborabfall.

### **4.10.2 Lösungsmittel und Chemikalien**

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch die verwendeten Aufarbeitungsverfahren (Festphasenextraktion und Mikroextraktion) sowie durch die weitgehende Wiederverwendung verwendeter Extraktionsmittel durch destillative Aufreinigung auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenerter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wiederverwertbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte Lösungsmittel.

Ebenso wie andere Sonderabfälle wurden diese Lösungsmittel der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed. H. TSCHESCHE): *Prinzipien der Biochemie* 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford (1994)
- [2] KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M.: *Enzymatic reactions in organic media*, Blackie Academic & Professional, London (1996)
- [3] SCHWANTES, H. O.: *Biologie der Pilze*, UTB / Ulmer, Stuttgart (1996)
- [4] ANKE, T.: *Fungal biotechnology*, Chapman & Hall GmbH, Weinheim (1997)
- [5] WAINWRIGHT, M.: *An introduction to fungal biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester (1992)
- [6] ABRAHAM, B.; BERGER, R. G.; SCHULZ, H.: Oakmoss impact volatiles generated by a basidiomycete of the genus *Polyporus*, *Flavour and Fragrance J.* 9 (1994), S. 265-268
- [7] ABRAHAM, B.; KRINGS, U.; BERGER, R. G.: Dynamic extraction, an efficient screening procedure for aroma producing basidiomycetes, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (1993) Nr. 5/6, S. 178-181
- [8] ABRAHAM, B.; KRINGS, U.; BERGER, R. G.: Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten (Ständerpilze), *GIT Fachz. Lab.* (1994) Nr. 4, S. 370-375
- [9] SPRECHER, E.; HANSEN, H.-P.: Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen, *Forum Mikrobiol.* 8 (1985) Nr. 1, S. 17-18,21
- [10] BUSMANN, D.; BERGER, R. G.: Oxyfunctionalization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene by selected basidiomycetes, *Z. Naturforsch.* 49c (1994), S. 545-552
- [11] BUSMANN, D.; BERGER, R. G.: Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes, *J. Biotechnol.* 37 (1994), S. 39-43
- [12] MIKAMI, Y.: Microbial conversion of terpenoids, *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 6 (1988), S. 271-320
- [13] TRUDGILL, P. W.: Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes. In: RATLEDGE, C.: *Biochemistry of microbial degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London (1994), S. 33-61
- [14] REHM, H.-J.; REED, G.; KIESLICH, K.: *Biotechnology Vol. 6a, Biotransformations*, Verlag Chemie, Weinheim (1984)
- [15] DAVIS, N. W.: Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases, *J. Chromatogr.* 503 (1990), S. 1-24
- [16] JENNINGS, W.; SHIBAMATO, T.: *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*, Academic Press, New York London (1980)

- [17] Institutseigene Aromastoff-Referenzdatei, *Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hannover*
- [18] GREASHAM, R.; INAMINE, E.: Nutritional improvement of processes. In: DEMAIN, A. L. UND SOLOMON, N. A.: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C. (1986), S. 41-48
- [19] PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P.: The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika* 33 (1946), S. 305-325
- [20] Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.: *Statistics for experimenters*, John Wiley & Sons, New York (1978)
- [21] LANG, S.; WAGNER, F.: Biological activities of biosurfactants. In: KOSARIC, N.: *Biosurfactants - production, properties, applications*, Marcel Dekker, New York (1993), S. 251-267
- [22] GERSON, D. F.: The biophysics of microbial surfactants: Growth on insoluble substrates. In: KOSARIC, N.: *Biosurfactants - production, properties, applications*, Marcel Dekker, New York (1993), S. 269-286
- [23] AYER, W. A.; TAKASHI, Y.; VAN SCHIE, D.: Metabolites of birds nest fungi. 9. Diterpenoid metabolites of *Cyathus africanus*, *Can. J. Chem.* 56 (1978), S. 2113-2120
- [24] BREHERET, S.; TALOU, T.; RAPIOR, S.; BRESSIÈRE, J.-M.: Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (basidiomycetes), *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 831-836
- [25] MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y.; VENKATESWARLU, K.; KELLY, S. L.: Microsomal and cytosolic cytochrome P450 mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*, *Biotech. Lett.* 17 (1995), S. 969-974
- [26] ABRAHAM, W. R.; STUMPF, B.; KIESLICH, K.: Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986), S. 24-30
- [27] ABRAHAM, W. R.; STUMPF, B.; KIESLICH, K.; REIF, S.; HOFFMANN, H. M. R.: Biotransformation of tetramethyl-limonene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986), S. 31-34
- [28] ABRAHAM, W. R.; HOFFMANN, H. M. R.; KIESLICH, K.; RENG, G.; STUMPF, B.: Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids. In: PORTER, R. UND CLARK, S.: *Enzymes in organic synthesis (Ciba Foundation symposium 111)*, Pitman, London (1985), S. 146-160
- [29] ABRAHAM, W.-R.; KIESLICH, K.; STUMPF, B.; ERNST, L.: Microbial oxidation of tricyclic sesquiterpenoids containing a dimethylcyclopropane ring, *Phytochem.* 31 (1992) Nr. 11, S. 3749-3755
- [30] BOHLMANN, F.; ZEISBERG, R.: <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von Monoterpenen, *Organic Magnetic Resonance* 7 (1975), S. 426-432
- [31] GHISALBERTI, E. L.; TWISS, E.; REA, P. E.: Synthesis of optically active synthons based on the 2,6-Dimethyloctane skeleton, *J. Chem. Res. Miniprint* 8 (1991), S. 1901-1913

- [32] BRUNERIE, P.; BENDA, I.; BOCK, G.; SCHREIER, P.: Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1987), S. 6-10
- [33] SACHS, L.: *Angewandte Statistik - Statistische Methoden und ihre Anwendungen* 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1978)
- [34] BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E.: Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environm. Microbiol.* 63 (1997) Nr. 7, S. 2495-2501
- [35] OESCH, F.: Microsomal epoxide hydrolase. In: JAKOBY, W. B.: *Enzymatic basis of detoxication* Bd. 2, Academic Press, New York (1980), S. 277-290
- [36] BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H.: *Common fragrance and flavor materials, preparation, properties and uses* 2. Aufl., VCH, Weinheim Basel Cambridge (1990)
- [37] *Aromenverordnung vom 22. Dezember 1981* ( Bundesgesetzblatt I S. 1625/77) in der Fassung der Änderungsverordnung vom 20.12.1993 (Bundesgesetzblatt I S. 2304)
- [38] OHLOFF, G.; KLEIN, E.; SCHENCK, G. O.: Darstellung von „Rosenoxyden“ und anderen Hydropyran-Derivaten über Photohydroperoxide, *Angew.Chem.* 73 (1961), S. 578
- [39] CORBIER, B.; EHRET, C.: Biotransformation of monoterpenoids by cultured cells of *Rosa centifolia*. In: LAWRENCE, B. M.; MOOKHERJEE, B. D. UND WILLIS, B. J.: *Flavors and Fragrances: A World Perspective, Proceedings of th 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1988), S. 731-741
- [40] FARIA; L.A.DE; ROMERO; J.R.; BOODTS; J.F.: Mechanistic aspects and electrosynthesis of rose oxide through anodic cyclization of citronellol, *J. Appl. Electrochem.* 23 (1993) Nr. 2, S. 173-177
- [41] GRANGER, R.; PASSET, J.; ARBOUSSET, G.: L'essence de *Rosmarinus officinalis* L., *Parf. Cosm. Sav. France* 3 (1973), S. 307-311
- [42] JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J.: Production of flavours by microorganisms (Review), *Proc. Biochem.* 27 (1992), S. 195-215
- [43] ABRAHAM, B. G.; BERGER, R. G.: Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994), S. 2344
- [44] BERGER, R. G.; NEUHÄUSER, K.; DRAWERT, F.: Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms 6. Odorous constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes), *Z. Naturforsch.* 41c (1986), S. 963-970
- [45] MANITTO, P.: *Biosynthesis of natural products*, Ellis Horwood Ltd., Chichester (England) (1980)
- [46] LUCKNER, M.: *Secondary metabolism in plants and animals*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1990)

- [47] DRACZYNSKA, B.; CAGARA, C. Z.; SIEWINSKI, A.; RYMKIEWICZ, A.; ZABZA, A.; LEUFVÉN, A.: Biotransformation of pinenes XVII. Transformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes by means of *Armillariella mellea* (honey fungus) , *J. Basic. Microbiol.* 8 (1985), S. 487-492
- [48] OHLOFF, G.: *Scent and fragrances - the fascination of odors and their chemical perspectives*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1994)
- [49] DHAVALIKAR, R. S.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbiological transformations of terpenes: Part VIII - fermentation of limonene by a soil pseudomonad, *Ind. J. Biochem.* 3 (1966), S. 144-157
- [50] DHAVALIKAR, R. S.; RANGACHARI, P. N.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbial transformation of terpenes: Part IX. Pathways of degradation of limonene in a soil Pseudomonad, *Ind. J. Biochem.* 3 (1966), S. 158-164
- [51] BOWEN, E. R.: Potential by-products from microbial transformation of d-limonene, *Florida State Horticultural Society* 88 (1975)
- [52] NOMA, Y.; YAMASAKI, S.; ASAKAWA, Y.: Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*, *Phytochem.* 31 (1992) Nr. 8, S. 2725-2727
- [53] PREMA, B. R.; BHATTACHARYYA, B. K.: Microbial transformation of terpenes II. Transformations of  $\alpha$ -pinene, *Appl. Microbiol.* 10 (1962), S. 524-528
- [54] BHATTACHARYYA, P. K.; GANAPATHY, K.: Microbial transformation of terpenes: Part VI. Studies on the mechanism of some fungal hydroxylation reactions with the aid of model systems, *Ind. J. Biochem.* 2 (1965), S. 137-145
- [55] REPP, H. D.; SROTTMEISTER, U.; DÖRRE, M.; WEBER, L.; HAUFE, G.: Microbial oxidation of  $\alpha$ -pinene, *Biocatalysis* 4 (1990), S. 75
- [56] BUSMANN, D.: *Oxyfunktionalisierung und Katabolyse von Terpen-Kohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten*, Dissertation, Universität Hannover (1994)
- [57] BOCK, G.; BENDA, I.; SCHREIER, P.: Microbial transformation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1988), S. 351-357
- [58] RAPP, A.; MANDERY, H.: Influence of *Botrytis cinerea* on the monoterpene fraction of wine aroma . *Bioflavour '87*, Walter de Gruyter, Berlin New York (1988), S. 445-452
- [59] ABRAHAM, W.-R.; ARFMANN, H.-A.; STUMPF, B.; WASHAUSEN, P.; KIESLICH, K.: Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds. In: SCHREIER, P.: *Bioflavour '87*, W. de Gruyter, Berlin New York (1988), S. 399-414
- [60] LIU, W. G.; ROSAZZA, J. P. N.: Stereospecific hydroxylation of 1,8-cineole using a microbial biocatalyst, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) Nr. 20, S. 2833-2836
- [61] NANKAI, H.; MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H.: Microbial transformation of (+/-)-Citronellal by *Glomerella cingulata* , *Nat. Prod. Lett.* 9 (1996), S. 53-55
- [62] MIYAZAWA, M.; NANKAI, H.; KAMEOKA, H.: Microbial oxidation of citronellol by *Glomerella cingulata* , *Nat. Prod. Lett.* 8 (1996), S. 303-305



- [63] GRIFFITHS, E. T.; BOCIEK, S. M.; HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; SISSONS, D. J.; TRUDGILL, P. W.: Bacterial metabolism of  $\alpha$ -Pinene: Pathway from  $\alpha$ -Pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P 18.3, *J. Bacteriol.* 169 (1987) Nr. 11, S. 4972-4979
- [64] BEST, D. J.; FLOYD, N. C.; MAGHALAES, A.; BURFIELD, A.; RHODES, P. M.: Initial enzymatic steps in the degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Biocatalysis* 1 (1987), S. 147-159
- [65] GRIFFITHS, E. T.; HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; TRUDGILL, P. W.: Purification and properties of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. Strain P18.3, *J. Bacteriology* 169 (1987) Nr. 11, S. 4980-4983
- [66] MIYAZAWA, M.; YOKOTE, K.; KAMEOKA, H.: Biotransformation of the monoterpenoid, rose oxide, by *Aspergillus niger*, *Phytochem.* 39 (1995) Nr. 1, S. 85-89
- [67] COONEY, J. J.; SIPORIN, C.; SMUCKER, R. A.: Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon-using fungus *Cladosporium resinae*, *Bot. Mar.* 23 (1980), S. 227-232
- [68] CUNDELL, A. M.; MUELLER, W. C.; TRAXLER, R. W.: Morphology and ultrastructures of a *Penicillium* sp. grown on n-hexadecane or peptone, *Appl. Environm. Microbiol.* 31 (1976), S. 408-414
- [69] BRADSHAW, W. H.; CONRAD, H. E.; COREY, E. J.; GUNSALUS, I. C.; LEDNICER, D.: Microbial degradation of (+)-camphor, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959), S. 5507
- [70] CONRAD, H. E.; DUBUS, R.; GUNSALUS, I. C.: An enzyme system for cyclic ketone lactonization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6 (1961), S. 295-297
- [71] CADWALLADER, K. R.; BRADDOCK, R. J.; PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P.: Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, *J. Food Sci* 54 (1989) Nr. 5, S. 1241-1245
- [72] CADWALLADER, K. R.; BRADDOCK, R. J.; PARISH, M. E.: Isolation of  $\alpha$ -terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*, *J. Food Sci.* 57 (1992) Nr. 1, S. 241-244, 248
- [73] CHANG, H. C.; GAGE, D. A.; ORIEL, P. J.: Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*, *J. Food Sci.* 60 (1995) Nr. 3, S. 551-553
- [74] HAAG, R.: Solare Chemie und Materialforschung, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 43 (1995) Nr. 12, S. 1300-1301
- [75] *Production of L-carvone from limonene using a Corynebacterium strain, Japan. Pat.* 47-38, 998 (1972)
- [76] CHANG, H. C.; ORIEL, P.: Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Food Sci.* 59 (1994) Nr. 3, S. 660-662, 686
- [77] BRADDOCK, R. J.; CADWALLADER, K. R.: Bioconversion of citrus d-limonene. *Fruit flavors - biogenesis, characterization and authentication, ACS Symposium Series* 596 Bd. 13., American Chemical Society, Washington DC (1995)

- [78] P. M. Rhodes und N. Winskill (Pfizer Inc., New York): *Microbiological process for the preparation of l-carvone*, US-Patent 4,495,284, (1985)
- [79] FICHAN, I.: Terpene biotransformations report No. 2, April 1997, *Biotechnology research and technological development programme CEC contract BIO4-CT95-0049* (1997)
- [80] WEIDENHAMER, J. D.; MACIAS, F. A.; FISCHER, N. H.; WILLIAMSON, G. B.: Just how insoluble are monoterpenes?, *J. Chem. Ecol.* 19 (1993) Nr. 8, S. 1799-1807
- [81] LIDE, D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 73. Aufl., CRC Press, Boca Raton Florida (1992)
- [82] MOORE, R. N.; GOLUMBIC, C.; FISHER, G. S.: Autoxidation of  $\alpha$ -Pinene, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956), S. 1173-1176
- [83] WILLIAMS, C. M.; WHITTAKER, D.: Rearrangement of pinane derivatives. Part I. Products of acid catalysed hydration of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene, *J. Chem. Soc. (B)* (1971) Nr. 668-672
- [84] NARUSHIMA, H.; OMORI, T.; MINODA, Y.: Microbial transformation of  $\alpha$ -pinene, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16 (1982) Nr. 4, S. 174-178
- [85] KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.-M.; VIGENSCHOW, H.: Action of terpenoids on energy metabolism. In: BRUNKE, E. J.: *Progress in Essential Oil Research*, W. de Gruyter & Co., Berlin New York (1986)
- [86] PRIVAT-FICHAN, I.; LARROCHE, C.: Terpene biotransformations report No. 3, April-September 1997, *Biotechnology research and technological development programme CEC contract BIO4-CT95-0049* (1997)
- [87] HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. M.: Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents, *TIBTECH* 12 (1994), S. 409-414
- [88] BRUCE, L. J.; DAUGULIS, A. J.: Solvent selection strategies for extractive biocatalysis, *Biotechnol. Prog.* 7 (1991), S. 116-224
- [89] MCINTOSH, T. J.; SIMON, S. A.; McDONALD, R. C.: The organization of n-alkanes in lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 597 (1980), S. 445-463
- [90] KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIS, N.; WEIGAND, H.: Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests. In: SCHREIER, P.: *Bioflavour '87*, W. de Gruyter, Berlin New York (1988)
- [91] OSBORNE, S. J.; LEAVER, J.; TURNER, M. K.; DUNNILL, P.: Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane, *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990), S. 281-291
- [92] LOFFELD, B.; KEWELOH, H.: cis/trans Isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8, *Lipids* 31 (1996) Nr. 8, S. 811-815
- [93] HEIPIEPER, H. J.; DE BONT, J. A. M.: Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes, *Appl. Environm. Microbiol.* 60 (1994) Nr. 12, S. 4440-4444

- [94] SUUTARI, M.; LIUKKONEN, K.; LAAKSO, S.: Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990), S. 1469-1474
- [95] LEE, K.; GIBSON, D. T.: Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816-4, *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) Nr. 9, S. 3101-3106
- [96] HACK, C.J.; WOODLEY, J.M.; LILLY, M.D.; LIDDELL, J.M.: The production of *Pseudomonas putida* for the hydroxylation of toluene to its cis-glycol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 (1994) Nr. 5, S. 495-499
- [97] BOSETTI, A.; BIANCHI, D.; ANDRIOLLO, N.; CIDARIA, D.; CESTI, P.; SELLO, G.; DI GENNARO, P.: Microbial oxidation of naphthalene to cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene in a membrane bioreactor, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66 (1996) Nr. 4, S. 375-381
- [98] WEINER, A. L.: Lamellar systems for drug solubilization. In: OSTRO, M. J.: *Liposomes. From biophysics to therapeutics*, Marcel Dekker Inc., New York & Basel (1987), S. 339-369
- [99] DRAUZ, K.; WALDMANN, H.: *Enzyme catalysis in organic synthesis - A comprehensive handbook* Bd. II., VCH, Weinheim (1995)
- [100] WISLOCKI, P. G.; MIWA, G. T.; LU, A. Y. H.: Reactions catalyzed by the Cytochrome P-450 System. In: JAKOBY, W. B.: *Enzymatic basis of detoxication*, Bd. 1., Academic Press, New York (1980), S. 135-182
- [101] HOLLAND, H. L.: *Organic synthesis with oxidative enzymes*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim New York Cambridge (1992)
- [102] KAMINSKA, J.; MARKOWICZ, L.; STOŁOWSKA, J.; GORA, J.: Biotransformation of citronellol by means of horseradish peroxidase, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989), S. 436-438
- [103] WACKETT, L. P.; GIBSON, D. T.: Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*, *Biochem. J.* 205 (1982), S. 117-122
- [104] KELLY, S. L. ET AL.: Lanosterol to ergosterol - enzymology, inhibition and genetics. In: KUHN, P. J.; TRINCI, A. P. J.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W. UND COPPING, L. G.: *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1990), S. 232-243
- [105] UNGER, L.: Basic business trends in the worldwide flavor and fragrance industry (1987-1990), *Perfumer & Flavorist* 14 (1989) Nr. 3, S. 42-45
- [106] KELLY, S. L.; KELLY, D. E.; KING, D. J.; WISEMAN, A.: Interaction between yeast cytochrome P450 and chemical carcinogens, *Carcinogenesis* 6 (1985), S. 1321-1325
- [107] ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E. A.; CERNIGLIA, C. E.: Phase I and Phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics, *FEMS Microbiol. Lett.* 138 (1996), S. 221-226

- [108] FERRIS, J. P.; MACDONALD, L. H.; PATRIE, M. A.; MARTIN, M. S.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus *Cunninghamella bainieri*: evidence for the presence of cytochrome P-450, *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (1976), S. 443-452
- [109] HOLLAND, H. L.; DESTAFANO, D.; OZOG, J.: Side chain hydroxylation of aromatic compounds by fungi. Part 6. Biotransformations of olefins by *Mortierella isabellina*, *Biocatalysis* 10 (1994), S. 65-76
- [110] VENKATESWARLU, K.; MARSH, R. M.; FABER, B.; KELLY, S. L.: Investigation of cytochrome P450 mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in *Aspergillus fumigatus*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66 (1996) Nr. 139-144
- [111] SMITH, K. E.; AHMED, F.; WILLIAMS, R. A. D.; KELLY, S. L.: Microbial transformations of steroids - VIII. Transformation of progesterone by whole cells and microsomes of *Aspergillus fumigatus*, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 49 (1994) Nr. 1, S. 93-100
- [112] KING, D. J.; AZARI, M. R.; WISEMAN, A.: Studies on the properties of highly purified cytochrome P448 and its dependent activity benzo[a]pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenobiotica* 14 (1984), S. 187-206
- [113] DUTTA, D.; GOSH, D. K.; MISHRA, A. K.; SAMANTA, T. B.: Induction of benzo[a]pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Evidences of multiple forms of cytochrome P-450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 (1983) Nr. 2, S. 692-699
- [114] MEGGS, R.; MÜLLER-FROHNE, M.; PFEIL, D.: Microbial steroid hydroxylating enzymes in glucocorticoid production. In: RUCKPAUL, K. UND REIN, H.: *Frontiers in biotransformations*, Akademie-Verlag, Berlin (1992), S. 204-243
- [115] VITAS, M.; ROZMAN, D.; KOMEL, R.; KELLY, S. L.: Progesterone side-chain cleavage by *Paecilomyces lilacinus*, *Phytochem.* 40 (1995) Nr. 1, S. 73-76
- [116] VITAS, M.; ROZMAN, D.; KOMEL, R.; KELLY, S. L.: P-450-mediated progesterone hydroxylation in *Cochliobolus lunatus*, *J. Biotechnol.* 42 (1995), S. 145-150
- [117] REDDY, C. A.: An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biotechnol.* 30 (1993), S. 91-107
- [118] KIRK, T. K.; FARRELL, R. L.: Enzymatic „combustion“: the microbial degradation of lignin, *Ann. Rev. Microbiol.* 41 (1987), S. 465-505
- [119] COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W.: Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290, *Biotech. Lett.* 17 (1995), S. 989-992
- [120] COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W.: Oxidation of fluorene and phenanthrene by Mn(II) dependent peroxidase activity in whole cultures of *Trametes (coriolus) versicolor*, *Biotech. Lett.* 18 (1996) Nr. 7, S. 801-804
- [121] COLLINS, P. J.; KOTTERMAN, M. J. J.; FIELD, J. A.; DOBSON, A. D. W.: Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*, *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) Nr. 12, S. 4563-4567

- [122] HAMMEL, K. E.; KALYANARAMAN, B.; KIRK, T. K.: Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* 261 (1986), S. 16948-16952
- [123] FIELD, J. A.; BOELSMA, F.; BATEN, H.; RULKENS, W. H.: Oxidation of anthracene in water/solvent mixture by the white-rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 (1995), S. 234-240
- [124] KOTTERMANN, M. J. J.; WASSEVELD, R. E.; FIELD, J. A.: Hydrogen peroxide production as a limiting factor in xenobiotic compound oxidation by nitrogen-sufficient cultures of *Bjerkandera* sp. strain BOS55 overproducing peroxidases, *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) Nr. 3, S. 880-885
- [125] BUMPUS, J. A.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environm. Microbiol.* 55 (1989) Nr. 1, S. 154-158
- [126] BUMPUS, J. A.; TATARKO, M.: Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases, *Current Microbiol.* 28 (1994), S. 185-190
- [127] HAMMEL, K. E.; GAI, W. Z.; GREEN, B.; MOEN, M. A.: Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environm. Microbiol.* 58 (1992) Nr. 6, S. 1832-1838
- [128] BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E.: Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) Nr. 1, S. 292-295
- [129] MASAPHY, S.; HENIS, Y.; LEVANON, D.: Manganese enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity, *Appl. Environm. Microbiol.* 62 (1996) Nr. 10, S. 3587-3593
- [130] MASAPHY, S.; HENIS, Y.; KRINFELD, B.; LEVANON, D.: In-vitro N-de-ethylation of atrazine by cell-free extract of *Pleurotus pulmonarius* is induced by Mn<sup>2+</sup>, *Biotech. Lett.* 19 (1997) Nr. 9, S. 861-864
- [131] LANGE, B.; KREMER, S.; STERNER, O.; ANKE, H.: Metabolism of pyrene by basidiomycetous fungi of the genera *Crinipellis*, *Marasmius*, and *Marasmiellus*, *Can. J. Microbiol.* 42 (1996) Nr. 11, S. 1179-1183
- [132] LANGE, B.; KREMER, S.; STERNER, O.; ANKE, H.: Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK364, *Appl. Environm. Microbiol.* 60 (1994) Nr. 10, S. 3602-3607
- [133] *Trader's guide to fermentation media formulation* 3. Aufl., Trader's Protein, Memphis (1988)
- [134] MERCK, E.: *Nährböden Handbuch*, Darmstadt, (1990)
- [135] GRIFFIN, D. H.: *Fungal Physiology* 2. Aufl., Wiley-Liss, New York (1994)

- [136] BÖKER, A.: *Untersuchungen zur biotechnischen Gewinnung einer Fruchtaroma-Impact-Verbindung mit Kulturen von Basidiomyceten*, Dissertation, Universität Hannover (1997)
- [137] TERESHINA, V. M.; KISELEVA, A. I.; FEOFILOVA, E. P.; KASHPOROVA, E. V.: Stimulatory effect of green light on  $\beta$ -carotene formation by the heterothallic fungus *Blakeslea trispora*, *Microbiology* 62 (1993) Nr. 1, S. 39-42
- [138] AVALOS, J.; SCHROTT, E. L.: Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, *FEMS Microbiol. Lett.* 66 (1990), S. 295-298
- [139] BAUM, D.; HORWITZ, B. A.: Changes in synthesis and abundance of specific polypeptides at early stages of blue-light-induced sporulation of *Trichoderma* sp., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 11 (1991), S. 117-127
- [140] LU, B. C.: The role of light in fructification of the basidiomycete *Cyathus stercoreus*, *Amer. J. Bot.* 52 (1965), S. 432-437
- [141] DELGADO, G.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, A. E.; MARTÍNEZ, A. T.: Light stimulation of aryl-alcohol oxidase activity in *Pleurotus eryngii*, *Mycol. Res.* 96 (1992), S. 984-986
- [142] CHEBOTAREV, L. N.; ZEMLYANUKHIN, A. A.: Effect of visible light and ultraviolet rays on the activity of oxidation enzymes in molds, *Microbiol.* 42 (1973), S. 196-200
- [143] KEMP, G. D.; DICKINSON, F. M.; RATLEDGE, C.: Light sensitivity of the n-alkane-induced fatty alcohol oxidase from *Candida tropicalis* and *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (1990), S. 461-464
- [144] PARKE, D. V.: Induction of cytochromes P-450 - general principles and biological consequences. In: RUCKPAUL, K. UND REIN, H.: *Frontiers in biotransformation* Bd. 2., Akademie Verlag, Berlin (1991), S. 1-34
- [145] MIYAZAWA, M.; HONJO, Y.; KAMEOKA, H.: Biotransformation of the sesquiterpenoid  $\beta$ -selinene using the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata* as a biocatalyst, *Phytochem.* 44 (1997) Nr. 3, S. 433-436
- [146] ABRAHAM, W.-R.: Phylogenetic influences in microbial hydroxylation of terpenoids, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (1994), S. 88-92
- [147] ABRAHAM, W. R.; ARFMANN, H. A.: Microbial hydroxylation of activated acyclic monoterpene hydrocarbons, *Tetrahedron* 48 (1992) Nr. 32, S. 6681-6688
- [148] SHUKLA, O. P.; MOHOLAY, M. N.; BHATTACHARYYA, P. K.: Microbial transformations of terpenes: part X- fermentation of  $\alpha$ - &  $\beta$ -pinenes by a soil pseudomonad (PL-strain), *Ind. J. Biochem.* 5 (1968), S. 79-91
- [149] CLAUS, D.; WALKER, N.: The decomposition of toluene by soil bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 36 (1964), S. 107-122
- [150] LAANE, C.; TRAMPER, J.: Tailoring the medium and reactor for biocatalysis, *CHEMTECH* 20 (1990) Nr. 8, S. 502-506
- [151] BRINK, L. E. S.; TRAMPER, J.; LUYBEN, K. CH. A. M.; VAN'T RIET, K.: Biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988), S. 736-743

- [152] LILLY, M. D.; HARBRON, S.; NARENDRANTHAN, T. J.: Two-liquid phase biocatalytic reactors, *Methods in Enzymology* 136 (1987), S. 138-149
- [153] LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C.: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987), S. 81-87
- [154] MAHATO, S. H.; MAJUMDAR, I.: Current trends in microbial steroid biotransformation, *Phytochem.* 34 (1993) Nr. 4, S. 883-898
- [155] PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S.: Effects of solvent molecular toxicity and microenvironment composition on the  $\Delta 1$ -dehydrogenation activity of *Arthrobacter simplex* Cells, *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991), S. 97-102
- [156] FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S.; PINHEIRO, H. M.: Bioconversion of a hydrocortisone derivative in an organic-aqueous two-liquid phase system, *Enzyme Microbial Technol.* 17 (1995), S. 163-167
- [157] PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S.: Activity and stability of an entrapped-cell system for the  $\Delta 1$ -dehydrogenation of steroids in organic media, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992), S. 1123-1127
- [158] HOCKNULL, M. D.; LILLY, M. D.: The use of free and immobilised *Arthrobacter simplex* in organic solvent/aqueous two-liquid-phase reactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 (1990), S. 148-153
- [159] FAVRE-BULLE, O.; WITHOLT, B.: Biooxidation of n-octane by a recombinant *Escherichia coli* in a two-liquid-phase system: effect of medium components on cell growth and alkane oxidation activity, *Enzyme Microbial Technol.* 14 (1992) Nr. 11, S. 931-937
- [160] FAVRE-BULLE, O.; SCHOUTEN, T.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.: Bioconversion of n-octane to octanoic acid by a recombinant *Escherichia coli* cultured in a two-liquid phase bioreactor, *Bio/Technology* 9 (1991) Nr. 4, S. 367-371
- [161] WITHOLT, B.; DE SMET, M.-J.; KINGMA, J.; VAN BEILEN, J. B.; KOK, M.; et al.: Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential., *Trends Biotechnol.* 8 (1990) Nr. 2, S. 46-52
- [162] WUBBOLTS, M. G.; FAVRE-BULLE, O.; WITHOLT, B.: Biosynthesis of synthons in two-liquid-phase media, *Biotechnol. Bioeng.* 52 (1996) Nr. 2, S. 301-308
- [163] WITHOLT, B.; FAVRE-BULLE, O.; LAGEVEEN, R.; KINGMA, J.; VAN BEILEN, J. B.; MARVIN, H.; PREUSTING, H.: Synthesis of apolar organic compounds by *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli* in two-liquid-phase fermentations. In: GALLI, E.; SILVER, S.; WITHOLT, B.: *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington DC (1992)
- [164] CEEN, E. G.; DUNNILL, P.; HERRMANN, J. P. R.: Two-liquid phase reactor studies of 11- $\alpha$ -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*, *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988), S. 743-746
- [165] LARROCHE, C.; CREULY, C.; GROS, J.-B.: 2-Heptanone production by spores of *Penicillium roquefortii* in a water organic solvent two-phase system, *Biocatalysis* 5 (1992), S. 163-173

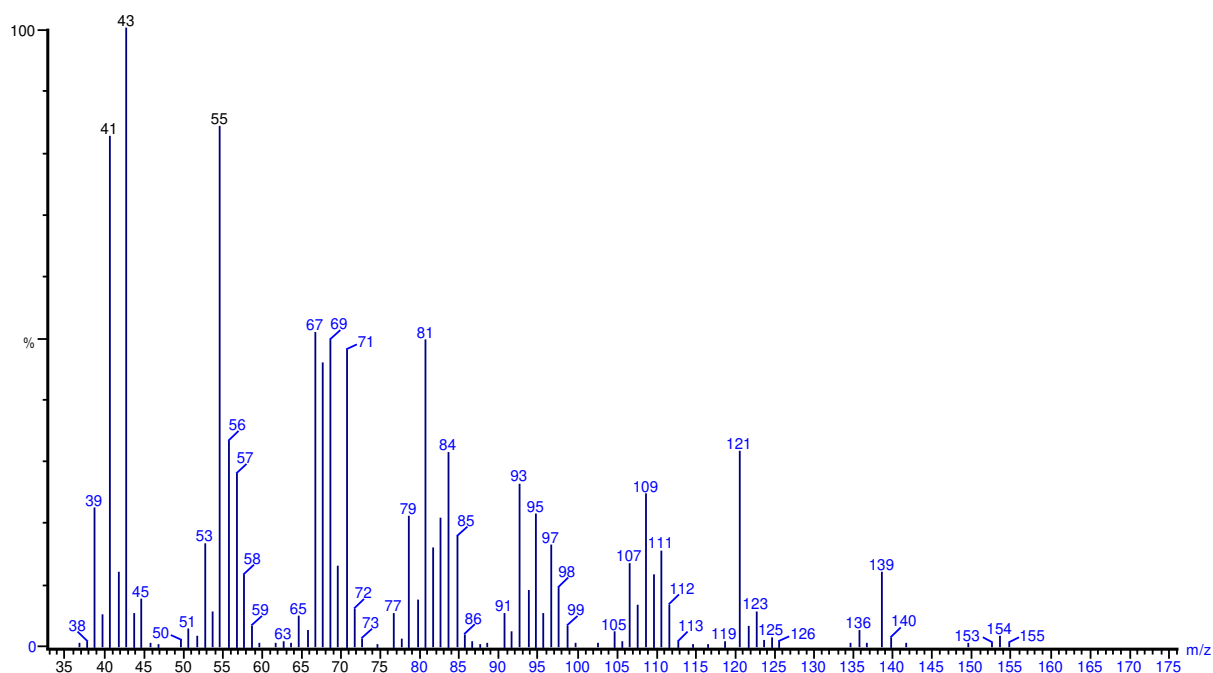
- [166] CREULY, C.; LARROCHE, C.; GROS, J.-B.: Bioconversion of fatty acids into methyl ketones by spores of *Penicillium roquefortii* in a water-organic solvent, two-phase system, *Enzyme Microbial Technol.* 14 (1992), S. 669-679
- [167] LOGAN, T. J.: Surfactants, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24 (1994) Nr. 4, S. 326-371
- [168] KOSSWIG, K.; STACHE, H.: *Die Tenside*, Carl Hanser Verlag, München Wien (1993)
- [169] TANAKA, A.; FUKUI, S.: Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms, *J. Ferment. Technol.* 49 (1971), S. 809
- [170] WALTERS, K. A.; OLEJNIK, O.: Nonionic Surfactants Effects on Biological Membrane Transport. *Tenside in unserer Welt - heute und morgen, Bericht vom Welt-Tensid-Kongreß, München (6.-10.5.1984), Sektion D: Tenside und ihre Anwendungen einschließlich Prüfmethode*n, Kühle Druck und Verlag, Gelnhausen (1984), S. 416-424
- [171] BAR, R.: Liposomal solution for microbial catalysis in organic solvents, *Trends Biotechnol.* 6 (1988), S. 1-2
- [172] OSTRO, M. J.: Liposomen, *Spektrum der Wissenschaft* (1987) Nr. 3, S. 94-103
- [173] MATHUR, R.; CAPASSO, P.: Nonphospholipid liposomes: properties and potential use in flavor encapsulation. In: HO, C.-T.; TAN, C.-T. UND TONG, C.-H.: *Flavor Technology ACS Symposium Series 610*, American Chemical Society, Washington D.C. (1995), S. 220-230
- [174] KIRBY, C. J.: Controlled delivery of functional food ingredients. In: GREGORIADIS, G.: *Liposome Technology*, Bd. II. 2. Aufl., CRC Press Inc., Boca Raton Florida (1993), S. 215-232
- [175] NEW, R. R. C.: Influence of liposome characteristics on their properties and fate. In: PHILIPPOT, J. R. UND SCHUBER, F.: *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*, CRC Press Inc., Boca Raton Florida (1995), S. 3-20
- [176] SMITH, T. L.: Liposomes in cell culture research. In: BAIANU, I. C.: *Physical chemistry of food processes*, Van Nostrand Reinhold, New York (1992), S. 554-587
- [177] GOETSCHEL, R.; BAR, R.: Dehydrogenation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex* in a liposomal medium, *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991), S. 245-251
- [178] GREGORIADIS, G.: *Liposome Technology* Bd. II 2. Aufl., CRC Press Inc., Boca Raton Florida (1993), S. 37-50
- [179] EINSELE, A.; FINN, R. K.; SAMHABER, W.: *Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik - Eine Einführung*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim Deerfield Beach Florida (1985)
- [180] LILLY, M. D.: The design and operation of biotransformation processes. In: VARDAR-SUKAN, F. UND SUKAN, S. S.: *Recent advances in biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London (1992), S. 47-68
- [181] Fresenius AG (Membran-, Filtrationstechnik): *Ordering Information 6/94*, St. Wendel (1994)



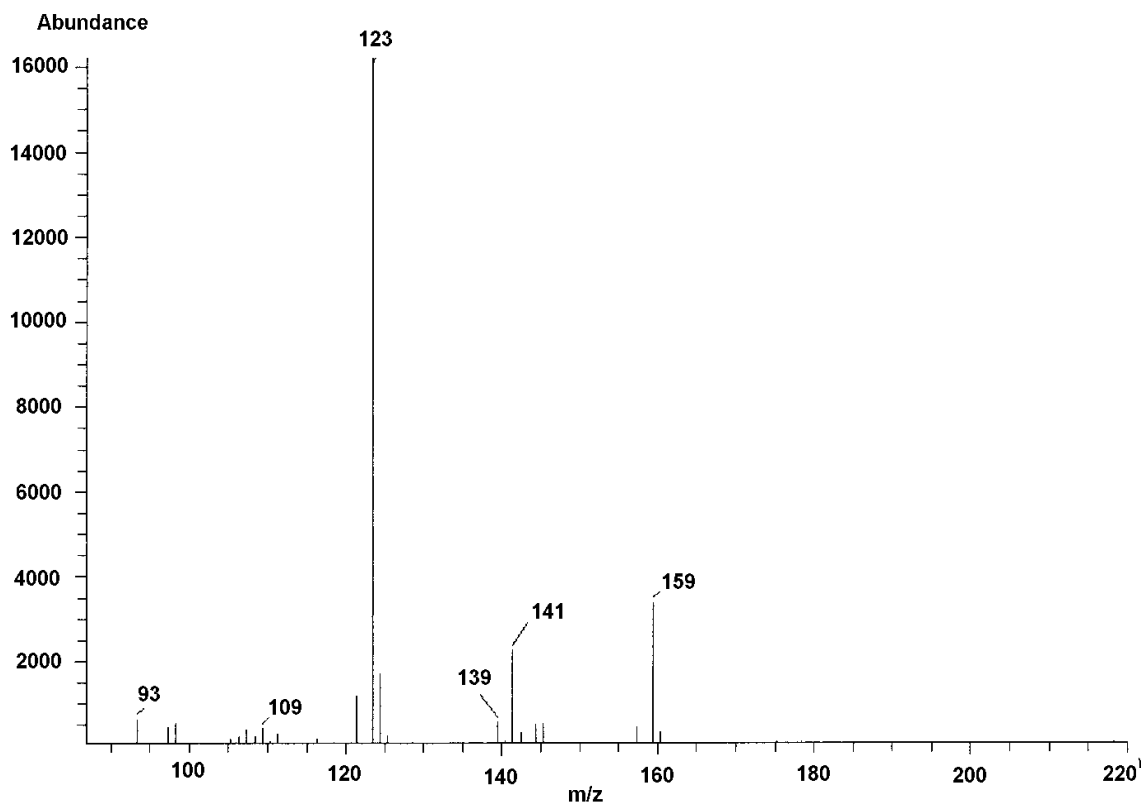
- [182] DEBUS, O.; WANNER, O.: Degradation of xylene by a biofilm growing on a gas-permeable membrane, *Wat. Sci. Tech.* 26 (1992) Nr. 3/4, S. 607-616
- [183] BRINDLE, K.; STEPHENSON, T.: The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996), S. 601-610
- [184] DOS SANTOS, L. M. FREITAS; LIVINGSTON, A. G.: Novel membrane bioreactor for detoxification of VOC wastewaters: biodegradation of 1,2-dichloroethane, *Wat. Res.* 29 (1995) Nr. 1, S. 179-194
- [185] VENKATADRI, R.; IRVINE, R. L.: Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidase in novel biofilm reactor systems: hollow fiber reactor and silicone membrane reactor, *Wat. Res.* 27 (1993) Nr. 4, S. 591-596
- [186] LILLY, M. D.; WOODLEY, J. M.: A structured approach to design and operation of biotransformation processes, *J. Ind. Microbiol.* 17 (1996) Nr. 1, S. 24-29
- [187] CHUNG, B.H.; CHANG, H.N.: Hollow fiber bioreactors with internal aeration circuits, *J. Ferment. Bioeng.* 69 (1990) Nr. 3, S. 175-177
- [188] AZIZ, C. E.; FITCH, M. W.; LINQUIST, L. K.; PRESSMAN, J. G.; GEORGIU, G.; SPEITEL, G. E.: Methanotrophic biodegradation of trichloroethylene in a hollow fiber membrane bioreactor, *Environm. Sci. & Technol.* 29 (1995), S. 2574-2583
- [189] BERG, A.-C.; HOLST, O.; MATTIASSON, B.: Continuous culture with complete cell recycle: cultivation of *Pseudomonas cepacia* ATCC 29351 on salicylate for production of salicylate hydroxylase, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) Nr. 1, S. 1-4
- [190] GOETSCHER, R.; BARENHOLZ, Y.; BAR, R.: Microbial conversions in a liposomal medium. Part 2: Cholesterol oxidation by *Rhodococcus erythropolis*, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992), S. 390-395
- [191] MILLER, R. M.; BARTHA, R.: Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes, *Appl. Environm. Microbiol.* 55 (1989) Nr. 2, S. 269-274
- [192] SALMON, P. M.; ROBERTSON, C. R.: Membrane Reactors.  
In: ASENJO, J. A.: *Bioreactor System Design*, Marcel Dekker, New York (1995), S. 305-338
- [193] BENGSTON, G.; BÖDDEKER, K. W.: Extraction of bioproducts with homogeneous membranes. *Bioflavour '95, Dijon (France) 14.-17.2.1995*, INRA, Paris (1995), S. 393-403
- [194] BOAM, A. T.; LEAK, D. J.; LIVINGSTONE, A.G.; STUCKEY, D. C.: A novel biomembrane bioreactor for continuous biotransformation. IChemE Res. Event, Univ. Edinburgh, UK, 5-6 Jan 1995 Bd. 2, IChemE Res. Event (1995), S. 902-904
- [195] MOLINARI, F.; ARAGOZZINI, F.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F.: Continuous production of isovaleraldehyde through extractive bioconversion in a hollow-fiber membrane bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology* 20 (1997) Nr. 8, S. 604-611
- [196] PATEL, J. S.; MATHUR, H. H.; BHATTACHARYYA, S. C.: Synthetic studies on roseoxide, *Ind. J. Chem.* 16B (1978), S. 188-190

- [197] BLACK, T. H.: The preparation and reactions of diazomethane, *Aldrichimica Acta* 16 (1983) Nr. 1, S. 3-10
- [198] LATZA, S.: *Aromaester aus aktivierten Vorstufen: Biogenese flüchtiger Alkylcinnamate in Früchten über 1-O-Cinnamoylglycoside*, Dissertation Universität Hannover, (1997)

## 6 Anhang



**Abb. 6-1:** Massenspektrum von 2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol (**8**)



**Abb. 6-2:** HPLC-MS-Spektrum des nicht identifizierten nichtflüchtigen Citronello-Transformationsproduktes (Peak 2 aus Abb. 2-102)

## Lebenslauf

**Name:** Jens Onken  
**Geburtsdatum:** 21.10.1968  
**Geburtsort:** Bremen  
**Familienstand:** verheiratet

### Schulausbildung

1975 bis 1979 Grundschole Bremen-Schönebeck  
1979 bis 1985 Orientierungsstufe und Gymnasium Bremen-Aumund  
1985 bis 1988 Gymnasiale Oberstufe Bremen-Lesum, Abitur

### Zivildienst

3/1988 bis 9/1989 Zivildienst in einem Wohnheim für Schwerbehinderte,  
(Haus Richardson, Bremen-Lesum)

### Studium

10/1989 bis 3/1994 Studium der Lebensmittelchemie (TU Braunschweig)  
11/1993 Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
12/1993 bis 3/1994 Wissenschaftliche Abschlußarbeit zur  
Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
(bei der Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck)  
Thema: Fluorimetrische Bestimmung reduzierender  
Zucker in Zuckerrüben

### Berufspraktisches Jahr

4/1994 bis 4/1995 berufspraktisches Jahr im Staatlichen  
Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig  
5/1995 Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

### Promotionstätigkeit

seit 5/1995 Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelchemie  
der Universität Hannover