

Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen  
Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu  
hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Bianca Brauer**

Dipl.-Biologin

geboren am 15. Mai 1975 in Oberhausen

2004

Referent:	Prof. Dr. Dr. R G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. H. -J. Jakobsen
Tag der Promotion:	05.08.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis Juli 2004 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R.G. Berger angefertigt.

**Herzlich danken** möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. R. G. Berger, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Der gewährte Freiraum bei der Bearbeitung der Aufgaben sowie stete Diskussionsbereitschaft und hervorragende Arbeitsbedingungen waren die Grundsteine dieser Dissertation.

Ebenso gilt mein Dank:

allen MitarbeiterInnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, vor allem Herrn Dr. Krings für die Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik während und am Ende dieser Forschungsarbeit.

der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die Förderung des Projekts „Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen“,

den Projektpartnern Frau Dr. Ziegler der Erich Ziegler GmbH für die Unterstützung des Projekts und Herrn Dr. J. Schrader der Dechema e.V. für die vielen Diskussionen innerhalb der halbjährigen offiziellen Treffen.

und dem Institut für Organische Chemie der Universität Hannover für die NMR-Messungen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf jede Art und Weise unterstützt und deren Zuversicht und Vertrauen mir vieles erleichtert hat.

meiner Oma

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen, *Lebensmittelchemie* (2004), im Druck

Brauer B., Krings U., Pescheck M., Schrader J., Sell D., Berger R. G.: Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen Posterpräsentation auf der Dechema-Jahrestagung Garching, 2003

Brauer B., Krings U., Pescheck M., Schrader J., Sell D., Berger R. G.: Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen, Forschungsverbund Biotechnologie, Bremen, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, 2002

## Zusammenfassung

Die selektive Biotransformation der Monoterpene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen,  $\gamma$ -Terpinen und  $\beta$ -Myrcen mit Asco- und Basidiomyceten zu aromaaktiven Zielprodukten wie Perillen, Verbenon oder  $\alpha$ -Terpineol wurde untersucht. Um einen effektiven und schonenden biotechnologischen Zugang zur Darstellung aromarelevanter Terpenoide zu eröffnen, wurden 43 Mikroorganismen in 102 Screeningexperimenten auf ihre Fähigkeit zur Monoterpentransformation untersucht. Sensorisch interessante Verbindungen zeigten zwei Isolate aus Kiwi und Salbei, *Stemphylium botryosum* und *Penicillium solitum* sowie *Pleurotus ostreatus*. So bildete der Basidiomycet *Pleurotus ostreatus* in Submerskultur aus dem acyclischen  $\beta$ -Myrcen das sensorisch bedeutende und in der Literatur bisher selten beschriebene Monoterpenfuran Perillen. Das aus Citrusfrüchten isolierte  $\alpha$ -Pinen konnte von *Penicillium solitum* mit einer Produktausbeute von  $37 \text{ mg L}^{-1}$  zu Verbenon transformiert werden. Neben den reinen Monoterpenkohlenwasserstoffen wurden auch (in der Literatur bisher noch nicht beschriebene) Terpengemische biokatalytisch umgesetzt. So wurden Limonen dominierte, komplexe Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu sensorisch ansprechenden, biotechnologisch erzeugten, "etherischen Ölen" ohne pflanzliches Vorbild, veredelt.

Der isolierte Stamm, *Penicillium solitum*, tolerierte nicht nur ein Vielfaches der Sättigungskonzentration des als antimikrobiell beschriebenen Limonens, sondern führte eine selektive Degradation des Monoterpens auch in Gegenwart eines Glucoseüberschusses durch.

Ein weiteres Isolat, der phytopathogene Deuteromycet *Stemphylium botryosum*, besaß als einziger untersuchter Organismus das biochemische Potential zur  $\gamma$ -Terpinentransformation. Das Hauptprodukt der Biokatalyse war ein bisher noch nicht charakterisierter Naturstoff mit einer etherisch, frischen Duftnote, der mit einer Produktausbeute von  $65 \text{ mg L}^{-1}$  in Submerskulturen akkumulierte. Die Struktur des neuen Naturstoffes, p-Mentha-1,4-dien-9-ol, wurde mit spektrometrischen Methoden aufgeklärt.

Schlagwörter: Aromastoffe, Biotransformationen, Terpene, Pilze, Verbenon, *Penicillium solitum*, p-Mentha-1,4-dien-9-ol, *Stemphylium botryosum*, Perillen, *Pleurotus ostreatus*

## Abstract

The selective biotransformation of the monoterpenes  $\alpha$ -/ $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene and  $\gamma$ -terpinene resulting in flavor active products of oxidation, such as perillene, verbenone and  $\alpha$ -terpineol, was investigated using asco- and basidiomycetes. To gain an effective yet mild biotechnical access to flavor relevant terpenoids, 43 microorganisms were screened for the ability to transform monoterpenes. Two organisms isolated from kiwi and sage (*Penicillium solitum* and *Stemphylium botryosum*) and *Pleurotus ostreatus* (an organism of the culture collection DSMZ), produced the most interesting flavor compounds in submerged culture. The basidiomycet *Pleurotus ostreatus*, for example, transformed in submerged culture  $\beta$ -myrcene to the sensorical important and rarely described monoterpene furan perillene.  $\alpha$ -Pinene extracted from citrus fruits, was transformed to verbenone by *Penicillium solitum* resulting in about 37 mg L<sup>-1</sup>.

Along with pure monoterpene hydrocarbons, this work describes the biocatalysis of the remaining terpene-containing byproducts. As a result, limonene dominated complex byproducts were refined to sensorially attractive "etherical oils" without herbal counterpart. The isolated strain (*Penicillium solitum*) not only tolerated the presence of a saturated solution of limonene, an antimicrobial compound, but biodegradates it selective even in the presence of an excess of glucose.

Another microorganism, the phytopathogen *Stemphylium botryosum*, was the only one surveyed possessing the biochemical potential to transform  $\gamma$ -terpinene. The main product of this biocatalysis was a natural product not yet described, with an etherical, fresh flavor, accumulated in a concentration of 65 mg L<sup>-1</sup> in submerged culture. The structure of p-mentha-1,4-diene-9-ol was elucidated using spectroscopic methods.

Key words: flavor, biotransformation, terpene, fungi, verbenone, *Penicillium solitum*, p-mentha-1,4-diene-9-ol, *Stemphylium botryosum*, *Pleurotus ostreatus*, perillene

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Geschichte der Duftstoffe .....	1
1.2	Terpene: Bedeutung und Biosynthese .....	2
1.3	Vorkommen von Monoterpenen in Pflanzen .....	3
1.4	Monoterpen-Biotransformation .....	3
1.5	Zielverbindung der Biotransformation .....	4
1.6	Problemstellung .....	6
1.7	Zielsetzung .....	6
2	Ergebnisse .....	8
2.1	Aktivitätsscreening in Submerskultivierung .....	8
2.1.1	Auswahl der Mikroorganismen .....	8
2.1.2	Validierung der SPME-Schnellmethode zur Produktanalytik .....	11
2.2	Biotransformation des Monoterpens $\alpha$ -Pinen .....	12
2.2.1	Autoxidation von $\alpha$ -Pinen .....	12
2.2.2	Pinen-Screening .....	13
2.2.3	Kulturverlauf der Mikroorganismen .....	15
2.2.4	Bildung sensorisch relevanter Aldehyde und Ketone .....	20
2.2.5	Identifizierung des Kiwiisolates .....	24
2.2.6	Transformationspotential von <i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat) .....	25
2.2.7	Teil-Zusammenfassung .....	28
2.2.8	Dosierung einer authentischen Reststofffraktion (RSF) .....	29
2.2.9	Vergleich <i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat) und <i>Penicillium solitum</i> (CBS 424,89) .....	32
2.2.10	Bilanz der Veredelung .....	36
2.2.11	Wachstum von <i>Penicillium solitum</i> auf natürlichen Substraten .....	37
2.2.12	Limonentotalkatabolismus einer exemplarischen RSF von <i>Litsea cubeba</i> .....	38
2.2.13	Glucoseabbau bei Dosierung von 30 mM Limonen .....	40
2.2.14	Glucoseabbau bei Variation der Limonendosierung .....	43
2.2.15	Quantifizierung des Limonenabbaus .....	46
2.2.16	Teil-Zusammenfassung .....	48



2.3	Biotransformation des acylischen Monoterpens $\beta$ -Myrcen zu Perillen .....	49
2.3.1	Stammscreening: Transformationsleistung ausgewählter Mikroorganismen.....	49
2.3.2	Identifizierung der Metabolite .....	49
2.3.3	Wachstumsverlauf von <i>Pleurotus ostreatus</i> bei $\beta$ -Myrcen-Supplementierung.....	52
2.3.4	Optimierungsversuche durch Emulgatorzugabe .....	53
2.3.5	Isolierung von Perillen aus <i>Perilla frutescens</i> .....	56
2.3.6	Teil-Zusammenfassung .....	57
2.4	Biotransformation von $\gamma$ -Terpinen .....	58
2.4.1	Identifizierung eines Salbeisolats .....	59
2.4.2	Biotransformation im Bioreaktor .....	66
2.4.3	Identifizierung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol.....	68
2.4.3.1	Aufreinigung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol.....	70
2.4.4	Identifizierung von 2-p-Tolyl-propan-1-ol.....	72
2.4.4.1	Aufreinigung von 2-p-Tolyl-propan-1-ol.....	73
2.4.5	Oxidation von p-Mentha-1,4-dien-9-ol.....	74
2.4.6	Nachweis von p-Mentha-1,4-dien-9-ol in etherischen Ölen .....	77
2.4.7	Biokatalyse von RSF mit industrieller Anwendung.....	83
2.4.8	Teil-Zusammenfassung .....	84
3	Diskussion .....	85
3.1	Terpenoide: Aromastoffe und Aromavorstufen .....	85
3.1.1	Natürliche Aromastoffe: Marktsituation.....	86
3.1.2	Bildungsort der Terpenoide .....	86
3.1.3	Produktion von neuen Naturstoffen .....	87
3.1.4	Rohstoffe und Marktsituation.....	87
3.1.4.1	$\alpha$ -/ $\beta$ -Pinen.....	88
3.1.4.2	Limonen .....	88
3.1.4.3	$\beta$ -Myrcen.....	88
3.1.5	Die Biotransformation von Terpenen.....	88
3.1.6	Geringe Löslichkeit von Terpenkohlenwasserstoffen.....	91
3.1.7	Flüchtigkeit der Monoterpene .....	91

3.1.8	Toxizität und Löslichkeit von Terpenen .....	92
3.1.9	Lange Inkubationszeiten.....	92
3.1.10	Enzyme .....	93
3.1.10.1	Allylische Hydroxylierung.....	94
3.1.10.2	Ringschluss und Ringöffnung.....	94
3.1.10.3	Monooxygenasen katalysieren Hydroxylierungen.....	94
3.1.11	Aktivitätsscreening: Auswahl der Organismen und Selbstisolate .....	95
3.2	Transformation von $\alpha$ -Pinen.....	97
3.2.1	<i>Penicillium solitum</i> in der Biotechnologie .....	101
3.2.1.1	Mycotoxine.....	102
3.2.2	Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen RSF durch <i>Penicillium solitum</i> .....	103
3.2.3	Limonentotalkatabolismus .....	103
3.2.3.1	Terpensupplementierung von komplexen Gemischen .....	106
3.2.3.2	Teil-Zusammenfassung .....	108
3.3	Transformation von $\beta$ -Myrcen .....	109
3.3.1	Perillen als Naturstoff.....	109
3.3.2	Biotransformation mit dem Basidiomyceten <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	110
3.3.3	Biotransformationen mit $\beta$ -Myrcen.....	114
3.4	Biotransformation mit dem Substrat $\gamma$ -Terpinen.....	116
3.4.1	Biokonversion von $\gamma$ -Terpinen bei Pflanzen .....	117
3.4.2	Biokonversion von Cymen durch Mikroorganismen .....	119
3.4.3	Biokonversion von $\gamma$ -Terpinen durch Mikroorganismen .....	119
3.4.4	<i>Stemphylium botryosum</i> in der Biotransformation.....	121
3.5	Einführung einer Oxofunktion an einen nicht aktivierten Kohlenstoff .....	124
3.5.1	p-Mentha-1,4-dien-9-ol als neuer Naturstoff .....	129
3.5.1.1	Die Disproportionierung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol .....	129
3.5.2	p-Mentha-1,4-dien-9-ol in Lebensmitteln.....	130
3.5.2.1	Dill.....	131
3.5.2.2	Tequila .....	132
3.6	Ausblick .....	134

4	Materialien und Methoden .....	136
4.1	Organismen .....	136
4.1.1	Kommerziell erhältliche Mikroorganismen .....	136
4.1.2	Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate) .....	137
4.2	Chemikalien .....	138
4.2.1	Lösungsmittel .....	141
4.2.2	Gase .....	142
4.3	Geräte und sonstige Hilfsmittel .....	142
4.4	Bioreaktor .....	144
4.5	Kultivierung von Transformationskulturen .....	144
4.5.1	Kulturmedien .....	144
4.5.2	Kultivierungsbedingungen .....	144
4.5.3	SNL-Agar .....	145
4.6	Kulturführung .....	145
4.6.1	Stammkultivierung .....	145
4.6.2	Gefrierkulturen von Ascomyceten .....	145
4.6.3	Homogenisieren von Kulturen .....	145
4.6.4	Vorkulturen .....	146
4.6.5	Experimentalkulturen .....	146
4.6.6	Kultivierung mit Monoterpenen .....	146
4.6.7	Kultivierung im Bioreaktor .....	146
4.7	Dosierung von Transformationssubstraten .....	147
4.7.1	Blindwerte .....	147
4.8	Analytik und Probenahmeverfahren .....	147
4.8.1	Probenahme bei Transformationsversuchen .....	147
4.8.2	Probenahme bei Optimierungsversuchen .....	147
4.8.3	Probenahme aus dem Bioreaktor .....	147
4.8.4	Untersuchung der Bioreaktor-Abluft .....	148
4.9	Bestimmung von Kulturparametern .....	148
4.9.1	Bestimmung der Zellmasse .....	148
4.9.2	Glucosegehalt .....	148

4.9.3	Bestimmung des pH-Wertes.....	149
4.10	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie .....	149
4.10.1	Extraktion von Kulturüberständen .....	149
4.10.2	SPME-Extraktion.....	149
4.10.3	Aromaextraktion von Früchten und Gewürzen .....	150
4.10.4	Kontinuierliche Extraktion .....	150
4.10.5	Soxhlet-Extraktion.....	150
4.11	Chromatographie.....	150
4.11.1	Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen .....	150
4.11.2	Silylierung für die Gaschromatographie .....	151
4.12	Chromatographie.....	151
4.13	Berechnung von Kovats-Indizes .....	153
4.14	UV/VIS-Spektroskopie.....	153
4.15	NMR-Spektroskopie .....	153
4.16	Entsorgungshinweise .....	154
5	Literatur.....	155
6	Anhang .....	173

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BW	Blindwert
C	Konzentration
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriochloroform
CoA	Coenzym A
COSY	Correlation Spectroscopy, zweidimensionale <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-NMR
CW	Carbowax
DB	Divinylbenzen
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
ee	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
GPP	Geranylpyrophosphat
IPP	Isopentenylidiphosphat
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KI	Kovats Index
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
M <sup>+</sup>	Molekülion
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n.n.	nicht nachweisbar
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPP	Nerylpyrophosphat
RIC	Request Ion Count (Gesamtionenstrom)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Retentionszeit
SNL	Standardnährlösung (Medium)
SPME	Solid phase micro extraction
ST	Standard
TDS	Thermodesorption

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Geschichte der Duftstoffe

Die Verwendung von Duftstoffen ist dem Menschen von alters her bekannt. Aus archäologischen Funden lässt sich rekonstruieren, dass schon in der Steinzeit, vermutlich bei sakralen Handlungen, wohlriechende Hölzer und Harze verbrannt wurden, um das Wohlgefallen der Götter zu erreichen. Die ersten verlässlichen Mitteilungen über den Gebrauch von Duftstoffpflanzen stammen aus Ägypten und dem Zweistromland (Babylon). Für die Archäologen war es besonders überraschend, dass die verhältnismäßig schwierige Technik der Destillation schon im dritten Jahrtausend v. Chr. in Persien zur Isolierung von Duftstoffen benutzt wurde. Zunächst konnte niemand erklären, wozu die merkwürdig geformten Gefäße, Rohre und Rinnen, die als Funde in einem persischen Museum aufbewahrt wurden, verwendet wurden. Erst ein Archäologe mit chemisch-technischen Kenntnissen stellte fest, dass es sich hierbei um sehr frühe, aber durchaus funktionsfähige Destillationsapparaturen handelte.

Um 1000 n. Chr. wurde dann die für die Herstellung moderner Duftstoffe besonders wichtige Technik der Destillation von den Arabern wiederentdeckt und von diesem Zeitpunkt an ständig verfeinert. Abbildung 1 zeigt die einzelnen Schritte der Herstellung des Lirionöls im alten Ägypten. Das Relief befindet sich im Louvre und wird der 26. Dynastie (664 bis 525 v. Chr.) zugeordnet (Roth et al. 1996).

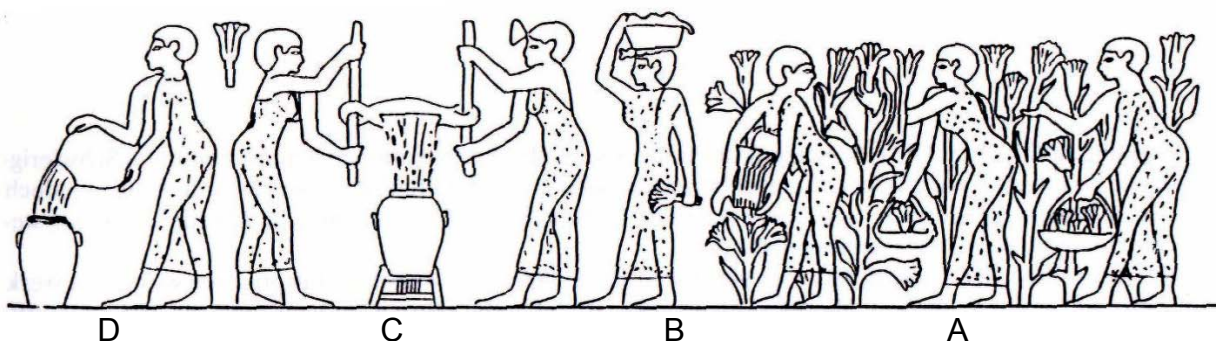


Abb. 1-1 Liriongewinnung, ägyptische Reliefdarstellung um 600 v. Chr. **A** Frauen, die Blumen (Lilien) abschneiden; **B** eine Frau transportiert einen Korb mit geernteten Lilien auf dem Kopf **C** zwei Frauen wringen mit Hilfe zweier Holzstäbe ein Leinentuch, in das die Lilien eingewickelt sind, sodass der Saft der Lilien in ein größeres Gefäß fließen kann; **D** eine Frau gießt diesen Saft in ein Vorratsgefäß (Roth et al. 1996).

## 1.2 Terpene: Bedeutung und Biosynthese

Der Begriff Terpenen stammt von dem Stoff Terpentin ab, welcher als „Kiefernharz“ bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um den zähflüssigen Balsam, welcher beim Verletzen aus Borke und dem jungen Holz verschiedener Kiefern (*Pinaceae*) aus den Harzkanälen fließt. Traditionell versteht man unter Terpenen Naturstoffe überwiegend pflanzlicher Herkunft, die durchweg aus Isopren-Untereinheiten aufgebaut sind (Breitmaier et al. 1999). Diese Verbindungen sind meist nicht wasserlöslich und werden aus Acetyl-CoA oder durch Zwischenprodukte der Glykolyse synthetisiert. Diese Synthese aus Primärmetaboliten erfolgt auf mindestens zwei Arten. In dem gut untersuchten Acetat-Mevalonat-Weg werden drei Moleküle Acetyl-CoA schrittweise zu Mevalonsäure zusammengefügt. Diese Schlüsselverbindung mit sechs Kohlenstoffatomen wird durch Phosphorylierung, Decarboxylierung und Dehydrierung zum aktivierten C<sub>5</sub>-Baustein Isopentenylpyrophosphat (IPP) umgesetzt. Vor kurzem wurde entdeckt, dass in Chloroplasten und Plastiden IPP in einem anderen Stoffwechselweg aus Zwischenverbindungen der Glykolyse oder des photosynthetischen Calvin-Zyklus gebildet werden kann (Hirai et al. 2000, Lichtenthaler et al. 1997, Rohdich et al. 2002). Wenn auch noch nicht alle Details geklärt sind, scheint 3-Phosphoglycerat mit einem aus Pyruvat stammenden C<sub>2</sub>-Körper eine Zwischenverbindung einzugehen, die anschließend zu IPP umgewandelt wird.

Einige biologische und ökochemische Funktionen der Terpene sind bereits gut erforscht. So fungieren Terpene zum Beispiel als Lockstoffe, Fraßschutzstoffe (Turlings et al. 1998, Rhoades 1979) oder auch als Signalstoffe und Wachstumsregulatoren in Form von Phytohormonen. Als Reaktion auf einen Borkenkäferbefall reagieren die Koniferen mit einer verstärkten Produktion von Monoterpenen wie  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Limonen und  $\beta$ -Myrcen (Gershenzon et al. 1991). Manchmal jedoch werden diese spezialisierten Tiere von Monoterpenen sogar angezogen, anstatt vertrieben zu werden. So hat zum Beispiel der Borkenkäfer (*Ips pini* S.) die Fähigkeit entwickelt, die Hauptmonoterpene ( $\beta$ -Myrcen) bestimmter Koniferenarten zu verstoffwechseln und entwickelte sich somit zu einem Nahrungsspezialisten für diese Monoterpene (Byers 1982). Die Anlockung erfolgt durch einige Stoffwechselprodukte ihres eigenen Terpen-Entgiftungssystems. Durch die flüchtigen Monoterpene der Koniferen sind die Käfer in der Lage ihre Wirtsbäume zu finden (Byers 1989,

Martin et al. 2003). Darüberhinaus dienen Terpene als Pheromone zum Beispiel zur Warnung (Alarmpheromone), zur Markierung von Nahrungsquellen und Versammlungsplätzen (Aggregationpheromone) oder zur Paarung (Sexualpheromone) (Seibold et al. 2000).

### 1.3 Vorkommen von Monoterpenen in Pflanzen

Terpene, die aus Isopreneinheiten ( $C_5$ ) aufgebauten Kohlenwasserstoffe, sind die größte Klasse der sekundären Pflanzenstoffe (Harborn 1991). Sie sind in der Natur weit verbreitet, und es sind bereits über 30 000 verschiedene, natürlich vorkommende Terpene identifiziert worden (Buckingham 1998). Nach der Anzahl der Isopreneinheiten unterscheidet man Monoterpene ( $C_{10}$ ), Sesquiterpene ( $C_{15}$ ), Diterpene ( $C_{20}$ ), Sesterterpene ( $C_{25}$ ), Triterpene ( $C_{30}$ ), Tetraterpene ( $C_{40}$ ) und Polyterpene. Von der Gruppe der Triterpene leiten sich die Steroide ab.

### 1.4 Monoterpen-Biotransformation

Unter einer Biotransformation versteht man nach dem Vorschlag der IUPAC die chemische Umwandlung von definierten Ausgangsverbindungen durch Biokatalysatoren wie Mikroorganismen oder deren Enzyme. Ungeachtet einiger Probleme (siehe 3.1) steht die Monoterpenbiotransformation mittels biotechnologischer Verfahren in großem Interesse der Nahrungsmittel- und Parfumindustrie.

Biotransformationen sind chemische Reaktionen, die jedoch von Biokatalysatoren ermöglicht werden und sind aufgrund folgender Eigenschaften der chemisch-katalysierten Reaktion überlegen:

- **Regiospezifität:** Es wird nur eine bestimmte Position angegriffen, auch wenn mehrere äquivalente Funktionen am Substratmolekül vorliegen.
- **Stereospezifität:** In einem racemischen Gemisch wird bevorzugt oder ausschließlich eines der Enantiomere transformiert.
- **Reaktionsbedingungen:** Enzymatische Reaktionen führen durch milde Umsetzungsbedingungen nicht zur Zersetzung empfindlicher Substrate.

Auch die Kombination von mehreren Reaktionsschritten ist möglich, entweder mit Hilfe der Biokatalyse durch den Einsatz eines Organismus mit geeigneten Enzym-Systemen oder durch die stufenweise Umsetzung mit verschiedenen

---



Mikroorganismen. Ferner sind die Reaktionen per Biotransformation umweltfreundlicher als chemisch durchgeführte, da vorwiegend in wässrigem Milieu gearbeitet wird. Bei den wichtigsten Reaktionen der mikrobiellen Stoffumwandlungen handelt es sich um Oxidationen, Reduktionen, Hydrolysen, Kondensationen, Isomerisierungen sowie die Bildung neuer C-C-Bindungen.

## 1.5 Zielverbindung der Biotransformation

Als Zielprodukte der Biotransformation wurden in dieser Arbeit wichtige Schlüsselkomponenten wie Verbenon, Myrtenol,  $\alpha$ -Terpineol und Perillen untersucht.

Verbenon wird fast ausschließlich aus Rosmarin, Eukalyptus, Kiefern und der namensgebenden Pflanze, der Verbene (*Verbena triphylla* L.) isoliert. Es ist ein zyklisches Terpenketon und besitzt einen charakteristischen campherartigen oder pfefferminzähnlichen Geruch. Verbenon wird durch Wasserdampfdestillation aus den Blättern von *Verbena aetheroleum* extrahiert. Diese Pflanze ist ursprünglich in Chile, Peru, Argentinien ansässig, wird jedoch heute in großem Maßstab in Frankreich kultiviert. Verwendung findet das Öl hauptsächlich in der Parfüm- und Kosmetikindustrie. Der aktuelle Marktpreis für Verbenon beträgt ca. 3000 \$ kg<sup>-1</sup> (Agarwal et al. 2000).

Myrtenol, einer der maßgebenden Geruchseindrücke aus der Myrte (*Myrtus communis*), trägt eine campherartigen Note.

Ein wichtiger Bestandteil des Bulgarischen Rosenöls ist neben Rosenfuran das formal vom  $\beta$ -Myrcen stammende Perillen. Diesem Aromastoff wird ein narkotisch-würziger Geruch nach exotischen Blüten zugesprochen (Breitmeier 1999, Khadzhieva et al. 1978, Misra et al. 1987).

Am Fuße der Balkangebirge in Zentralbulgarien, einem der größten Anbauggebiete der legendären Bulgarischen Rose (*Rosa damascena* Mill.) wird das Rosenöl nach einem besonderen Qualitätsstandard produziert. Der hohe Preis von 10 000 \$ kg<sup>-1</sup> wird erklärlich, wenn man den Arbeitsaufwand zur Produktion dieser Öle berücksichtigt. So werden zur Gewinnung 1 kg des feinsten Bulgarischen Rosenöls durch Wasserdampfdestillation 3 bis 4 Tonnen der Blüten benötigt, für deren Pflückung durchschnittlich 800 Arbeitsstunden notwendig sind (Ohloff 1994). Diese Rosenernte ist jedoch auf 30 Tage im Mai und Juni beschränkt. Auch die Tageszeit der Ernte ist von besonderer Bedeutung, da die

---

Blüten 50% ihrer sensorisch wirksamen Verbindungen über den Tag verlieren. Die namensgebende Pflanze (*Perilla frutescens*) ist hauptsächlich in China ansässig und wird dort auch flächendeckend kultiviert. Dieses einjährige Kraut besitzt einen Gehalt an etherischen Ölen von 0,20 bis 0,26%. Beschrieben wurde es als weitverbreitete Naturdroge, die in der Volksmedizin vielfältige Anwendung findet (Liu et al. 2000). So wird sie unter anderem zur Heilung von Erkältungskrankheiten verwendet (Brenner 1993, Duke 1985, Guenther 1949).

Das an den Geruch von Flieder erinnernde  $\alpha$ -Terpineol ist das Zielprodukt der Limonentransformation und eine der meistverwendeten Duftkomponenten der Kosmetikindustrie.

Die angesprochenen, hochwertigen Aromastoffe sollten biotechnologisch hergestellt werden. Eine Zusammenfassung der Zielverbindungen ist anhand der Strukturformeln in Abbildung 1-2 dargestellt.

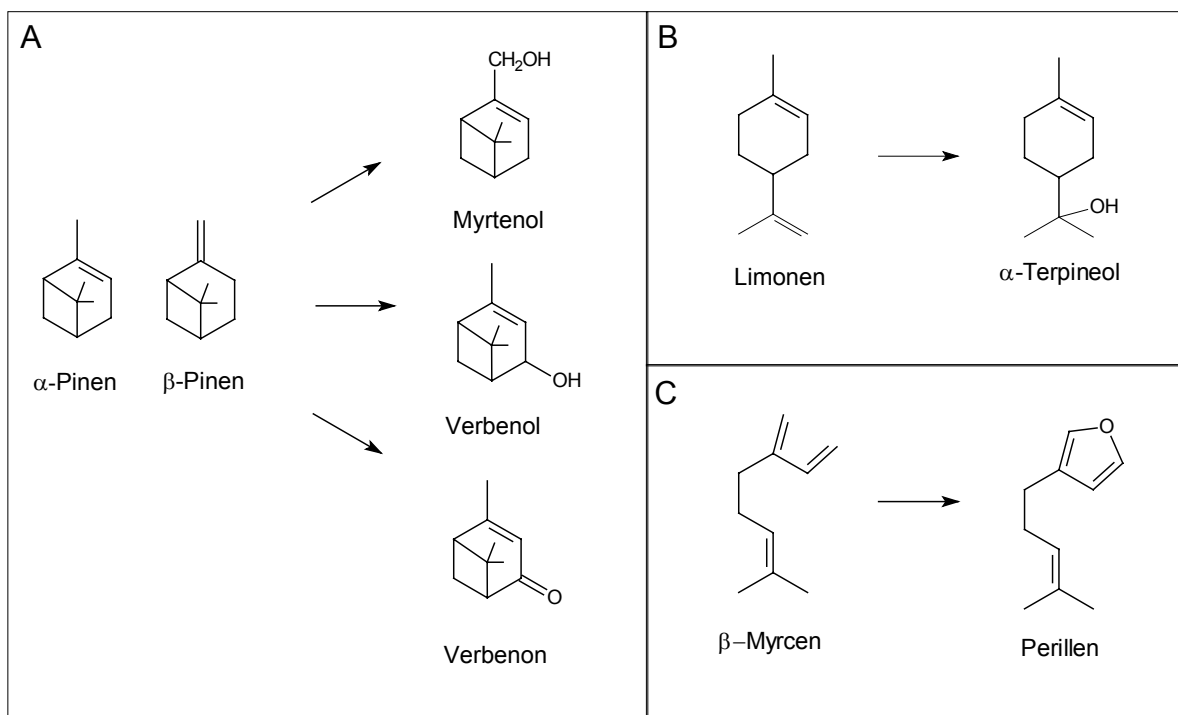


Abb. 1-2 Zielverbindungen der Biotransformation

## 1.6 Problemstellung

Traditionell werden natürliche Monoterpene hauptsächlich aufwendig und kostenintensiv mittels Extraktion aus aromahaltigen Pflanzenmaterialien isoliert. Die Verfügbarkeit aus natürlichen Quellen ist saisonalen Schwankungen unterworfen und der Anbau der entsprechenden Pflanzen zumeist geographisch begrenzt. Dies steht im Gegensatz zum wachsenden Interesse des Verbrauchers an natürlichen Aromen. Wäre es möglich, biotechnologische Wege zur Veredelung von terpenhaltigen Fraktionen zu etablieren, könnten Synergieeffekte zwischen ökologischer Entlastung und innovativer Aromaproduktion eröffnet werden. Die aromastoffproduzierende Industrie ist in diesem Zusammenhang an der Erschließung neuer Vermarktungswege interessiert. Von besonderer Bedeutung für die Forschung ist neben dem rein wissenschaftlichen Interesse die Identifizierung neuer aromarelevanter Verbindungen. Ferner haben die angestrebten Enzymreaktionen von z.B. Oxidoreduktasen und Hydrolasen ein breites Produktspektrum, sodass eine Biokatalyse für die Synthese einer breiten Produktpalette herangezogen werden kann.

## 1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biotechnologischen Produktion von Aromastoffen aus reinen Terpenkohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen. Im Vordergrund dabei stand das Auffinden des biochemischen Potentials durch ein breit angelegtes Organismenscreening (Abb. 1-3). Von herausragender Bedeutung für die Auswahl der Mikroorganismen war die Fähigkeit zur Biotransformation sowie ein hohes Maß an Terpentoleranz. Für den mikrobiologischen Prozess standen die Ausbeuten an oxofunktionalisierten Terpenkohlenwasserstoffen, das Spektrum der gebildeten Produkte und die Analyse der biochemischen Eigenschaften der terpenabbauenden Mikroorganismen im Vordergrund des Interesses.

Da die Terpenkohlenwasserstoffe der citrusverarbeitenden Industrie zumeist nicht als Reinstoffe sondern als Gemische mit definierter Zusammensetzung anfallen, und derartige Terpengemische nur eingeschränkt sensorisch verwertbar sind, bieten sie die Möglichkeit, als Substrat für eine Biotransformation eingesetzt zu werden.

---

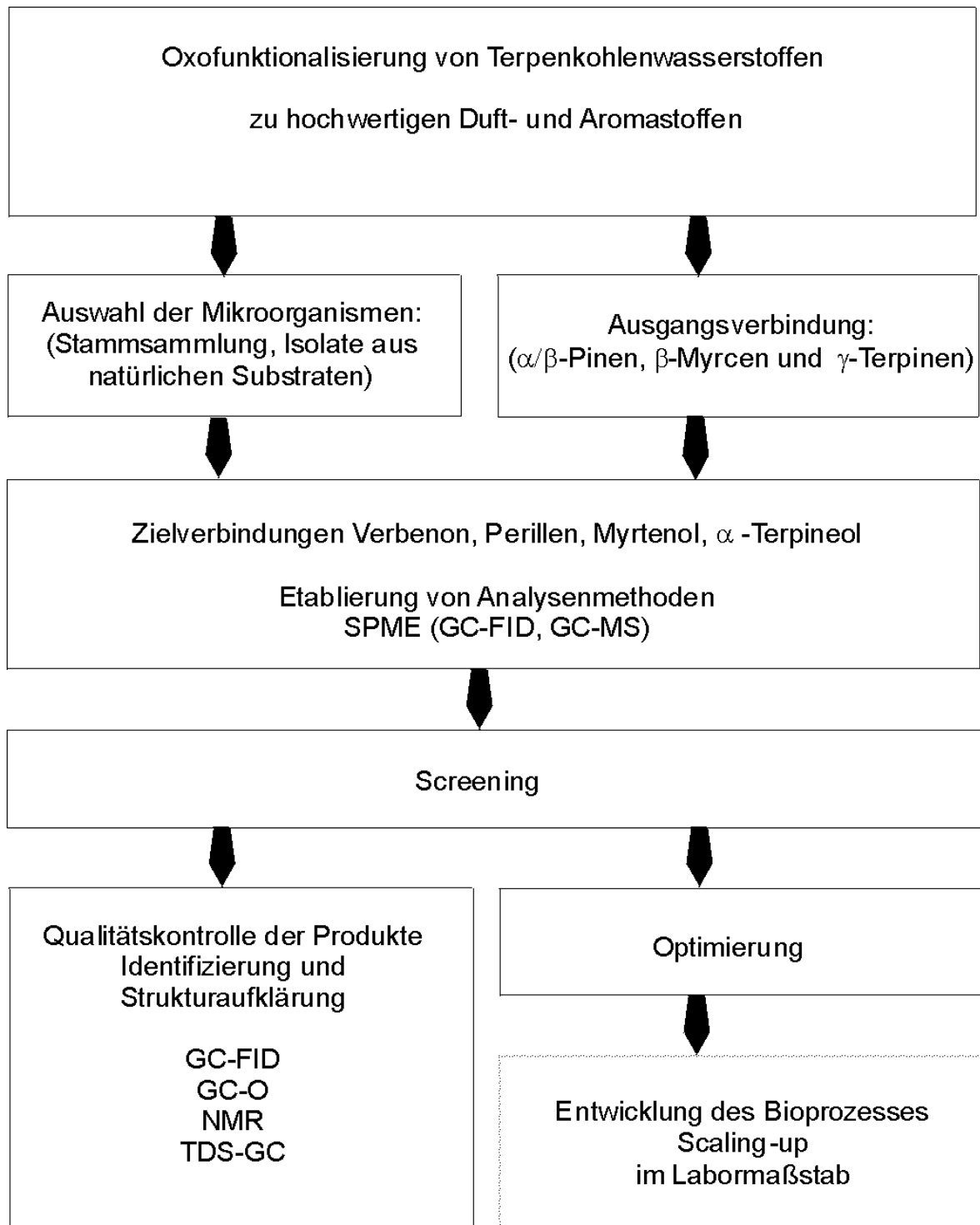


Abb. 1-3 Strategie für die Entwicklung eines terpenttransformierenden Bioprozesses

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Aktivitätsscreening in Submerskultivierung

Alle untersuchten Stämme wurden von Agarplatten in flüssiges Standard-Nähr-Medien (SNL) überführt. In Experimentalkulturen erfolgte nach 24 stündiger Anwuchszeit die Substratzugabe ( $t_0$ ). Als chemischer Blindwert diente unbeimpftes, mit Terpen versetztes SNL-Medium des gleichen Volumens. Ferner wurde bei jedem Experiment ein beimpfter Kolben ohne Terpensupplementierung als biologischer Blindwert mitgeführt. Die Probenahme erfolgte außer bei den Bakterien und Hefen, die täglich untersucht wurden, in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit am 1., 3., 5., 7., 9. und 12. Tag.

#### 2.1.1 Auswahl der Mikroorganismen

Unter der Vielzahl der kommerziell erhältlichen und ubiquitär vorkommenden Pilzkulturen wurden Stämme ausgewählt, die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllten:

- Der Stamm ist für die Degradation von Terpenen bekannt.
- Der Stamm ist zur Transformation von Terpenen befähigt.
- Der Stamm ist aus einem terpenreichen Habitat isoliert worden.
- Der Stamm besitzt aufgrund seiner lignolytischen Aktivität ein breites Spektrum an oxidierenden Exoenzymen.

Eine Zusammenfassung der im Screening verwendeten Mikroorganismen ist in Tabelle 2-1 dargestellt.

---

Tab. 2-1 Mikroorganismen

<b>Organismus</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Literatur</b>
		Biotransformation, Biodegradation, Isolierung aus terpenhaltiger Matrix
<i>Armillaria mellea</i>	CBS 100,12	(Abraham et al. 1994, Draczynska 1987)
<i>Aspergillus niger</i>	DSMZ 821	(Bhattacharyya et al. 1960, Doelger et al. 1934, Demyttenaere et al. 2001 a, Kieslich et al. 1986)
<i>Aspergillus niger</i>	DSMZ 737	(Agrawal et al. 2000, Demyttenaere et al. 2000)
<i>Botrytis cinerea</i>	DSMZ 877	(Kieslich et al. 1986, Bock et al. 1986)
<i>Chaetomium globosum</i>	DSMZ 1962	(Abraham et al. 1987, Kieslich et al. 1986)
<i>Clitocybe illudens</i>	DSMZ 73398	(Hanson et al. 1976)
<i>Clitocybe lignatilis</i>	CLICB-1-2	(Nair et al. 1969, Nair et al. 1973, Sprecher et al. 1985)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	CEC 1905	(Hanson et al. 2002)
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS 250,61	(Abraham et al. 1994, Busmann et al. 1994 a)
Isolat aus Acerola ( <i>Malpighi glabra</i> L.)	FEA	(Pinheiro 2004)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS 2359	(Drawert et al. 1978, King et al. 2000)
<i>Lepista irina</i>	CBS 458,79	(Abraham et al. 1991)
<i>Penicillium citrinum</i>	DSMZ 1179	(Ahles et al. 1976, Wood 1969)
<i>Penicillium digitatum</i>	DSMZ 2746	(Adams et al. 2003, Ariza et al. 2002, Bowen 1975, Demyttenaere et al. 2000, Wolken et al. 2002)
<i>Penicillium italicum</i>	DSMZ 2755	(Bowen 1975, Scott et al. 1974, Demyttenaere et al. 1996)
<i>Penicillium solitum</i>	CBS 424,89	(diese Arbeit)
<i>Pleurotus euos</i>	DSMZ 5331	(Busmann et al. 1994 a, Drawert et al. 1983 a, Drawert et al. 1983 b)
<i>Pleurotus eryngii</i>	DSMZ 323,49	(Varela et al. 2001)
<i>Pleurotus flabellatus</i>	CBS 66585	(Busmann et al. 1994 a, Zervakis et al. 1994)
<i>Pleurotus lampas</i>	CBS 323,48	(diese Arbeit)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DSMZ 1020	(Blaich et al. 1975, Kofujita et al. 1991, Wojtas-Wasilewska et al. 1980)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	DSMZ 5339	(Bano et al. 1993, Busmann et al. 1994 a, Kannan et al. 1990, Reddy et al. 2000)

Tab. 2-1 Mikroorganismen (Fortsetzung)

<b>Organismus</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Literatur</b>
		Biotransformation, Biodegradation, Isolierung aus terpenhaltiger Matrix
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266	(Busmann et al. 1994 a, Onken et al. 1999)
<i>Rhodococcus sp.</i>	DSMZ 43287	(Duetz et al. 2001)
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSMZ 43205	(Deutz et al. 2001 )
<i>Stemphylium botryosum</i>	DSMZ 62928	(diese Arbeit)
<i>Thelebolus caninus</i>	CBS 710,69	(Veddeler et al. 2003)
<i>Trametes suaveolens</i>	DSMZ 5237	(Birkinshaw et al. 1944)
<i>Trametes versicolor</i>	EIK 39	(Cho et al. 2001, Archibald et al. 1997, Birkinshaw et al. 1944)
<i>Wolfiporia cocos</i>	CBS 279,55	(Machuca et al. 2001)

Neben den kommerziell erhältlichen Kulturen wurden gezielt Organismen isoliert, die in der Lage waren, auf terpenhaltigen Substraten zu wachsen. Außer den Kulturen aus den gängigen Stammsammlungen wurden Isolate aus Gewürzen und tropischen Früchten kultiviert und untersucht. Eine Zusammenfassung der im Verlauf dieser Arbeit isolierten Organismen ist in Tabelle 2-2 dargestellt.

Tab. 2-2 Mikroorganismen isoliert aus Früchten und Gewürzen

<b>Organismus</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Literatur</b>
		Isolierung aus terpenhaltiger Matrix
Isolat aus Citrus 1 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 1	(Diese Arbeit)
Isolat aus Citrus 2 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 2	(Diese Arbeit)
Isolat aus Citrus 3 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 2	(Diese Arbeit)
Isolat aus Citrus 4 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 2	(Diese Arbeit)
Isolat aus Citrus 5 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 5	(Diese Arbeit)
Isolat aus Citrus 6 ( <i>Citrus sp.</i> )	LCI 6	(Diese Arbeit)
Isolat aus Grapefrucht ( <i>Citrus paradisi</i> )	LCI 7	(Diese Arbeit)
Isolat aus Ingwer ( <i>Zingiber officinale</i> R.)	LCI 8	(Nigam et al. 1964, de Pooter et al. 1985, diese Arbeit)
Isolat aus Kiwi ( <i>Actinidia chinensis</i> P.)	LCI9	(Takeoka et al. 1986 a, Takeoka et al. 1986 b, diese Arbeit)
Isolat aus Pfeffer ( <i>Piper nigrum</i> L.)	LCI 10	(Ikeda et al. 1962, diese Arbeit)
Isolat aus Physalis ( <i>Physalis peruviana</i> )	LCI 11	(Diese Arbeit)
Isolat aus Salbei ( <i>Salvia officinale</i> L.)	LCI 12	(Rhyu 1979, diese Arbeit)
Isolat aus Walnuss ( <i>Juglans regia</i> L.)	LCI 13	(Clark et al. 1976 und 1977, diese Arbeit)
Isolat aus Zitrone ( <i>Citrus limon</i> )	LCI 14	(Ziegler et al. 1998, diese Arbeit)

### 2.1.2 Validierung der SPME-Schnellmethode zur Produktanalytik

Zur Charakterisierung der Produktbildung war ein System zur schnellen und zuverlässigen Messung während des Screenings notwendig. Die in den Screening-Versuchen eingesetzten Solid Phase Micro Extraction (SPME) wurde durch kontinuierliche Flüssig/Flüssig-Extraktion als Referenzmethode validiert. Der eingesetzte Interne Standard (Campher  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) konnte bei beiden Methoden zu 98% aus nicht beimpften SNL-Kulturmedium wiedergefunden werden.

Die Referenzmethode versagte mit einer Wiederfindung von 52%, bei Emulsionen. Im Gegensatz dazu trat bei SPME keine Emulsionsbildung auf.



## 2.2 Biotransformation des Monoterpens $\alpha$ -Pinen

### 2.2.1 Autoxidation von $\alpha$ -Pinen

Als ungesättigte Verbindungen sind die bicyclischen Pinene empfindlich gegen Wärme und Luftsauerstoff. Darüber hinaus können Medienbestandteile wie Übergangsmetallkationen autoxidative Prozesse fördern (Bhattacharyya et al. 1960, Moore et al. 1956 a und b). Da Verbenol als Autoxidationsprodukt in wässrigen Medien bekannt ist, wurde bei jedem Experiment mit parallel geführten Blindversuchen geprüft, in welchem Maßstab unter den eigenen Bedingungen mit einer Autoxidation zu rechnen war. Hierzu wurde nicht beimpftes (SNL) Medium an verschiedenen Tagen extraktiv aufgearbeitet und chromatographisch untersucht. Die Autoxidation von  $\alpha$ -Pinen zu Verbenol bzw. Verbenon verlief langsam und erreichte eine Konzentration von  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$  bzw.  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  nach vier Tagen (Abb. 2-1). Die Autoxidation von  $\alpha$ -Pinen zu weiteren Oxidationsprodukten wie Myrtenol war marginal ( $<2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

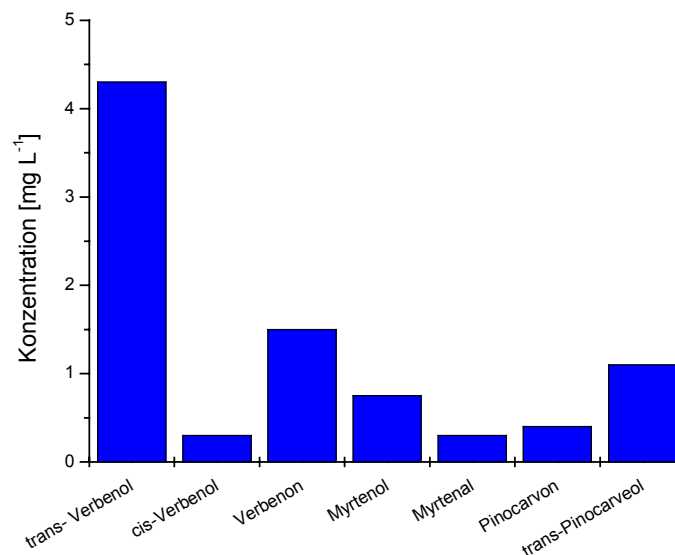


Abb. 2-1 Autoxidationsprodukte von  $\alpha$ -Pinen

Der auf diese Weise ermittelte chemische Blindwert kann nur als grober Anhaltspunkt dienen. Die Oxofunktionalisierung von  $\alpha$ -Pinen zu Verbenon ist literaturgängig (Agrawal et al. 2000, Bhattacharyya et al. 1960, Schrader et al. 2001).

### 2.2.2 Pinen-Screening

Zur Identifizierung der Transformationsprodukte, die über den gesamten Kulturverlauf gebildet wurden, wurde je Probenahmetag eine Kultur (400 mL) vollständig extraktiv aufgearbeitet. Es konnten unter anderem (Abb. 2-8) folgende Transformationsprodukte identifiziert werden (Abb. 2-2).

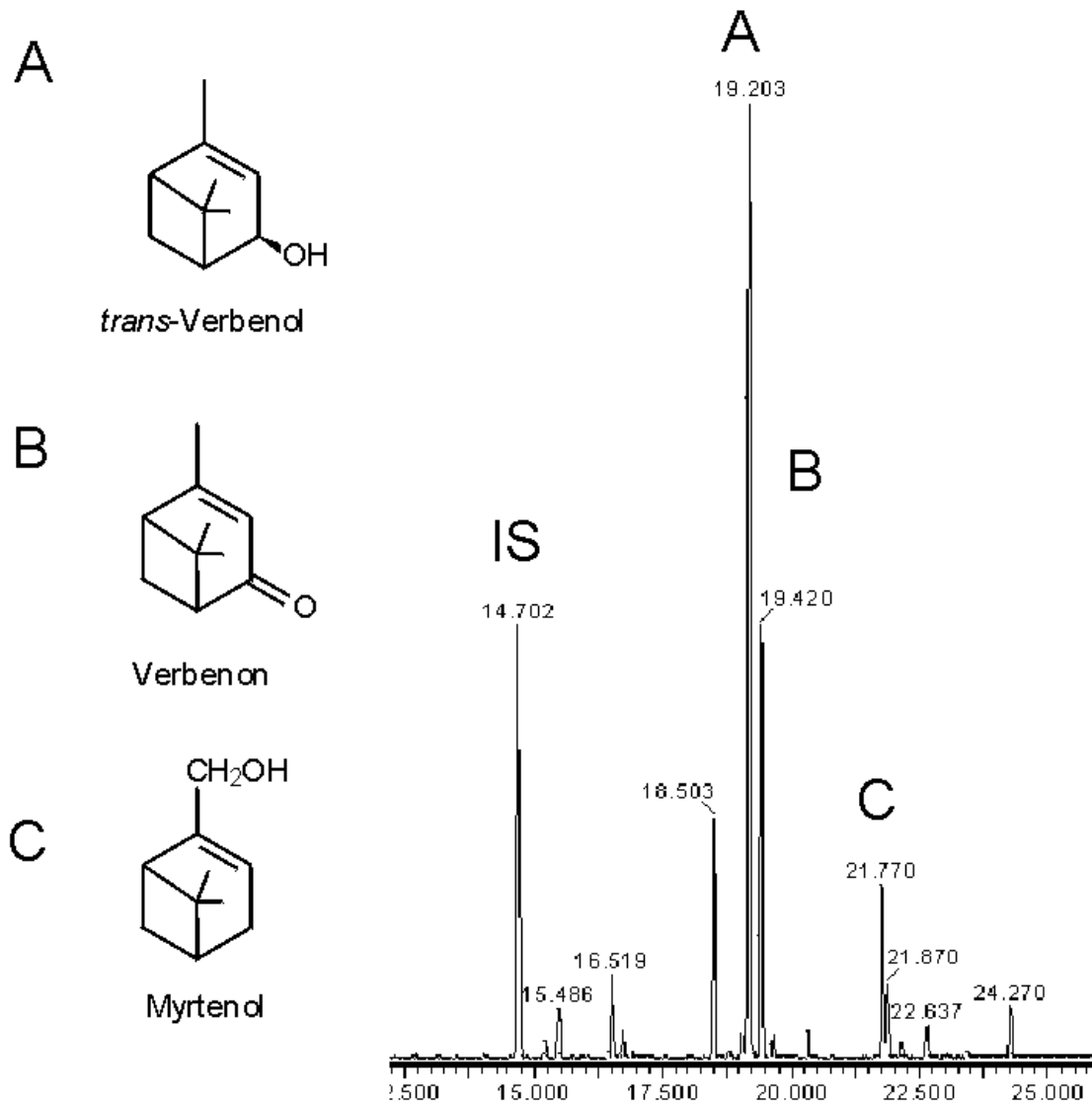


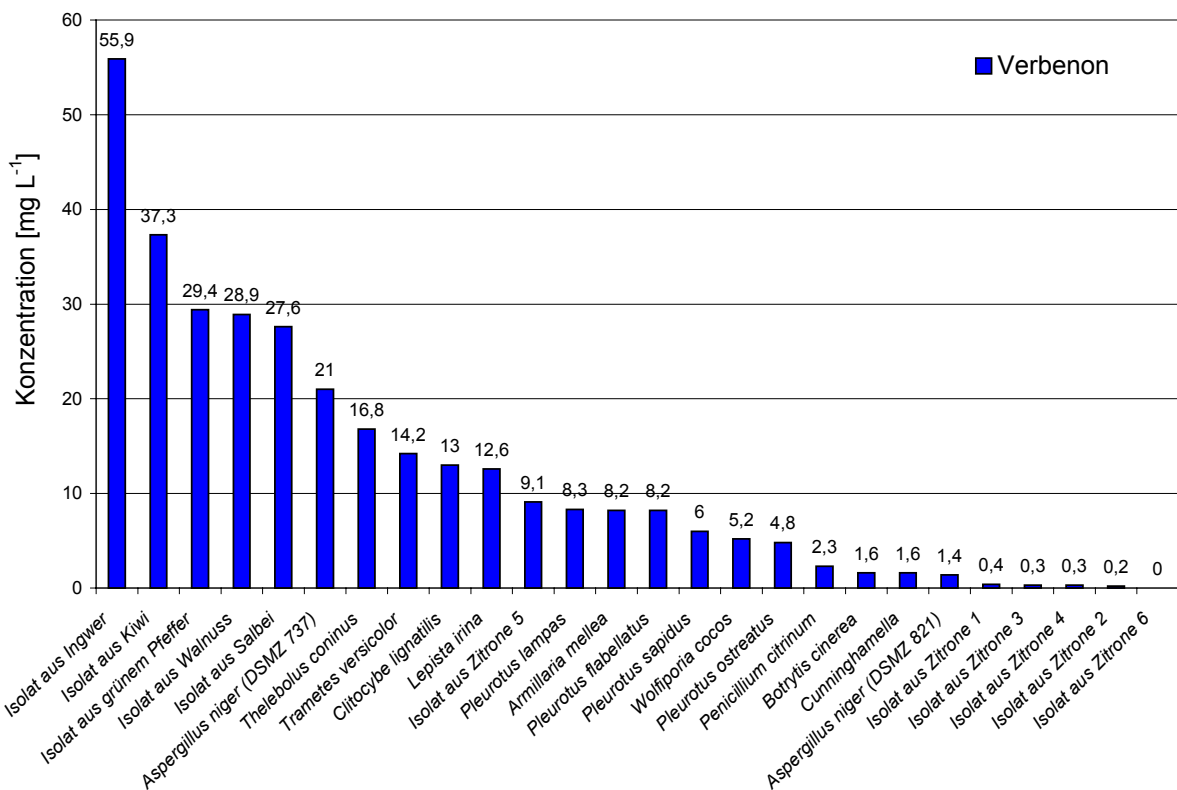
Abb. 2-2 Transformationsprofil bei  $\alpha$ -Pinen Dosierung, GC-Chromatogramm der flüchtigen Monoterpene aus der Biotransformation von *Penicillium solitum* (Eigenisolat)

Die flüchtigen Metabolite wurden gaschromatographisch und massenspektrometrisch über den Vergleich mit Referenzspektren sowie authentischen Standards anhand von Retentionszeiten (RI) und Massenspektren, wie in der folgenden Tabelle 2-3 dargestellt, identifiziert.

Tab. 2-3 Kovats Index von Referenz- und Experimentaldaten der Zielverbindungen

Verbindung	RI Authentischer Standard	RI Probe
<i>trans</i> -Verbenol	1577	1582
Verbenon	1601	1591
Myrtenol	1676	1666
Campher	1448	1443

Verbenon war die angestrebte Zielverbindung der  $\alpha$ -Pinen-Transformation. Daher wurden alle eingesetzten Organismen anhand ihrer Fähigkeit,  $\alpha$ -Pinen zu Verbenon zu transformieren, beurteilt (Abb. 2-3).

Abb. 2-3 Maximale Transformationsleistung aus Screeningexperimenten bei  $\alpha$ -Pinen Dosierung

Mit den Organismen aus gängigen Kultursammlungen wurden nur geringe Produktausbeuten erzielt. Häufig konnte zudem eine fehlende Terpentoleranz beobachtet werden. Um diese Problematik zu umgehen, wurden gezielt Organismen isoliert, die bereits augenscheinlich in der Lage waren, auf terpenhaltigen Substraten zu wachsen. So wurden mikrobiologisch bewachsene

tropische Früchten (Citrusfrüchte und Acerola aus Brasilien) und terpenhaltige Gewürze (wie z. B. Salbei) gesammelt und deren Mikroflora in Reinkultur gebracht (4.1.2). Fünf der Eigenisolate zeigten die höchste Transformationsleistung aller untersuchten Stämme bezüglich der Verbenonbildung. Die Isolate der Citrusfrüchte wiesen die höchste Biodegradationsraten für  $\alpha$ -Pinen auf, zeigten jedoch nur geringe Produktkonzentrationen (Tab. 2-2, Abb. 2-3). Neben der Beurteilung der Produktbildung und maximale Produktakkumulation waren auch einfache Kulturführung, Substrattoleranz und schnelles Wachstum wichtige Kriterien. So zeigte der Organismus *Aspergillus niger* (DSMZ 737) eine erhöhte Substrattoleranz und einfache Kulturführung. Auch ein Kiwiisolat war charakterisiert durch kurze Anwuchszeiten, eine einfache Kulturführung sowie schnelle Produktbildung ( $37,3 \text{ mg L}^{-1}$ , am 11. Kulturtag). So wurden diese beiden Organismen, neben *Pleurotus ostreatus* und *Aspergillus niger*, zu weiteren Experimenten herangezogen.

### 2.2.3 Kulturverlauf der Mikroorganismen

Der Kulturverlauf der Mikroorganismen wurde durch den Verbrauch an Glucose im Medium und durch die Zunahme der Biotrockenmass bzw. im Einzelfall durch die des Feuchtgewichtes analytisch verfolgt.

Zur Absicherung der Terpentoleranz wurde die Produktbildung im zweistündigen Zeitintervall untersucht (Abb. 2-4).

---

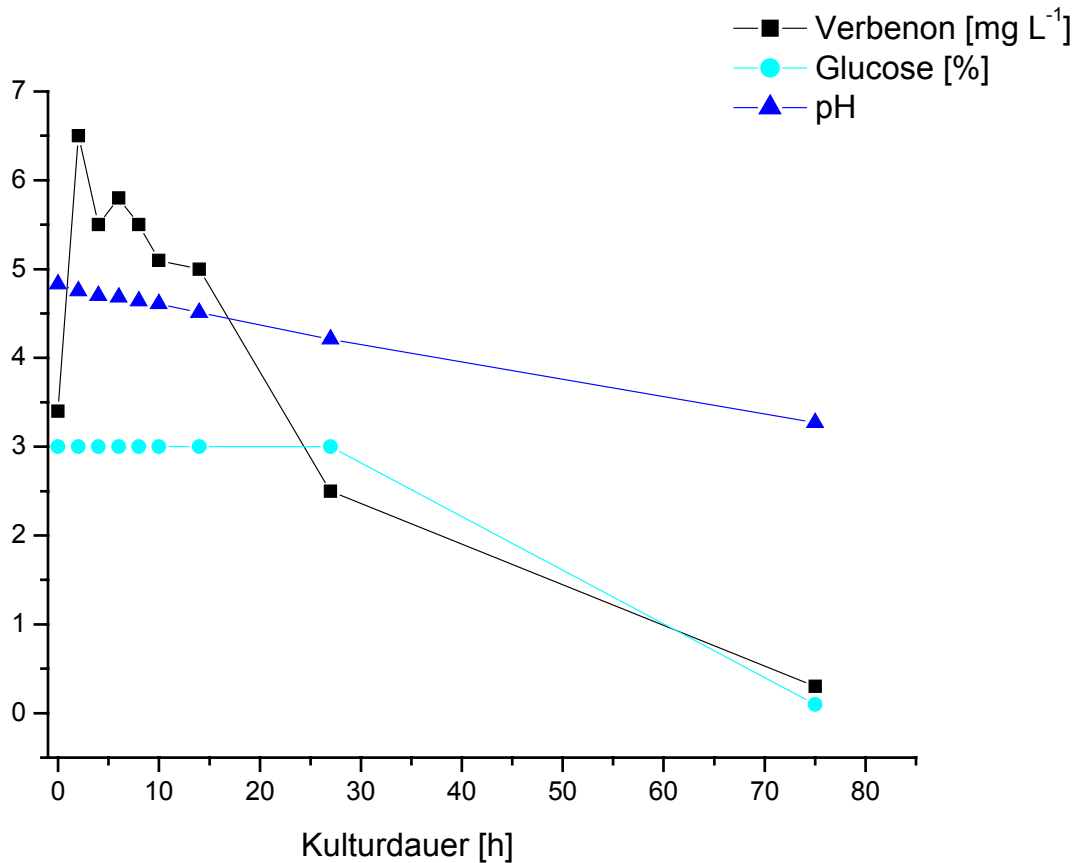


Abb. 2-4 *Aspergillus niger* DSMZ 737 bei einer einmaligen Dosierung von 4,68 mM  $\alpha$ -Pinen nach 24 stündiger Anwuchszeit der Experimentalkultur ( $t_0$ )

Der Organismus war in der Lage, eine einmalige Applikation von 4,68 mM des Terpens  $\alpha$ -Pinen zu tolerieren. Eine Produktbildung setzte bereits in den ersten Stunden ein. Die Kultivierung wurde anschließend mit einer Supplementierung von 7,5 mM  $\alpha$ -Pinen wiederholt und die Produktbildung des Verbenons untersucht. Die folgende Abbildung 2-5 zeigt das entsprechende Experiment bei wiederholter Dosierung von  $\alpha$ -Pinen.

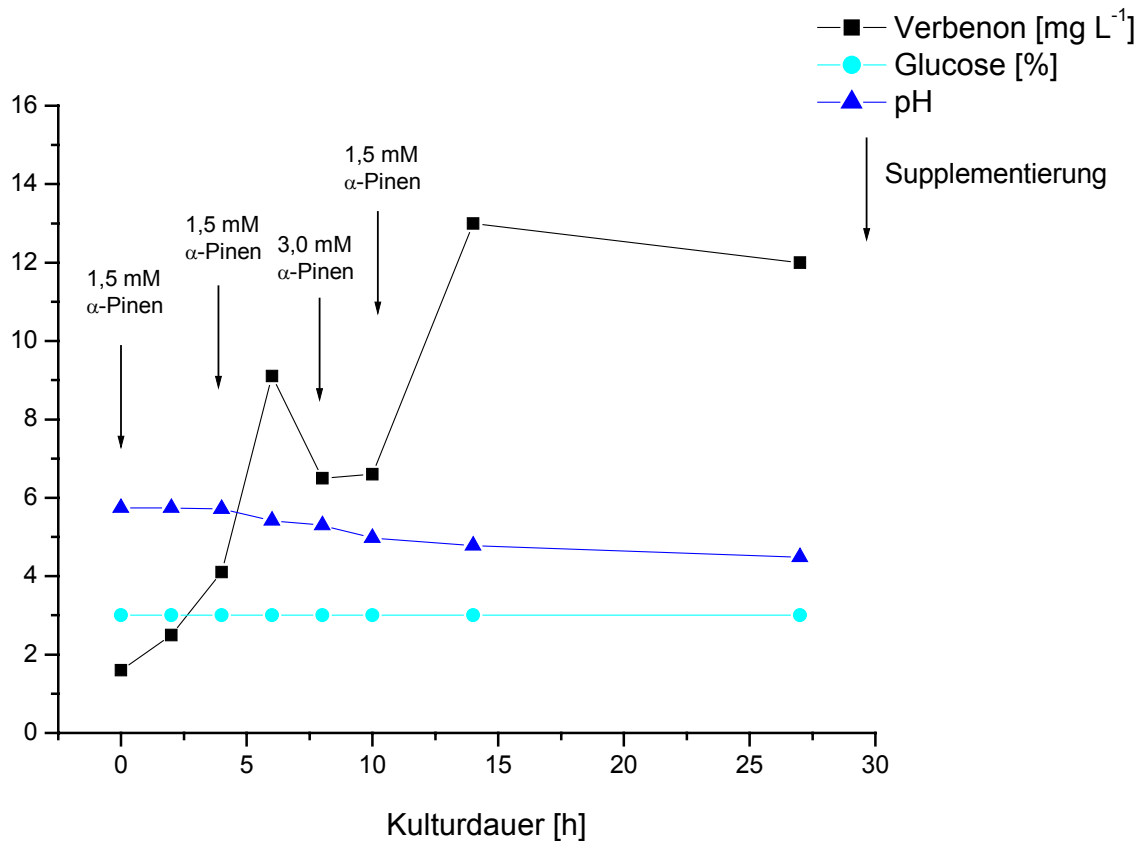


Abb. 2-5 Kulturverlauf von *Aspergillus niger* (DSMZ 737), insgesamt wurden 7,5 mM  $\alpha$ -Pinen dosiert (Supplementierungszeit mit Pfeil gekennzeichnet)

Die  $\alpha$ -Pinen-Konzentration wurde mittels SPME überprüft und bei Limitierung nachdosiert (Pfeile). Nach vier Stunden wurden zumeist nur noch geringe Mengen ( $<100 \text{ mg L}^{-1}$ ) des Pinens quantifiziert. Bei einer Fed-batch Dosierung von insgesamt 7,5 mM  $\alpha$ -Pinen konnte eine Verdoppelung der Verbenonkonzentration erzielt werden.

Ein weiterer Organismus war in Bezug auf Kulturführung, Substrattoleranz und Bioaktivität interessant. Dieses Isolat aus der Kiwifrucht zeigte schnelle Anwuchszeiten (24 h), Substrattoleranz bis zu 47 mM  $\alpha$ -Pinen und transiente Produktakkumulationen im zweistelligen Milligrammbereich pro Liter. Im Kulturmedium wurde über sieben Tage ein stetiger Anstieg der Verbenon- und Verbenolkonzentration beobachtet (Abb. 2-6).

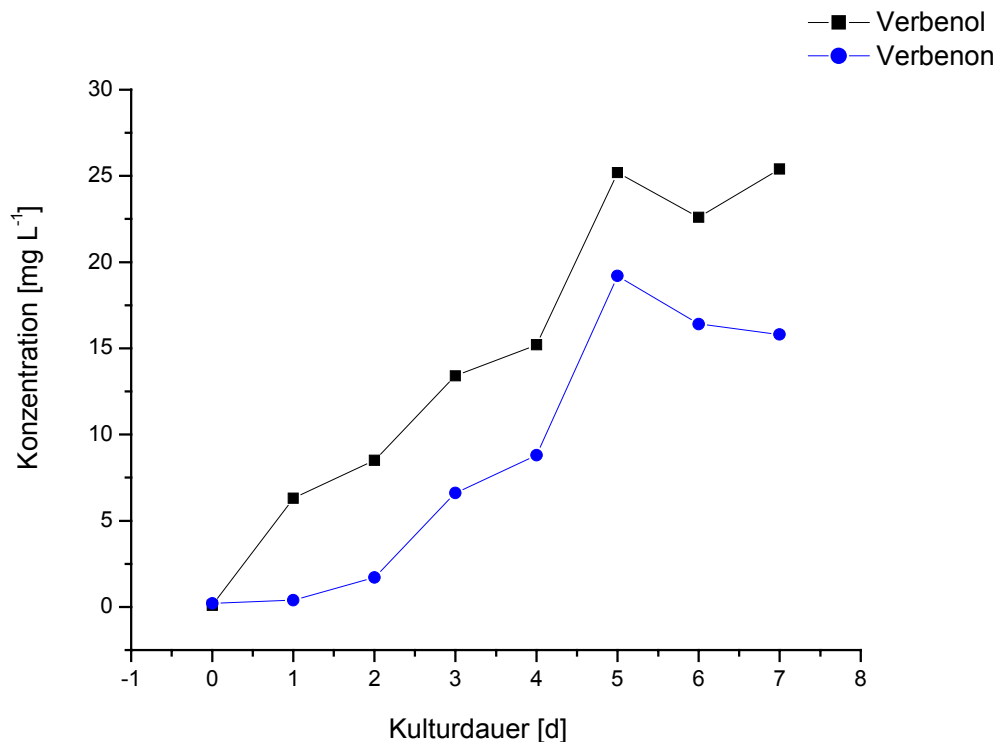


Abb. 2-6 Transformation von  $\alpha$ -Pinen zu Verbenol und Verbenon über den Kulturverlauf von 7 Tagen (Kiwiisolat)

Da die Terpensupplementierung bei den Kulturversuchen mit *Aspergillus niger* (DSMZ 737) und dem Kiwiisolat individuell erfolgte, wurden die Transformationsprofile in einem zweiten Vorversuch unter analogen Bedingungen ermittelt. Hier lag die Intention weniger in der Optimierung der Produktausbeuten als eher darin, die Transformationsfähigkeit der einzelnen Organismen im Gegensatz zum Blindwert zu manifestieren. Der Organismus *Penicillium citrinum* fungierte in diesem Fall als Organismus ohne Potential zur Verbenon-Transformation (2,3 mg L<sup>-1</sup>). *Penicillium solitum* (CBS 424,89) wurde als Pendant zum Eigenisolat herangezogen (siehe 2.2.6), Abb. 2-7. Es zeigte sich, dass *Penicillium citrinum* in der Lage war effektiv  $\alpha$ -Pinen unter Einführung des Sauerstoffs zu Verbenol zu transformieren, jedoch anschließend im Gegensatz zum Kiwiisolat keine Oxidation von Verbenol zu Verbenon durchführte.

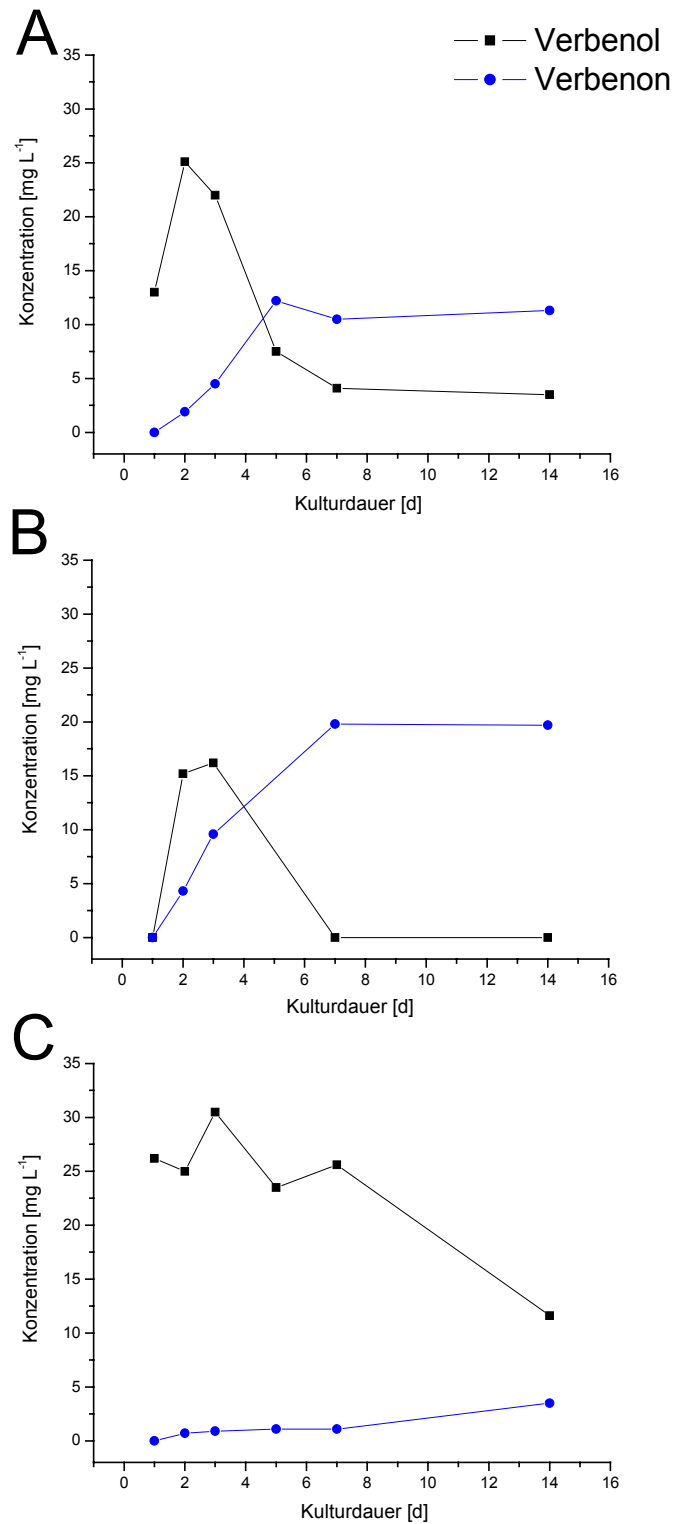


Abb. 2-7 Produktbildungskinetik von Verbenol bzw. Verbenon bei einer  $\alpha$ -Pinen-Supplementierung von jeweils 15 mM am ersten und dritten Kulturtag **A** Kiwiisolat (Selbstisolat), **B** *Aspergillus niger* (DSMZ 737) und **C** *Penicillium citrinum* (DSMZ 1179) als Negativkontrolle



Das Kiwiisolat zeigte bereits nach einem Tag eine stark ansteigende Bildung von Verbenol, die mit einer Verbenonbildung einherging. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit dem Organismus *Aspergillus niger* DSMZ 737 erzielt werden, während die Negativkontrolle bis zum siebten Tag keine Verbenonproduktion über die chemische Bildung hinaus zeigte. Da die Verbenonbildung für *Aspergillus niger* bereits hinreichend publiziert war, wurde dieser Organismus in den weiteren Arbeiten nicht mehr berücksichtigt (Positivkontrolle).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den positiv bewerteten Organismen *Aspergillus niger* (DSMZ 737) und dem Kiwiisolat um aktive  $\alpha$ -Pinen-Transformierer handelte, die im zweistelligen  $\text{mg L}^{-1}$ -Konzentrationsbereich Verbenon akkumulieren.

#### **2.2.4 Bildung sensorisch relevanter Aldehyde und Ketone**

Neben den bereits erwähnten Zielprodukten Verbenon und *trans*-Verbenol konnten mit dem Kiwiisolat als Biokatalysator weitere sensorisch interessante Transformationsprodukte des  $\alpha$ -Pinens identifiziert werden (Abb. 2-8).

---

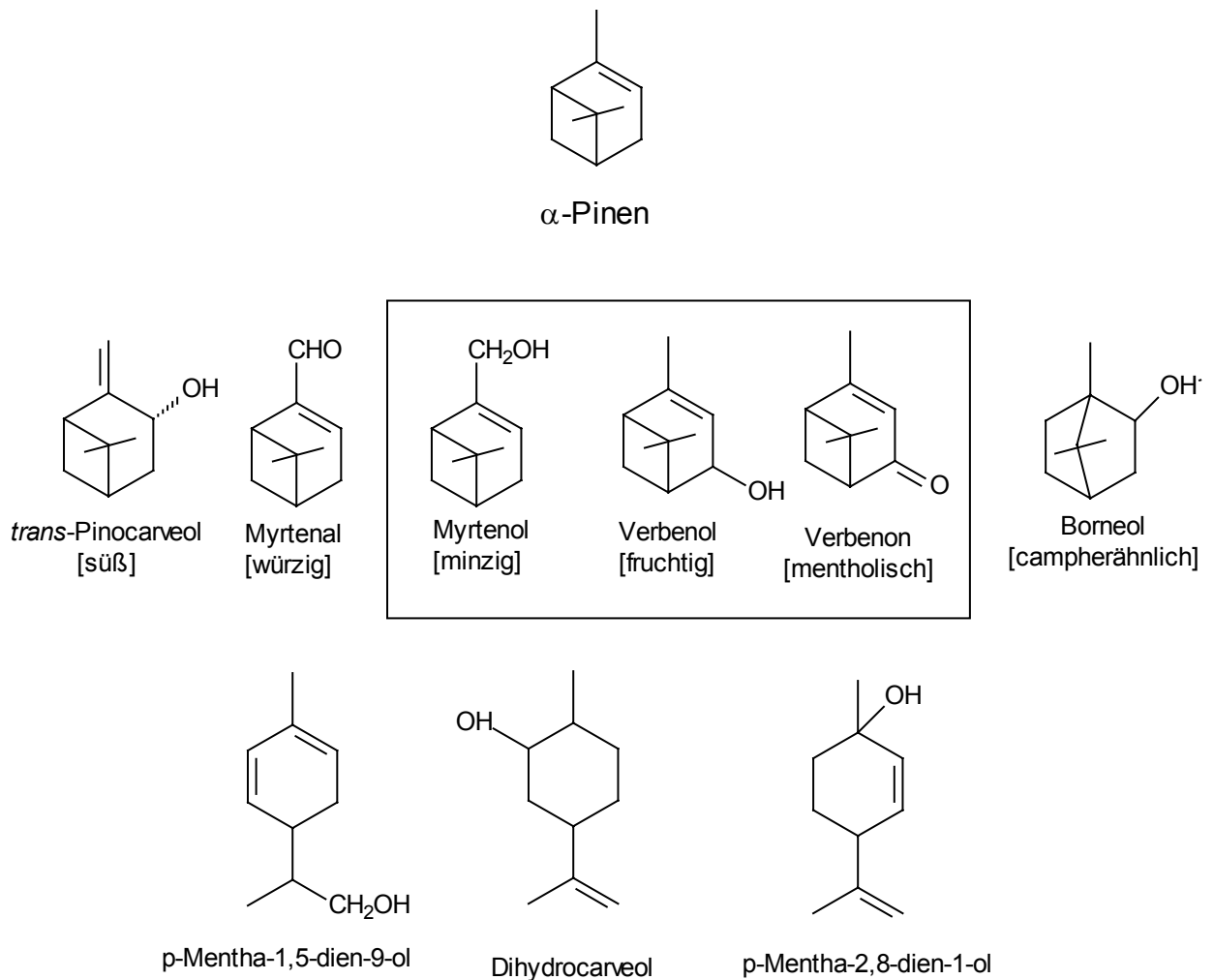


Abb. 2-8 GC-O Bewertung von identifizierten Transformationsprodukten vom Kiwiisolat (Eigenisolat) bei  $\alpha$ -Pinen Supplementierung, die drei Hauptprodukte sind eingerahmt.

Durch die Transformation von  $\alpha$ -Pinen waren somit neben den Hauptprodukten *trans*-Verbenol, Verbenon und Myrtenol sensorisch interessante Verbindungen wie Borneol und Myrtenal zugänglich. Um weitere Aufschlüsse über die Biogenese zu erhalten, wurden die Produktkonzentrationen über eine Kulturdauer von 10 Tagen ermittelt (Abb. 2-9). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der erzielten Screeningergebnisse wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

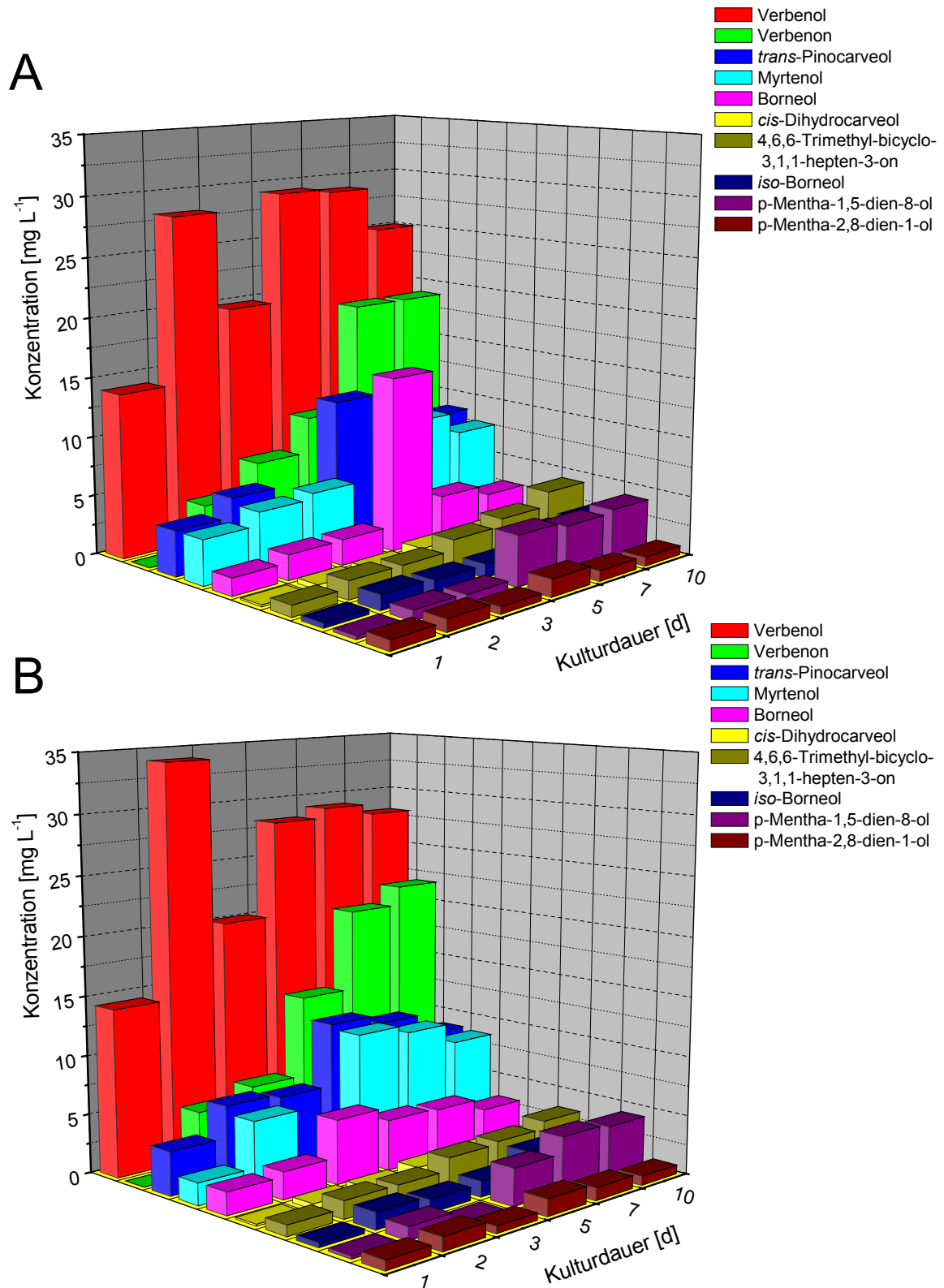


Abb. 2-9 **A** und **B** zeigt die Vergleichbarkeit einer Doppelbestimmung der Produktbildungskinetik bei  $\alpha$ -Pinen-Supplementierung am ersten und dritten Kulturtag (Kiwiisolat, 31,29 mM)

Die Doppelbestimmung bestätigte die Reproduzierbarkeit der Verbenonbildung sowie deren Kinetik für das Isolat aus Kiwi.

Die Untersuchungen in Submerskultivierung von *Aspergillus niger* (DSMZ 737) und einem Kiwiisolat (Eigenisolat) zeigten bereits zu Beginn der Kultivierung Abbau von  $\alpha$ -Pinen und eine transiente Bildung von flüchtigen Verbindungen. Die Biotransformation von  $\alpha$ -Pinen durch den aus Kiwi isolierten Organismus erwies sich in der Kulturführung als unkompliziert. Ferner zeigte dieser terpentolerante Organismus eine effiziente Produktbildung.

---

### 2.2.5 Identifizierung des Kiwiisolates

Der Organismus wurde durch die zertifizierte Kultursammlung (DSMZ, Braunschweig) als

*Penicillium solitum* (Westling), synonym *Penicillium casei* bestimmt.

Phylogenetische Einordnung:

*Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycet, Trichocomaceae (syn. Aspergillaceae), Trichocomaceae, Penicillium*

Die Kultursammlung CBS führt 21 Stämme namens *Penicillium solitum* (Synonym *Penicillium casei*). Es handelt es sich bei *Penicillium solitum* um einen ubiquitär vorkommenden Pilz, der aus sehr heterogenen Quellen (verdorbenen Nahrungsmitteln, Mäusenestern, Erdproben und Kompost) isoliert wurden. Molekularbiologische Untersuchung zur Schnellidentifizierung von *Penicillium solitum* sind bislang nur wenig beschrieben.

Eine Recherche bei der nicht redundanten Datenbank (EMBL Nukleotid Sequence Database <http://ebi.ac.uk/embl/index.html>) zeigte folgendes Ergebnis: Sequenziert ist ein 563 Bp langes Fragment, das für einen Teil der 18S ribosomalen DNA kodiert. Dieses Fragment sollte zur Schnellidentifizierung von *Penicillium*-Spezies mittels PCR dienen, da es sich bei dem Organismus um einen potentiellen Lebensmittelverderber handelt (Haugland et al. 2003, Pedersen et al. 1997, Skouboe et al. 1999). Als potentieller Käseverderber ist seine extracelluläre Sekretion von Exolipasen bereits gut erforscht (Toskueva et al. 1988 a,b). Eine weitere Sequenz von 375 Bp Länge, kodierend für einen Teil des Tubulin-Dimers (Seifert et al. 2000) der Mikrotubuli (Cytoskelett), ist bekannt (Samson et al. 2000).

Die optimale Wachstumstemperatur für diesen Organismus beträgt 25 °C. Die Kultur wächst etwa 2,5 mm pro Tag, ist flach, samtig grün, und das Mycel ist, wie in Abbildung 2-10 gezeigt, nur in Submerskultivierung farblos. Bei 37 °C zeigte der Organismus kein Wachstum.

---

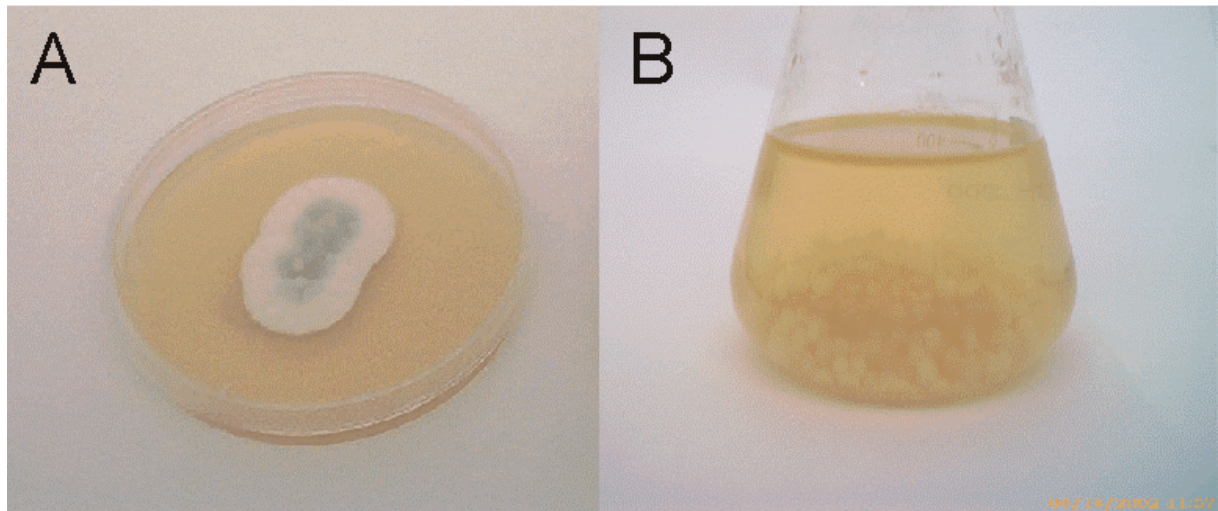


Abb. 2-10 *Penicillium solitum* (Selbstisolat) als Plattenkultur **A** und als Submerskultur **B**

### 2.2.6 Transformationspotential von *Penicillium solitum* (Selbstisolat)

Nach der Etablierung von  $\alpha$ -Pinen-Supplementierungsexperimenten mit dem Kiwiisolat sollten weitere Monoterpenkohlenwasserstoffe, die bei der Konzentrierung von Citrusölen als Beiprodukte anfallen, als Transformationsprecursoren dienen. Da Limonen als mengenmäßig dominierender Monoterpenkohlenwasserstoff in der citrusverarbeitenden Industrie anfällt, wurden Experimente mit Limonensupplementierung durchgeführt. Die Hauptprodukte der Umsetzung mit *Penicillium solitum* sind in der folgenden Abbildung 2-11 dargestellt.

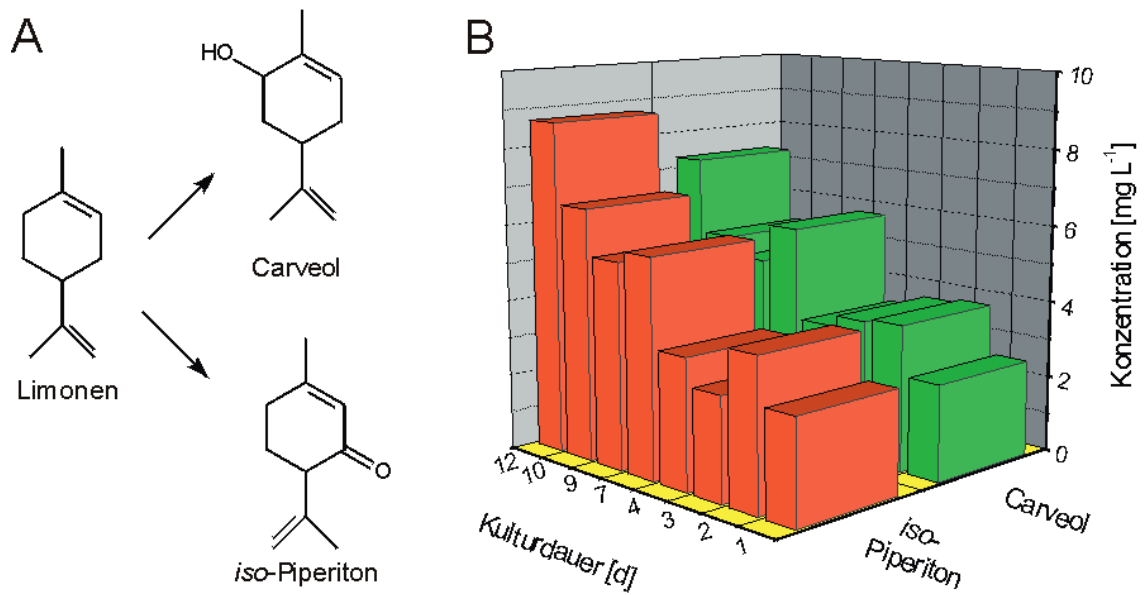


Abb. 2-11 **A** Hauptprodukte der Biotransformation von Limonen **B** Produktbildung bei Kultivierung *Penicillium solitum* (Selbstisolat) unter Supplementierung von 15,43 mM bei Experimentbeginn (0 d)

Über den Kulturverlauf von 12 Tagen wurden aus Limonen als Hauptprodukte *iso*-Piperiton und Carveol als allylische Oxidationsprodukte gebildet.

Unter analogen Experimentalbedingungen wie bei der Limonensupplementierung wurden erneut Supplementierungsversuche mit  $\alpha$ -Pinen durchgeführt (Abb.2-12). Zur Steigerung der Produktbildung wurde die  $\alpha$ -Pinenzugabe auf 47 mM erhöht. Neben der Transformation zu Verbenol findet auch eine Hydroxylierung der Methylgruppe (C<sub>7</sub>) zu Myrtenol statt.

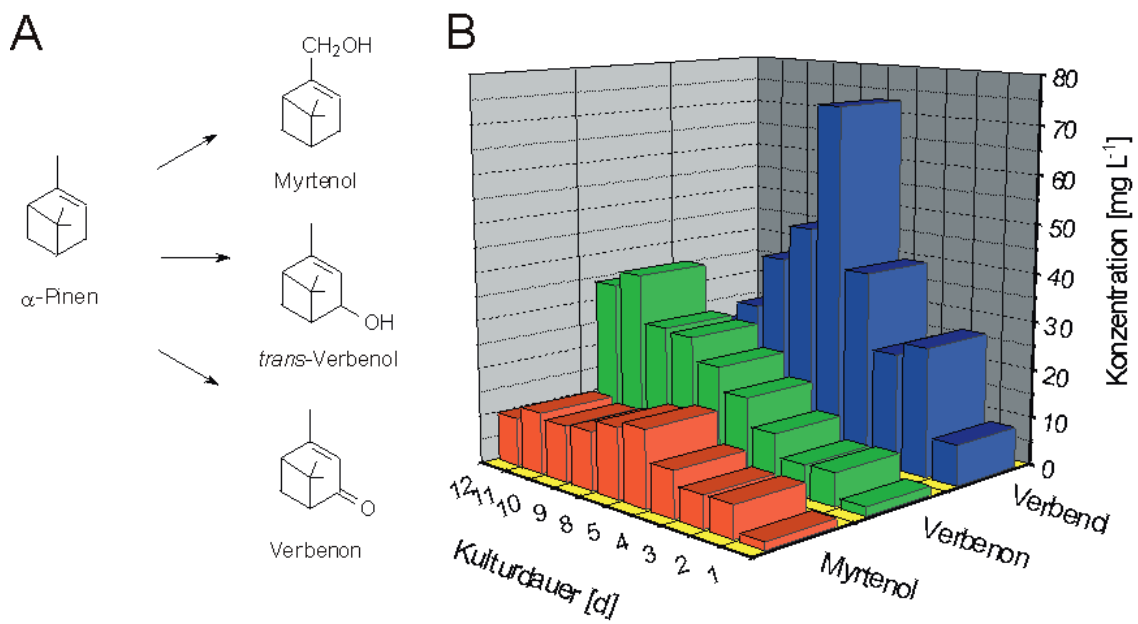


Abb. 2-12 **A** Transformationsprofil von *Penicillium solitum* (Selbstisolat) bei Supplementierung mit  $\alpha$ -Pinen **B** resultierende Produktkinetik bei Dosierung von 47 mM  $\alpha$ -Pinen

Aufgrund der hohen Produktkonzentration am sechsten und siebten Tag der Kultivierung konnte keine Abtrennung der Verbindungen *trans*-Verbenol und Verbenon erzielt werden, sodass für diese Tage keine Daten über die gebildete Menge vorliegen. Insgesamt erfolgte bei der gewählten  $\alpha$ -Pinendosierung von 47,06 mM eine optimierte Produktbildung.

In einer weiteren Kultivierung des Selbstisolats *Penicillium solitum* wurde die Biotransformation von  $\beta$ -Pinen untersucht. Hierbei war ein anderes Transformationsprofil als bei der Transformation des  $\alpha$ -Pinsens (Abb. 2-13) zu beobachten.



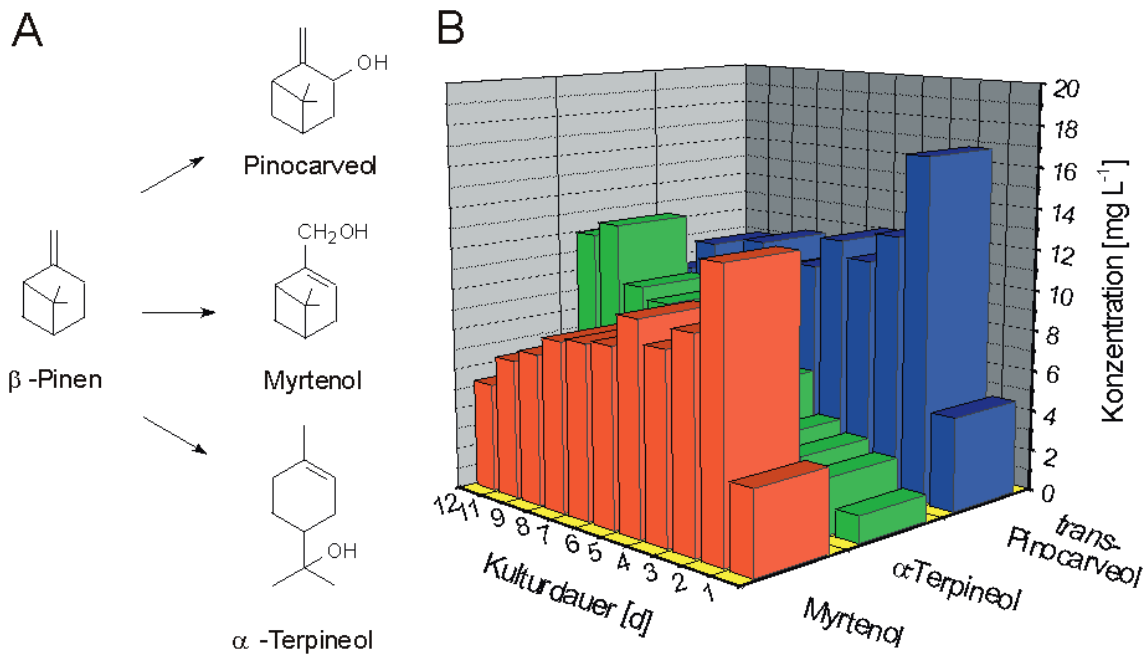


Abb. 2-13 **A** Transformationsprofil von *Penicillium solitum* (Selbstisolat) bei Supplementierung mit  $\beta$ -Pinen **B** resultierende Produktkinetik von *Penicillium solitum* bei einer  $\beta$ -Pinen-Dosierung von 48,00 mM

Neben dem bereits bei der  $\alpha$ -Pinendosierung erhaltenen Myrtenol konnten das nach Flieder duftende  $\alpha$ -Terpineol und das sensorisch frische  $\text{trans}$ -Pinocarveol identifiziert werden. Das Haupttransformationsprodukt war mit 16,8  $\text{mg L}^{-1}$  das  $\text{trans}$ -Pinocarveol.

### 2.2.7 Teil-Zusammenfassung

- Das biochemische Potential des Kiwiisolates zur Transformation der drei Substrate ( $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Limonen) konnte bestätigt werden. In allen drei Fällen war eine hohe Terpentoleranz (bis zu 47 mM) zu beobachten.
- Ferner sind durch diesen Organismus (*Penicillium solitum*) bei den gewählten Substraten mehrere Zielverbindungen zugänglich (Verbenon,  $\alpha$ -Terpineol,  $\text{trans}$ -Pinocarveol, Carveol, *iso*-Piperiton sowie Myrtenol)

### 2.2.8 Dosierung einer authentischen Reststofffraktion (RSF)

Bei der Isolierung von Duft- und Aromastoffen aus etherischen Ölen, beispielsweise Citrusölen, fallen jährlich Zehntausende von Tonnen wenig aromawirksamer Terpenkohlenwasserstoffe als Reststofffraktionen an. Diese Monoterpenkohlenwasserstoffe wie z.B. die Nebenprodukte Limonen und Pinen fallen nicht als Reinstoffe sondern als Gemische an, da deren Aufreinigung zu ineffizient und kostenintensiv ist. Zur Verwertung dieser Reststoffe sollten effiziente biotechnologische Verfahren zu deren Veredelung entwickelt werden. Bei diesen anfallenden Gemischen handelt es sich zumeist um Limonen dominierte Fraktionen. Zu diesem Zweck wurde eine aktuell anfallende Reststofffraktion, deren Gaschromatogramm in Abbildung 2-14 **A** gezeigt ist, in die Submerskultivierung mit *Penicillium solitum* (Eigenisolat) überführt.

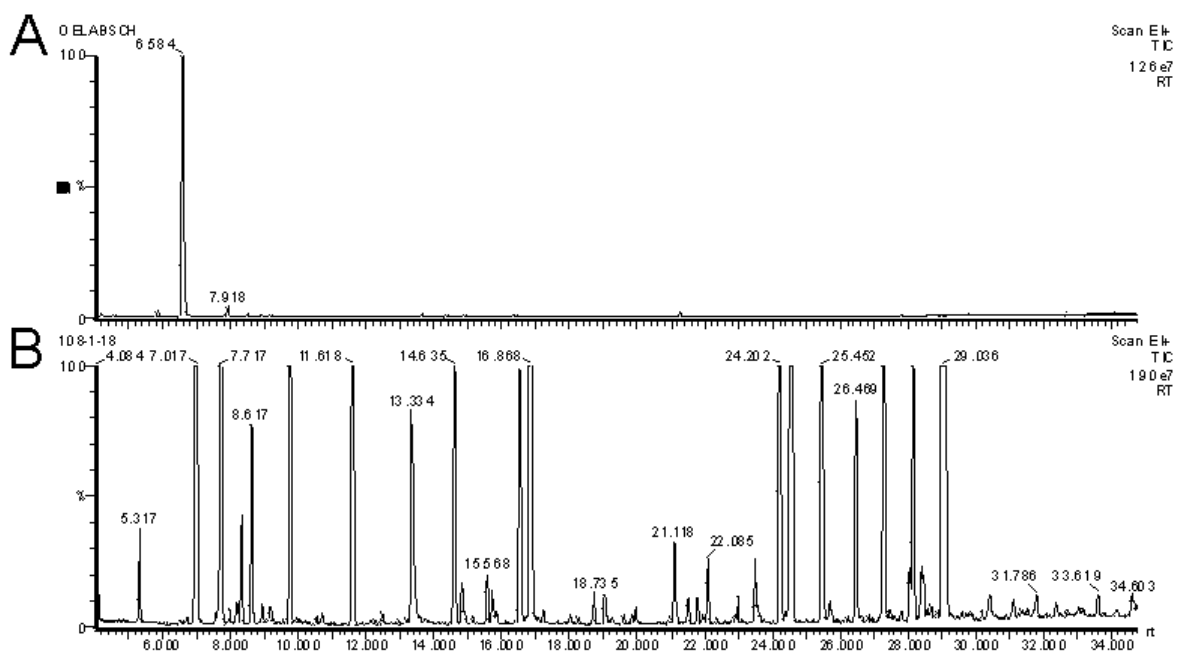


Abb. 2-14 **A** Gaschromatogramm einer authentisch angefallenen RSF der citrusverarbeitenden Industrie **B** Gaschromatogramm des Extrakts von *Penicillium solitum* (Eigenisolat) bei Dosierung der unter **A** gezeigten RSF

Die Reststofffraktion bestand zu einem überwiegenden Teil aus Limonen (72,0%). Weitere Bestandteile waren  $\beta$ -Pinen (1,3%),  $\beta$ -Myrcen (3,2%),  $\gamma$ -Terpinen (3,6%) und Geranylacetat (5,2%). Schon nach fünf Tagen Biokatalyse mit *Penicillium solitum* konnten über 30 flüchtige Verbindungen im Medium nachgewiesen werden. Die Hauptakkumulations- bzw. -transformationsprodukte wurden über den Kulturverlauf verfolgt und in der Abbildung 2-15 dargestellt.

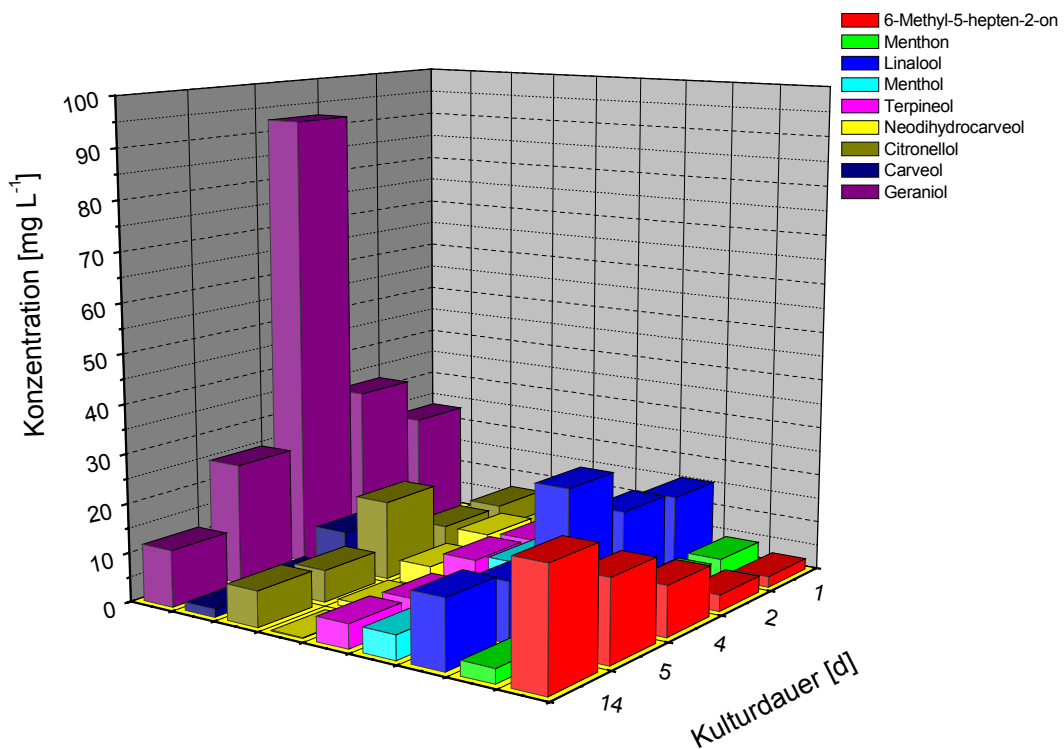


Abb. 2-15 Kulturverlauf des Selbstisolates *Penicillium solitum* bei Dosierung einer Reststofffraktion [ $5 \text{ mL L}^{-1}$  (v/v)] bei Experimentbeginn (0 d)

Eine Identifizierung der Transformationsprodukte erfolgte anhand der Massenspektren und dem sensorischen Eindruck (GC-O) (Davies 1990, Jennings et al. 1980, Rodriguez et al. 1986). Diese Identifizierung konnte durch die dargestellten Referenzverbindungen (RI) (Tab. 2-4) bestätigt werden.

Tab. 2-4 Kovat-Indizes der analysierten Verbindungen (Probe) und deren Referenzverbindungen (authentische Standards) auf polarer Säule

Produkte	RI Standards	RI Probe
6-Methyl-5-hepten-2-on	-	1312
Menthon	1420	1397
Linalool	1492	1472
Menthol	1564	1545
$\alpha$ -Terpineol	1602	1581
Citronellol	1662	1643
Geraniol	1720	1700
cis-Carveol	1701	1710

Durch diesen Bioprozess mit *Penicillium solitum* (Eigenisolat) wurde ein stark Limonen dominiertes, sensorisch unauffälliges Terpengemisch zu einer sehr ansprechenden Produktmischung veredelt.

Auch bei dieser Supplementierung wurde als alternativer Blindwert die Biokonversion eines nicht effizienten Organismus gegenübergestellt. Als Vergleichsorganismus diente *Penicillium citrinum* DSMZ 1179, ein Organismus gleicher Gattung. Hierbei zeigte sich, dass viele der beim Kiwiisolat identifizierten Substanzen ebenfalls bei *Penicillium citrinum* gefunden werden konnten. Beobachtet wurde jedoch ein geringeres Wachstum, das mit einer geringeren Substrattoleranz korrelierte. So lag der Gehalt der Biotrockenmasse (TS) am Ende der Kultivierung (am 18. Kulturtag) von *Penicillium citrinum* bei  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ , während *Penicillium solitum* mit  $4,3 \text{ g L}^{-1}$  den siebenfachen Wert erreichte. In Abbildung 2-16 sind die gebildeten Transformationsprodukte im Vergleich dargestellt.

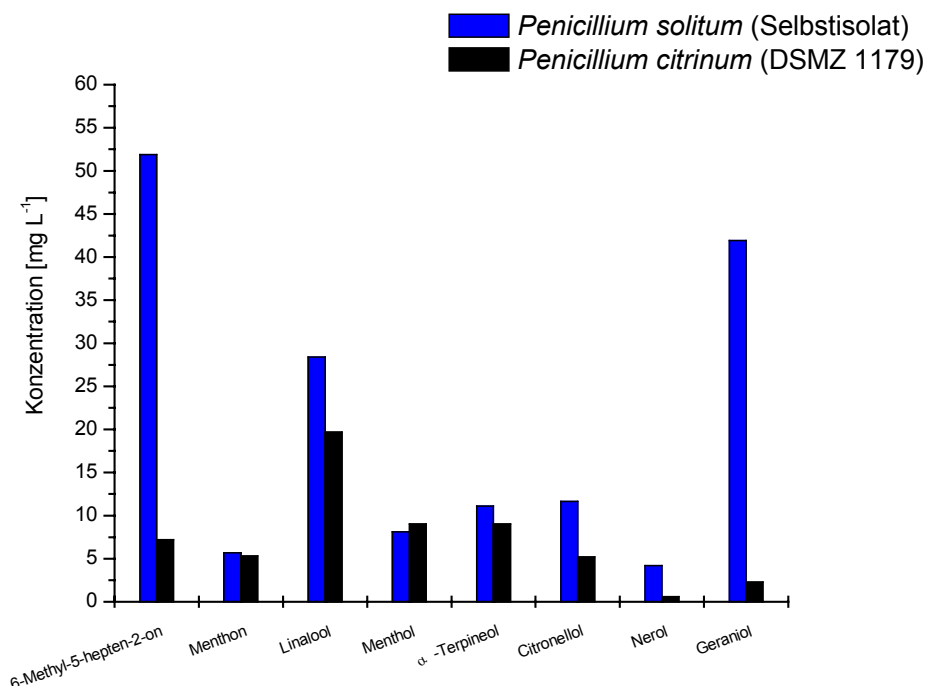


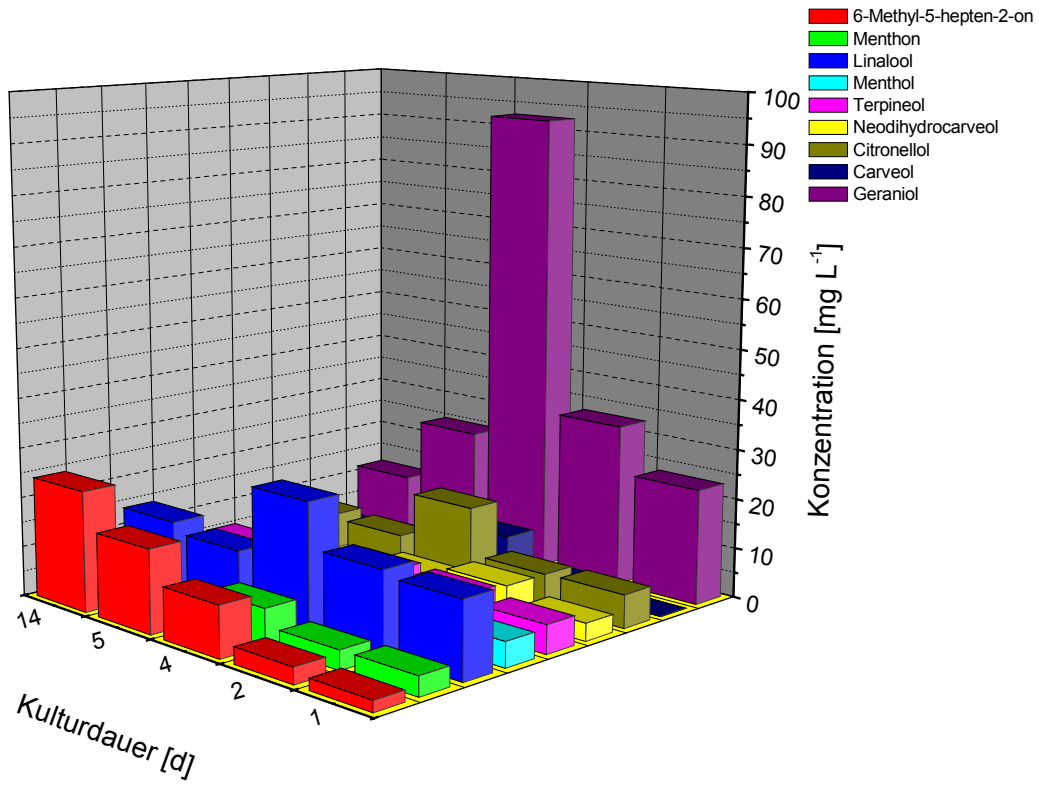
Abb. 2-16 Haupttransformations-/Akkumulationsprodukte von *Penicillium solitum* (Eigenisolat) und *Penicillium citrinum* (DSMZ 1179) bei Dosierung von RSF, am fünften Kulturtag

Mit Ausnahme von Geraniol und 6-Methyl-5-hepten-2-on wurden die Substanzen in ähnlicher Größenordnung gebildet. Der Gehalt an Geraniol und 6-Methyl-5-hepten-2-on überwog bei der Kultivierung mit *Penicillium solitum* um ein Vielfaches den der Vergleichskultivierung.

### **2.2.9 Vergleich *Penicillium solitum* (Selbstisolat) und *Penicillium solitum* (CBS 424,89)**

Um die Umsatzraten anhand eines Referenzorganismus vergleichen zu können, wurde ein entsprechendes Pendant des Organismus von der Kultursammlung CBS hinzugezogen. So wurden *Penicillium solitum* (Selbstisolat) und *Penicillium solitum* (CBS 424,89) unter identischen experimentellen Bedingungen kultiviert und mit der authentischen Reststofffraktion supplementiert. Ein Vergleich der Produktkinetiken ist in der folgenden Abbildung 2-17 dokumentiert.

A



B

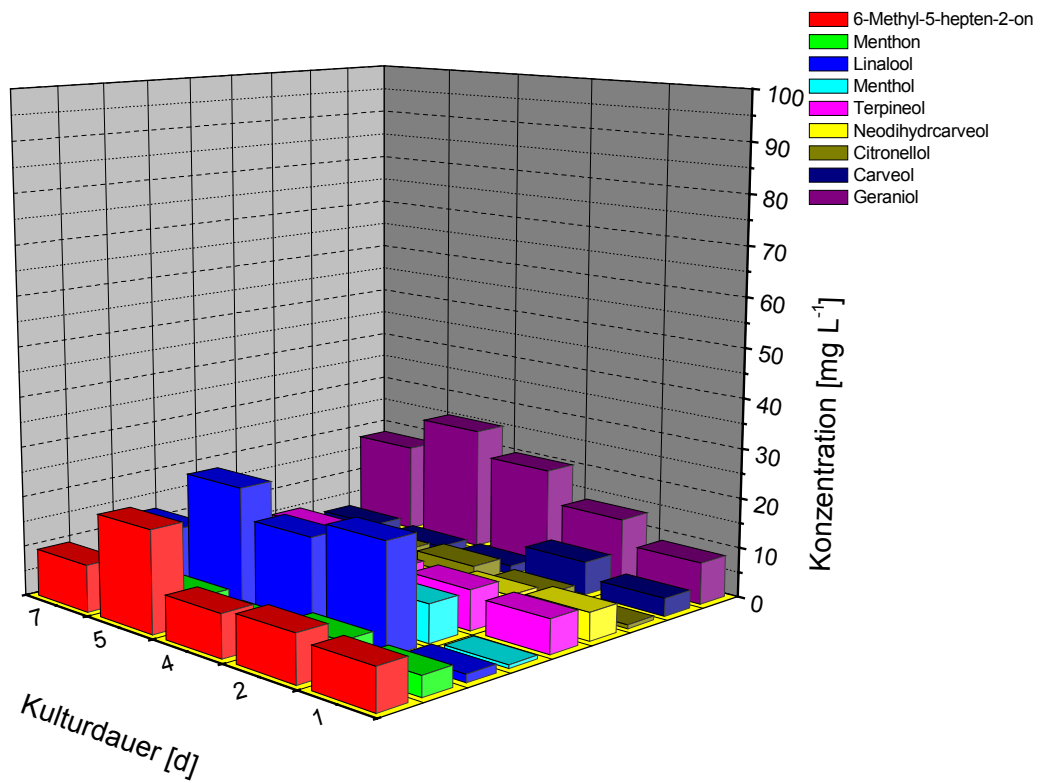


Abb. 2-17 Kulturverlauf von **A** *Penicillium solitum* (Selbstisolat) und **B** *Penicillium solitum* (CBS 424,89) bei Dosierung der RSF

Betreffend der Biogenese von Geraniol und Citronellol zeigte der Organismus der Kultursammlung wesentliche Unterschiede zum Selbstisolat. Da die Kultivierung mit dem Mikroorganismus *Penicillium solitum* (Selbstisolat) zu einer auffälligen Verbesserung des Aromaprofils der RSF und somit zu einer sensorischen Aufwertung führte, wurde das Experiment mit Dosierung der Einzelkomponenten der RSF als Reinstoffe in unabhängigen Ansätzen reproduziert. Ferner sollte die Genese der Verbindungen aufgeklärt werden. Ein qualitativer Nachweis der neu gebildeten Verbindungen wurde in der Tabelle 2-5 zusammengefasst.

Tab. 2-5 Qualitatives Transformationsprofil von *Penicillium solitum* (Eigenisolat). O keine Transformation, X Transformation, Schattierung: Kausalität konnte durch Zugabe von  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Limonen und Geranylacetat nicht geklärt werden.

Substrat \ Transformationsprodukt	RSF	$\alpha$ -Pinen	$\beta$ -Pinen	Limonen	Geranylacetat	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen
6-Methyl-5-hepten-2-on	X	O	O	O	X	O	O
Menthon	X	O	O	O	O	O	O
6-Methyl-5-hepten-2-ol	X	O	O	O	X	O	O
Linalool	X	O	O	O	X	O	O
Menthol	X	O	O	O	O	O	O
$\alpha$ -Terpineol	X	O	X	O	O	O	O
Neoisomenthol	X	O	O	O	O	O	O
Citronellol	X	O	O	O	X	O	O
Geraniol	X	O	O	O	X	O	O
Myrtenol	O	X	X	O	O	O	O
Verbenon	O	X	O	O	O	O	O
<i>trans</i> -Verbenol	O	X	O	O	O	O	O
<i>trans</i> -Pinocarveol	O	O	X	O	O	O	O
<i>iso</i> -Piperiton	O	O	O	X	O	O	O
<i>cis</i> -Carveol	O	O	O	X	O	O	O

In der Tabelle 2-5 werden alle Transformationsprodukte ausgehend von der RSF mit den Transformationsprodukten der Einzelsupplementierungen verglichen.

Anhand der Einzelsupplementierungen konnte die Herkunft der gebildeten Produkte weitgehend geklärt werden. Für zwei Substrate der RSF,  $\gamma$ -Terpinen sowie  $\beta$ -Myrcen, konnten keine Transformationsprodukte nachgewiesen werden. Ein nicht unerheblicher Teil der Transformationsprodukte basiert auf der Hydrolyse des Geranylacetats. Durch diesen Prozess wurden, gefolgt von weiteren Umlagerungen und Kettenverkürzungen, 5 weitere sensorisch relevante Verbindungen wie Linalool und 6-Methyl-5-hepten-2-on zugänglich (Abb. 2-18).

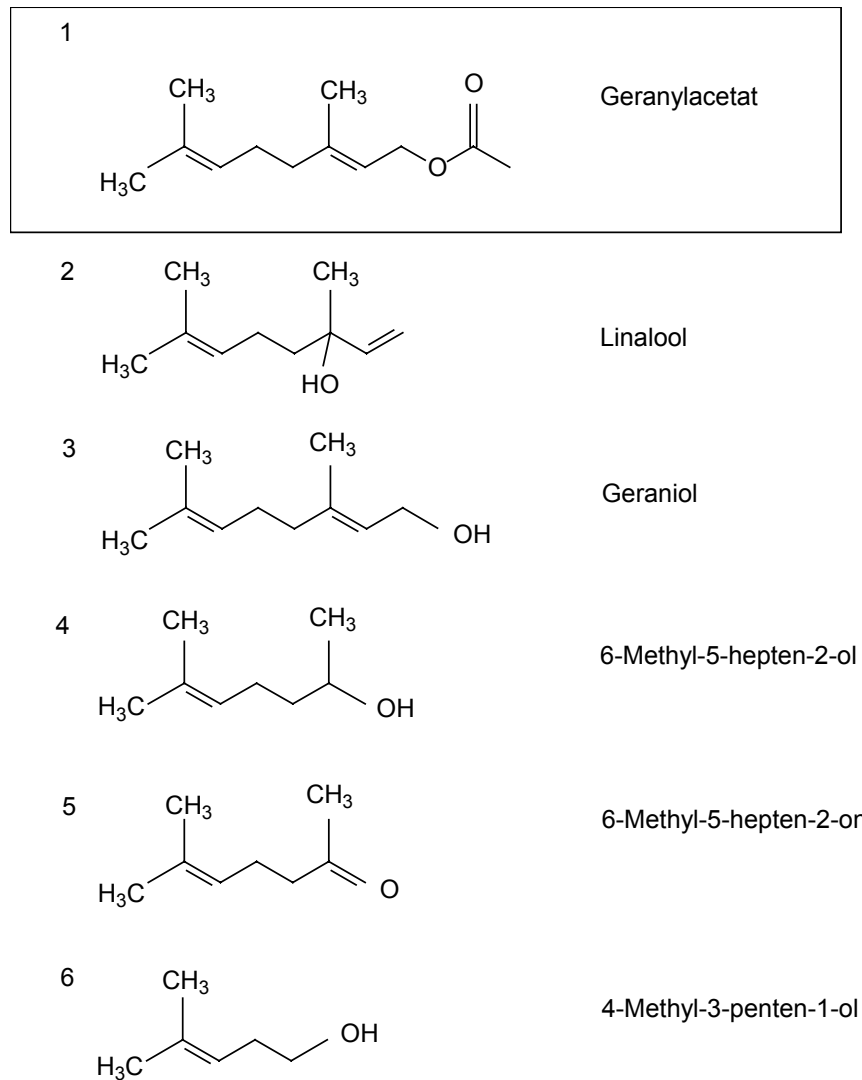


Abb. 2-18 Transformationsprodukte von *Penicillium solitum* (Selbstisolat) ausgehend vom Geranylacetat

In Spuren wurden auch Nerol und Citronellol gefunden. Die drei Verbindungen Menthol, Neomenthol und Menthon konnten durch Einzelsupplementierung nicht generiert werden.



### 2.2.10 Bilanz der Veredelung

Der Gehalt an Limonen im Kulturmedium bei Supplementierung mit der Reststofffraktion betrug zum Zeitpunkt  $t_0$   $6,5 \text{ g L}^{-1}$ . Nach 18 Tagen konnte ein Restgehalt von lediglich  $0,025 \text{ g L}^{-1}$  im Medium wiedergefunden werden. Das heißt, Limonen wurde zu über 99% aus dem Medium entfernt.

Es zeigte sich, dass durch diesen Veredelungsprozess für mehrere sensorisch interessante Verbindungen Produktkonzentrationen im höheren zweistelligen Milligrammbereich ( $\text{mg L}^{-1}$ ) erzielt werden konnten. Insgesamt betrug die Produktakkumulation der dosierten RSF [ $5 \text{ mL L}^{-1}$  (v/v)] im Kulturmedium 6,82%. Im folgenden sollte der beobachtete Limonenabbau genauer untersucht werden. Dazu wurden RSF-Supplementierung als Dreifachbestimmung sowie mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (0,3%, 3% und 30%) durchgeführt. Neben dem Selbstisolat wurde auch ein Kontrollansatz mit dem Referenzorganismus der Stammsammlung, *Penicillium solitum* (CBS 424,89), mitgeführt. Eine Zusammenfassung der Limonengehalte am 18. Kulturtag sind in Tabelle 2-6 dargestellt.

Tab. 2-6 Bilanz der Limonendegradation nach einer Kulturdauer von 18 Tagen bei der Dosierung einer limonendominierten RSF

Organismus	Ansatz	Trocken- substanz [18 d] [ $\text{g L}^{-1}$ ]	Limonen- konzentration bei $t_0$ [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	Limonen- konzentration nach 18 d [ $\text{mg L}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ TS}$ ]
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)	Dreifach- bestimmung  3% Glucose	4,3	6500	1,0
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)		4,0	6500	2,7
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)		3,7	6500	13,5
<i>Penicillium solitum</i> (CBS 424,89)	Referenzkontrolle	5,2	6500	4,7
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)	0,3% Glucose	2,5	6500	1,8

Tab. 2-6: Bilanz der Limonendegradation nach einer Kulturdauer von 18 Tagen bei der Dosierung einer limonendominierten RSF (Fortsetzung)

Organismus	Ansatz	Trocken- substanz [18 d] [g L <sup>-1</sup> ]	Limonen- konzentration bei t <sub>0</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Limonen- konzentration nach 18 d [mg L <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> TS]
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)	3% Glucose	5,7	6500	0,17
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)	30% Glucose	18,1	6500	0,04

Bei allen Ansätzen konnten nach dem 18. Kulturtag im Medium nur noch Spuren des anfänglich im Grammbereich (6,5 g L<sup>-1</sup>) dosierten Limonens wiedergefunden werden. Da wegen der Zehrung des Limonens aus dem Kulturansatz die Glucose erst am Kultivierungsende limitierend wurde, stagnierte der Gehalt an Biotrockensubstanz bei ungefähr 5 g L<sup>-1</sup>. Bei dem Ansatz mit 30% Glucose herrschte keine Glucoselimitierung, was an dem höheren Wert für die Trockensubstanz erkennbar war. Diese Werte wurden bei einer Supplementierung von Limonen als Reinstoff in der gleichen Dosierung im Folgeexperiment bestätigt (Tab. 2-7).

Tab. 2-7 Kultivierung von *Penicillium solitum* (Eigenisolat) mit Dosierung von Limonen als Reinstoff

Organismus	Ansatz	Limonen <sub>0d</sub>	Limonen [10 d]
<i>Penicillium solitum</i> (Selbstisolat)	Reinstoff Limonen 3,0% Glucose	2600 mg L <sup>-1</sup>	23,2 mg L <sup>-1</sup>

### 2.2.11 Wachstum von *Penicillium solitum* auf natürlichen Substraten

Da sich der aus der Kiwifrucht isolierte Organismus als äußerst terpentolerant erwies, sollte ferner überprüft werden, ob dieser auch in der Lage war, auf Zitrusfrüchten als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen. So wurden bei ca. 2 kg Citrusfrüchten (2 Zitronen, 1 Limette, 4 Orangen) durch Auspressen die

Saftschläuche entfernt, die Schalen in Stücke geschnitten und mit dem Organismus inokuliert. Ein Ansatz ohne Inokulum wurde als Negativ- und Steril-Kontrolle geführt. Wie in Abbildung 2-19 ersichtlich, zeigte der inokulierte Ansatz ein deutliches Wachstum der Kultur *Penicillium solitum* (Eigenisolat) ohne jegliche Glucosedosierung.

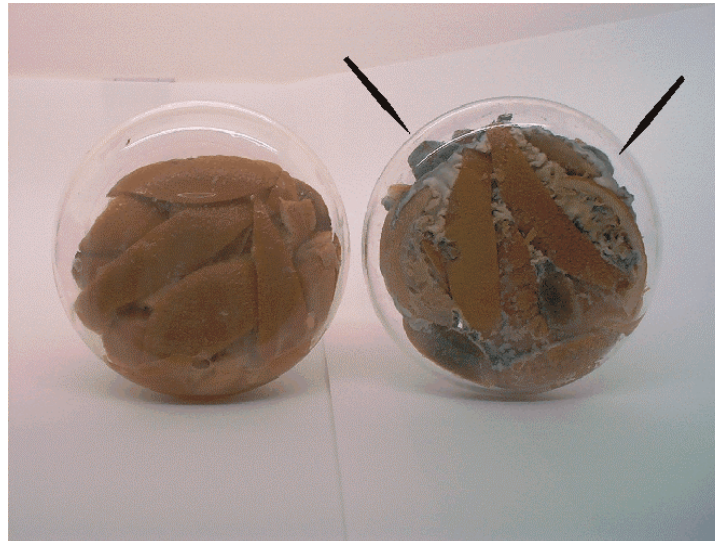


Abb. 2-19 Wachstum von *Penicillium solitum* (Eigenisolat) auf natürlichen Terpenquellen (Citrusfrüchte), die Pfeile zeigen den Bewuchs auf der terpenhaltigen Aussenschicht (Ölbehälter) der Citrusschale. Links Sterilkontrolle, rechts inokulierter Kolben.

Die Negativkontrolle zeigte wie erwartet keinerlei Bewuchs. Interessant ist, dass die Außenschicht der Citrusfrüchte (*Flavedo*), die den Bildungsort der Citrusterpene darstellt, deutlich bewachsen war. Dies ist ein weiteres Indiz für die Dissimilation von Terpenkohlenwasserstoffe durch den Saprophyten.

### 2.2.12 Limonentotalkatabolismus einer exemplarischen RSF von *Litsea cubeba*

Im Schüttelkolben ist eine exakte Bilanzierung über den Kulturverlauf von 10 Tagen aufgrund der Limitierung des Kulturvolumens nicht möglich. Deswegen wurde eine Bilanzierung im Pilot-Maßstab unter kontrollierten Bedingungen im Laborbioreaktor durchgeführt. Ein weiteres Motiv war die Erfassung und Quantifizierung des am Mycel adsorbierten Limonens und die Bestimmung des Verlustes an Edukt sowie Produkt durch die Abluft bzw. Sterilfilter. Hierzu wurde aus einer 250 mL Vorkultur der Bioreaktor 1% ig (v/v) angeimpft. Kultiviert wurde analog zu den Vorversuchen bei 25 °C, während die Abluft auf 10 °C gekühlt wurde, um den Verlust durch den Belüftungsstrom (0,1 vvm) zu minimieren. Der

pH-Wert wurde ähnlich wie im vorhergehenden Batchversuch unreguliert belassen. Das Gesamtvolumen des Reaktors (2000 mL) wurde samt Mycel einer kontinuierlichen Extraktion unterzogen. Der Reaktorraum wurde mit Lösungsmittel nachgespült und dem Gesamtansatz zugeführt. Der Experimentaufbau und die Bilanzierung der RSF aus *Litsea cubeba* ist in Abbildung 2-20 dargestellt.

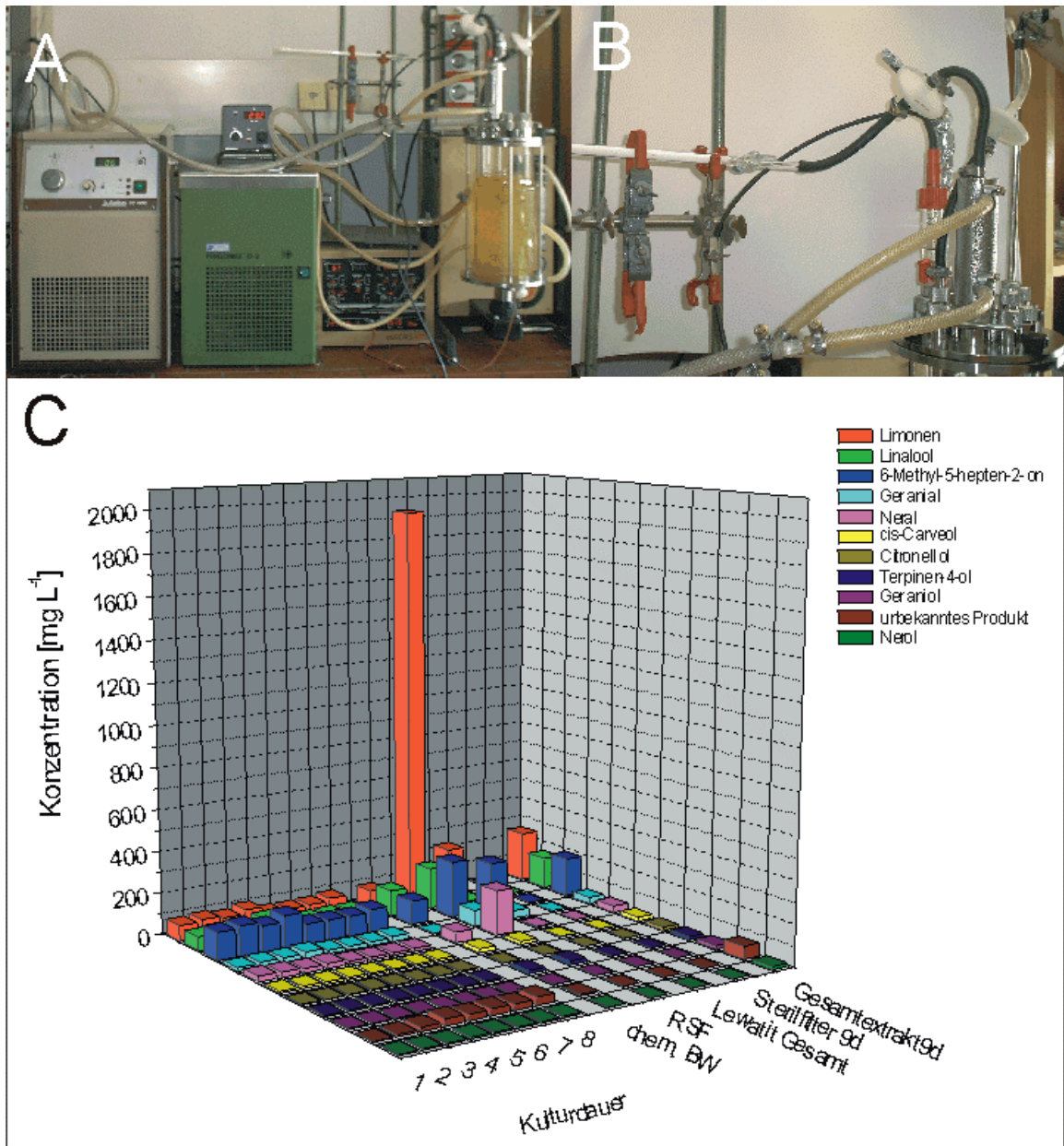


Abb. 2-20 **A** Aufbau des Bioreaktors, Abluft (10°C) und Bioreaktormantel (25°C) werden gekühlt. **B** Abluft wird über Lewatit-Adsorbersäule geführt. **C** Bilanzierung der Stoffströme

Es konnte gezeigt werden, dass Limonen aus dem Medium des Kulturansatzes entfernt wurde. Über den Kulturverlauf von 8 Tagen konnten lediglich Restmengen an Limonen wiedergefunden werden. Durch die nun erstmals mögliche

Bilanzierung des gesamten Ansatzes (Medium, Mycel, Abluft) konnte ein Austreiben des Limonens sowie eine lipophile Anreicherung am Mycel ausgeschlossen werden. Nach kurzer Zeit (1 d) war das Limonen auch durch Extraktion mit Lösungsmittel lediglich mit  $74 \text{ mg}^{-1}$  bilanzierbar.

Die aus diesen Ergebnissen resultierende Fragestellung war, inwieweit die Limonenkonzentration mit dem Glucosegehalt korreliert, da das Limonen gezielt verbraucht wurde, ohne dass ein signifikanter Abbau der Glucose feststellbar war. Daher wurde im folgenden Abschnitt (2.2.13) der Glucoseabbau näher untersucht.

### **2.2.13 Glucoseabbau bei Dosierung von 30 mM Limonen**

Um den vom Glucosegehalt unabhängigen Limonenabbau experimentell zu erfassen, wurde in der Kulturführung der Gehalt an Glucose bei gleichbleibender Limonensupplementierung (30 mM) variiert.

Gewählt wurden die Konzentrationen 10 mM, 25 mM, 75 mM, 100 mM und 125 mM Glucose. Der Kulturverlauf wurde anhand der Feuchtmasse, des pH-Wertes und des Glucosegehaltes verfolgt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 2-21 dargestellt.

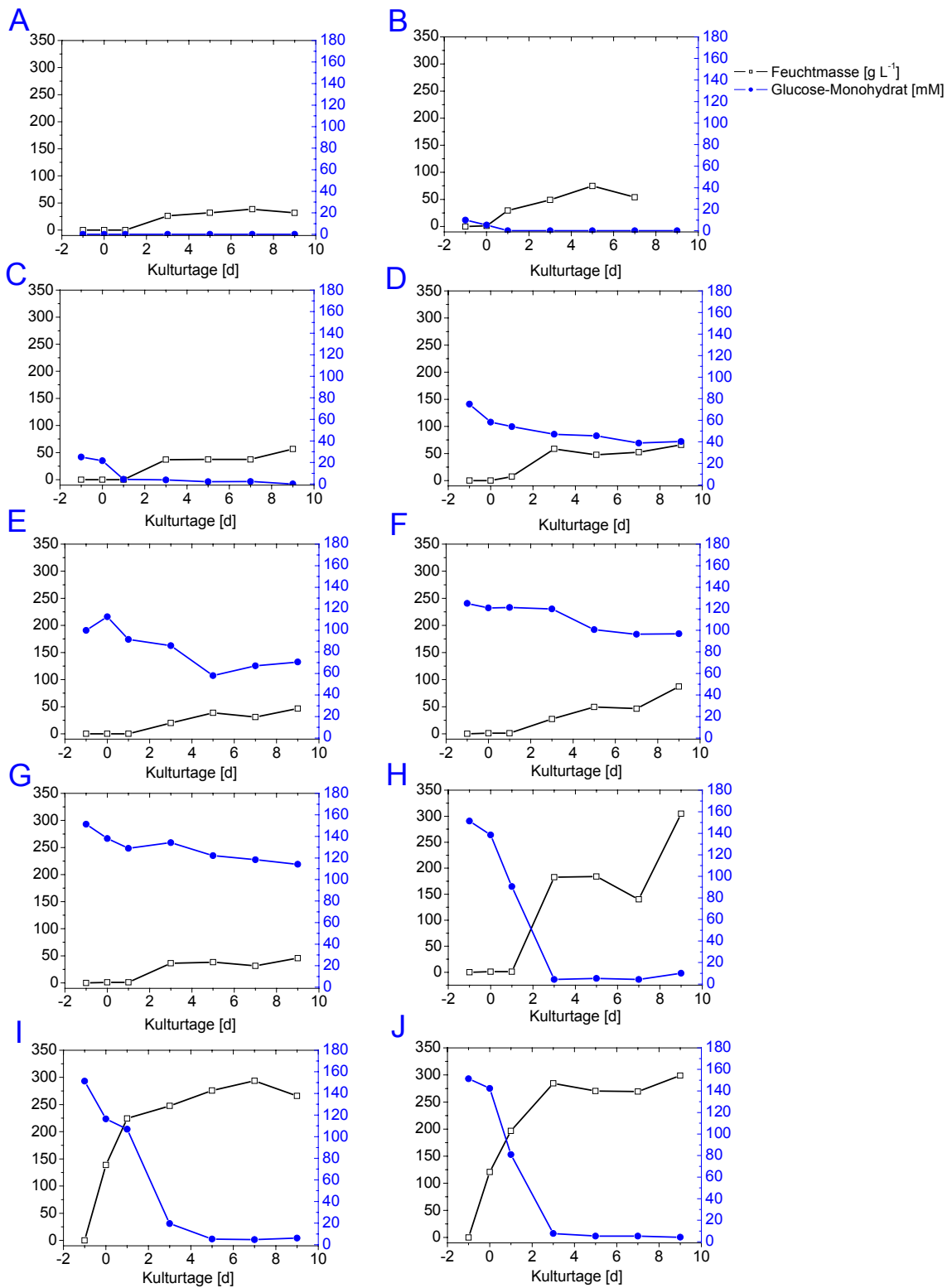


Abb. 2-21 A-H *Penicillium solitum* (Eigenisolat), A 0 mM Glucose, B 10 mM Glucose, C 25 mM Glucose, D 75 mM Glucose, E 100 mM Glucose, F 125 mM Glucose, G 150 mM Glucose, H 150 mM Glucose und 0 mM Limonen, I-J *Penicillium italicum* (DSMZ 2755) I 150 mM Glucose, J 150 mM Glucose und 0 mM Limonen. Alle außer H und J 30 mM Limonensupplementierung am Kulturtag 0

Für diesen Experimentansatz musste ein anderer Organismus als Negativkontrolle verwendet werden, da *Penicillium citrinum* nachweislich zur Transformation von Limonen befähigt ist (Kaspera 2004). Ausgewählt wurde der Organismus *Penicillium italicum* (DSMZ 2755).

Bei dem Vergleichsorganismus *Penicillium italicum* (DSMZ 2755) kam es sowohl mit als auch ohne Dosierung von Limonen zu einer kontinuierlichen Abnahme der im Medium befindlichen Glucose (Abb. 2-21 I und J). Bereits nach 4 bzw. 5 Tagen war die Glucose vom Organismus vollständig aufgezehrt. Im Gegensatz dazu zeigte *Penicillium solitum* nur ohne Limonensupplementierung eine Zehrung der Glucose (Abb. 2-21 H). Hier war die Glucose nach 3 Tagen vollständig veratmet. Bei Limonensupplementierung hingegen kam es nach 9 Tagen lediglich zu einer Zehrung von 23,97 mM Glucose (Abb. 2-21 G). Der Anstieg des Feuchtgewichtes von *Penicillium solitum* während des Kulturverlaufes blieb außer bei den Blindversuchen (ohne Terpensupplementierung) weitgehend konstant.

Zur vergleichenden Übersicht sind die Verläufe der Glucosekonzentrationen der verschiedenen Kultivierungen in einer Grafik zusammengefasst (Abb. 2-22). Die Dosierungen der gleichen Menge Limonen führten bei einem Glucosegehalt von 10 mM bzw. 25 mM zu einem Abbau der gesamten Glucose am 1. Kulturtag. Kulturversuche mit 75 mM, 100 mM, 125 mM bzw. 150 mM zeigten mit Ausnahme vom Kulturtag 0 eine nur leichte Abnahme des Glucosegehaltes. Auffällig war hier, dass unabhängig von dem Anfangsgehalt der Glucose die Konzentration über den Kulturverlauf um etwa 25 mM abnahm.

---

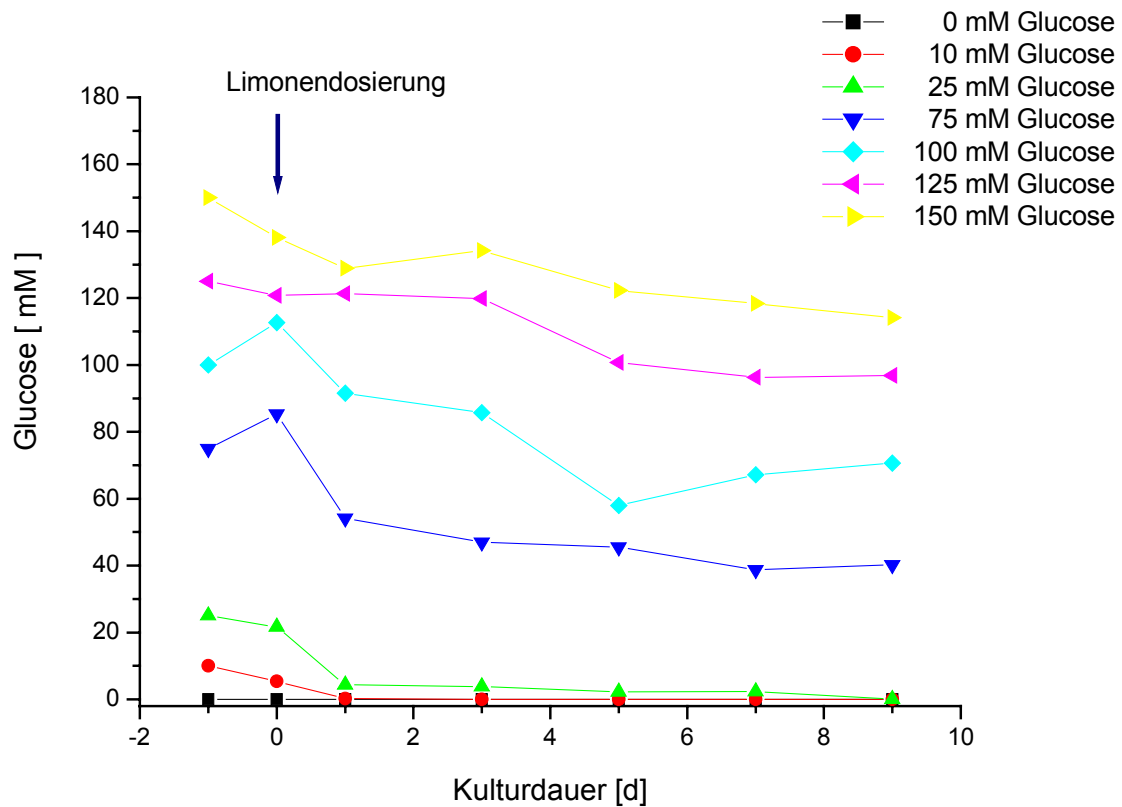


Abb. 2-22 Zusammenfassung der Glucoseabbauraten bei Variation der Glucoseanfangskonzentrationen [*Penicillium solitum* (Eigenisolat), einmalige Limonendosierung von 30 mM]

So konnte bei den gewählten Experimentbedingungen ein nahezu linearer Abbau der Glucose über einen Kulturverlauf von 9 Tagen beobachtet werden. Dieser Glucoseabbau verlief nur langsam, wenn man das stetige Anwachsen der Kultur (Feuchtmasse) über die Kulturdauer berücksichtigt (siehe Abb. 2-22). Bei den Ansätzen, bei denen bereits früh eine Glucosezehrung einsetzte, war ein steter Anstieg des Kulturfeuchtgewichtes zu beobachten.

#### 2.2.14 Glucoseabbau bei Variation der Limonendosierung

Im folgenden wurde der Glucoseabbau bei Variation der Limonendosierung untersucht. Dazu wurden 7 simultan angesetzte Kulturkolben gleicher Glucosekonzentration (150 mM) mit unterschiedlichen Mengen Limonen versetzt (0 mM, 10 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM und 75 mM). Interessant war es zu erfahren, ob sich die Zehrung der Glucose auf den Anstieg der Biomasse auswirken würde. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 2-23 resümiert.



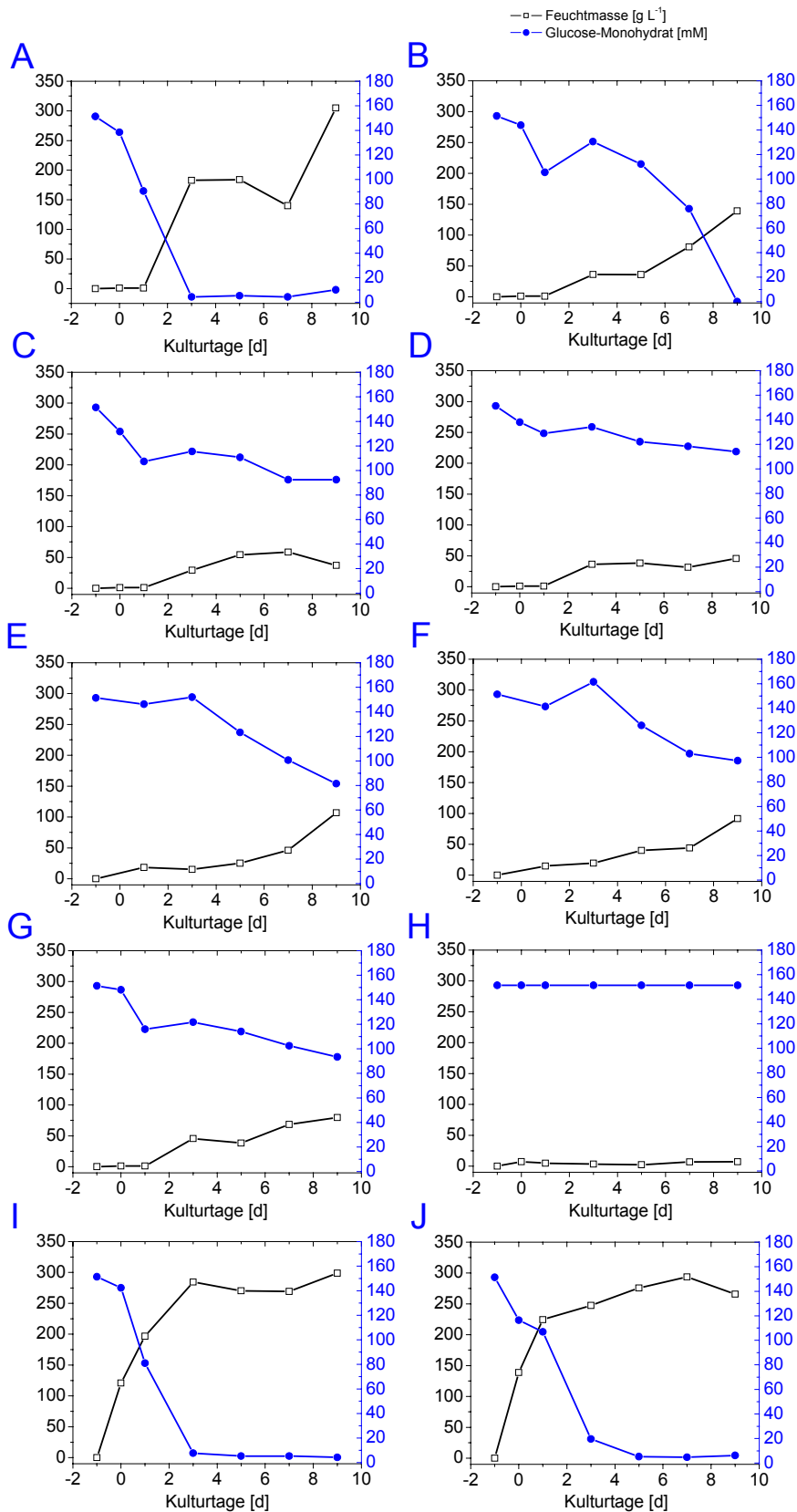


Abb. 2-23 **A-H** *Penicillium solitum* (Eigenisolat) **A** 0 mM Limonen, **B** 10 mM Limonen, **C** 25 mM Limonen, **D** 30 mM Limonen, **E** 40 mM Limonen, **F** 50 mM Limonen, **G** 75 mM Limonen, **H** chem. BW, **I** 0 mM Limonen *Penicillium italicum* DSMZ 2755, **J** 30 mM Limonen *Penicillium italicum* DSMZ 2755, jeweils 150 mM Glucose (I und J entsprechen I und J aus Abb. 2-21)

Bei Kulturansätzen ohne Limonensupplementierung kam es zur Zehrung der Glucose am dritten Kulturtag. Schon bei einer Dosierung von 10 mM Limonen wurde der Glucoseverbrauch merklich verlangsamt. Bei den Dosierungen von 25 mM, 30 mM, 50 mM und 75 mM war der Glucoseabbau ebenfalls verlangsamt bei einer annähernd gleichbleibenden Zunahme der Biofeuchtmasse. Der Anstieg der Biofeuchtmasse resultierte aus der selektiven Nutzung von Limonen als Kohlenstoffquelle. Zur der besseren Übersicht sind die Glucoseabbaukurven der verschiedenen Kultivierungsansätze in Abbildung 2-24 zusammengefasst.

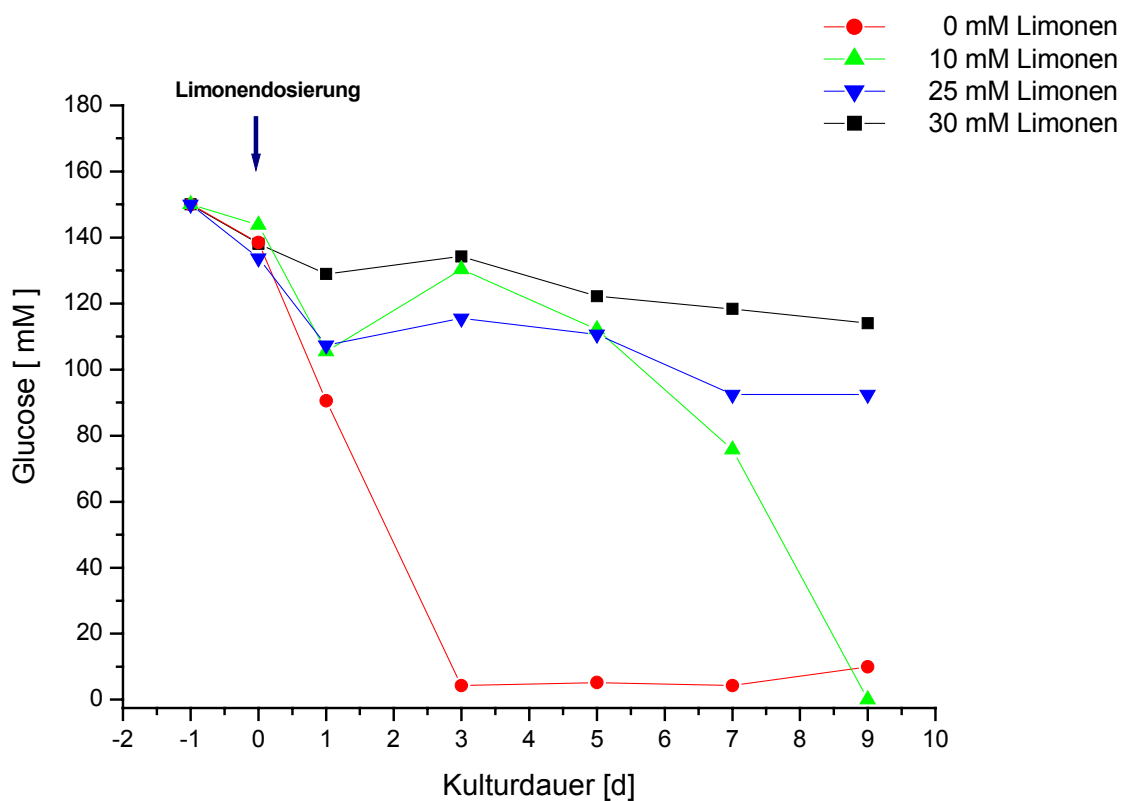


Abb. 2-24 Glucosekonzentration bei Kultivierung von *Penicillium solitum* mit Variation der Limonendosierung

Bei *Penicillium solitum* wurde ab einer Dosierung von 25 mM Limonen der Glucoseabbau während der Kulturdauer von 9 Tagen minimiert. Da trotzdem eine Zunahme des Biofeuchtgewichtes bei der Dosierung oberhalb 10 mM vorlag, kann diese auf die Degradation des Limonens zurückgeführt werden. Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, wurde im Folgeexperiment die Kinetik der Limonendegradation analysiert (2.2.15).

### 2.2.15 Quantifizierung des Limonenabbaus

Um die Annahme des selektiven Limonenabbaus zu bestätigen, wurden acht Experimentalkulturen mit gleicher Substratdosierung (30 mM) geführt. Da sich bereits nach wenigen Stunden das lipophile Limonen an das Mycel angelagert hatte und im Medium nach kurzer Zeit nicht mehr quantifizierbar war, wurde im Folgeexperiment die Limonenkonzentration von Medium und Mycel als Gesamtparameter bestimmt. Hierzu wurde am Kulturtag 0 sowie am 1., 3., 5., 7., 9., 12. und 18. Kulturtag nach Substratdosierung das Gesamtvolumen des Kulturkolbenens, aufgeschlossen und extrahiert. Anschließend wurde der Limonengehalt des Extraktes bestimmt (Abb. 2-25).

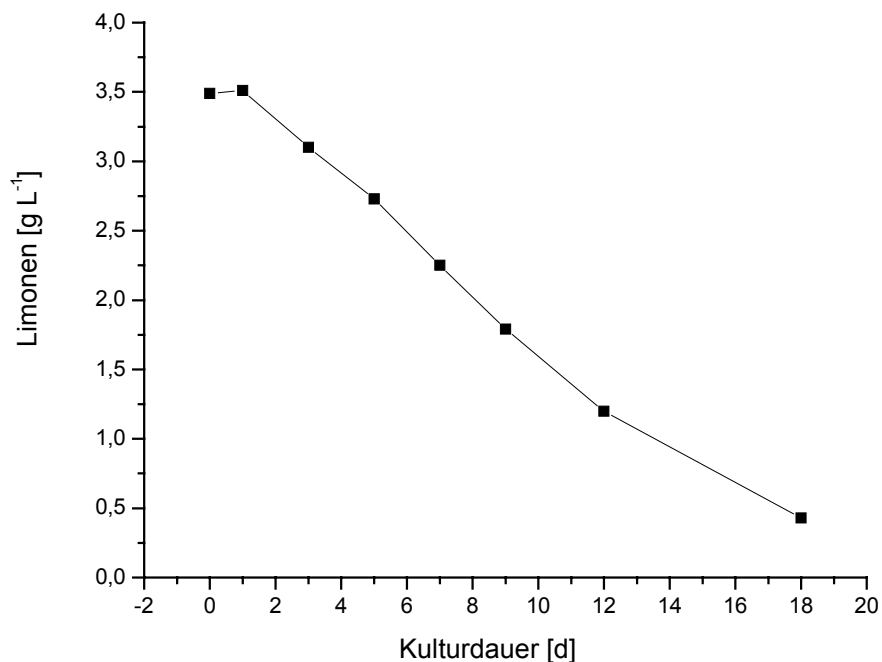


Abb. 2-25 Quantifizierung des Limonenabbaus über den Kulturverlauf von 18 Tagen (*Penicillium solitum*, 30 mM Limonensupplementierung)

Über einen Kulturverlauf von 18 Tagen wurde von *Penicillium solitum* 3,06 g L<sup>-1</sup> Limonen metabolisiert. Ein Ausschnitt der Kulturparameter in Korrelation zum Glucosegehalt ist in Abbildung 2-26 dargestellt.

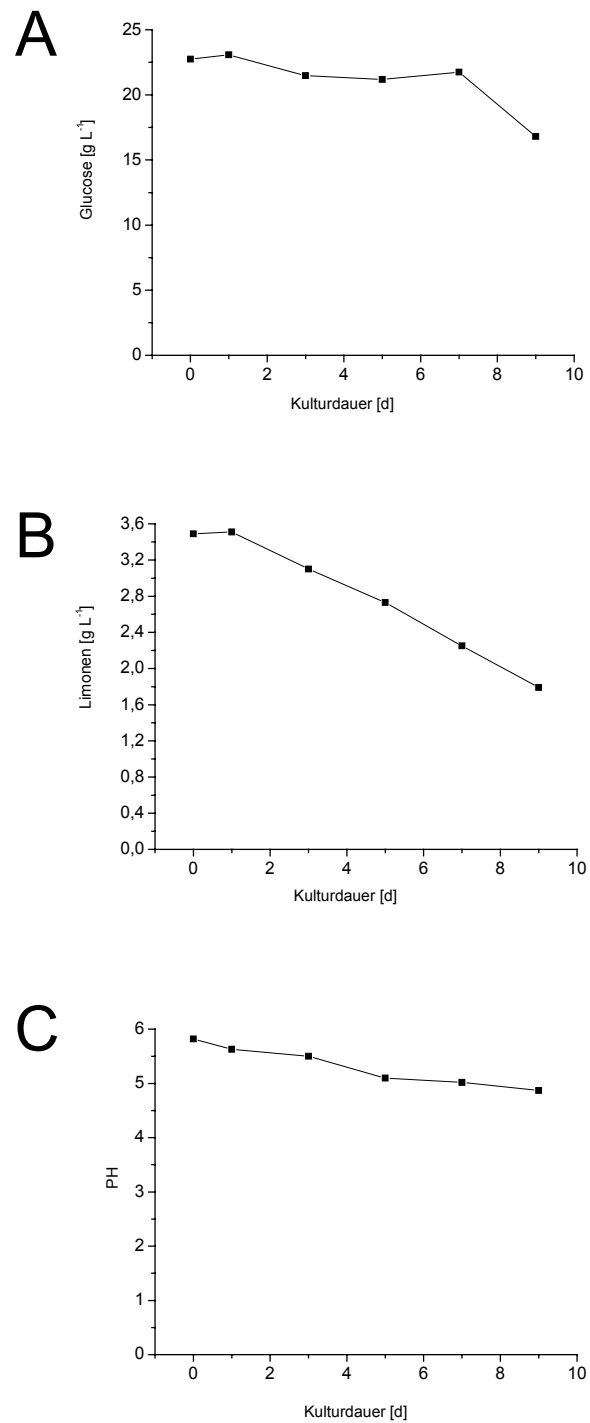


Abb. 2-26 Kulturparameter **A** Glucosekonzentration **B** Limonenkonzentration und **C** pH-Wert bei Kultivierung von *Penicillium solitum*

Unter den gewählten Bedingungen stagnierte der Glucosegehalt während der ersten sieben Tage, in denen eine fast lineare Abnahme der Limonenkonzentration erfolgte. Der pH-Wertes blieb über neun Tage stabil und zeigte somit den Verlauf einer vitalen Kultur. Bei Limonendosierung "veratmet" der Organismus zwischen Substratzugabe und 7. Kulturtag  $1 \text{ g L}^{-1}$  Glucose, im Vergleichsexperiment ohne Limonendosierung hingegen  $22 \text{ g L}^{-1}$ . Hier war offensichtlich ein Ascomycet gefunden worden, der zu einer selektiven Limonenbiodegradation in Gegenwart von Glucose befähigt ist.

### 2.2.16 Teil-Zusammenfassung

- Der Organismus *Penicillium solitum* konnte neben zahlreichen Biotransformationen ( $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Limonen) authentisch anfallende RSF veredeln und aufkonzentrieren.
  - *Penicillium solitum* katabolisierte hohe zudosierte Mengen von Limonen ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) und betrieb in glucosereichen Medien keinen nennenswerten Glucoseabbau, solange Limonen verfügbar war.
-

## 2.3 Biotransformation des acylischen Monoterpens $\beta$ -Myrcen zu Perillen

Die preiswerte Ausgangsverbindung  $\beta$ -Myrcen, die für eine Biotransformation zu Perillen verwendet werden kann, fällt mit 2% bei der Aufkonzentrierung von Mandarinenölen an. Daneben stellt  $\beta$ -Myrcen mit 33 bis 48% einen Hauptbestandteil des Hopfenöls (*Humulus lupulus*) dar (Fric 1996).

### 2.3.1 Stammscreening: Transformationsleistung ausgewählter Mikroorganismen

36 ausgewählten Stämme (siehe 4.1) wurden einem Screening in Submerskultivierung unterzogen. Die Vorkultur wurde direkt von den Kulturplatten angeimpft und anschließend 2%ig in die Experimentalkultur inokuliert. Eine Dosierung von  $\beta$ -Myrcen erfolgte direkt ins Medium. Eine Tabelle mit den Transformationsprodukten befindet sich im Anhang.

Da Terpenkohlenwasserstoffe selbst bei milden Bedingungen der Submerskultivierung (Raumtemperatur, neutraler pH-Wert) zur Autoxidation und Polymerisierung neigen, wurde bei jedem Experiment ein chemischer Blindwert sowie ein alternativer Blindwert als Negativkontrolle mitgeführt. Als alternativer Blindwert fungierte ein Organismus, der, wie sich aus Vorversuchen erwies, kein Potential zur Transformation von  $\beta$ -Myrcen zu Perillen besaß. In diesem Fall handelte es sich um den Ascomyceten *Penicillium citrinum* (DSMZ 1179). Um die Experimentdaten diskutieren zu können, müssen die Ergebnisse immer mit diesen beiden Referenzwerten korreliert werden.

### 2.3.2 Identifizierung der Metabolite

Die flüchtigen Bestandteile des Kulturüberstandes (100 mL) wurden durch Flüssig/Flüssig-Extraktion extrahiert und anschließend aufkonzentriert. Die flüchtigen Verbindungen wurden mittels GC-FID, GC-O sowie GC-MS analysiert.

Von 36 gescreenten Organismen zeigten 6 Organismen der Gattung *Pleurotus* ein Potential zur Perillenbildung (Tab. 2-8). Alle positiv durchmusterten Organismen waren ausnahmslos Basidiomyceten.

---

Tab. 2-8 Ausgewählte Mikroorganismen der Biokonversion von  $\beta$ -Myrcen

Organismus	Stamm	Einteilung	Literatur	Perillen- bildung
<i>Penicillium citrinum</i>	DSMZ1179	Ascomycet	Diese Arbeit	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DSMZ 1020	Basidiomycet	Diese Arbeit	+
<i>Pleurotus flabellatus</i>	CBS 665,85	Basidiomycet	(Busman und Berger 1994)	+
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSM 8266	Basidiomycet	(Busman und Berger 1994)	+
<i>Pleurotus eryngii</i>	CBS 323,49	Basidiomycet	Diese Arbeit	+
<i>Pleurotus eous</i>	DSMZ 5331	Basidiomycet	Diese Arbeit, (Drawert et al.1983)	+
<i>Pleurotus lampas</i>	CBS 323,49	Basidiomycet	Diese Arbeit	+

Alle sechs Basidiomyceten waren in der Lage, bei einer Terpensupplementierung von 30 mM, Perillen aus  $\beta$ -Myrcen zu synthetisieren. Über den Kulturverlauf konnte eine Vielzahl von Intermediaten, wie Abbildung 2-27 zeigt, mittels GC-O bewertet werden. Die Zielkomponente Perillen wurde anhand ihres charakteristischen Massenfragmentmusters und ihrem an Rosen erinnernden Geruches eindeutig identifiziert (Abb. 2-27 unten).

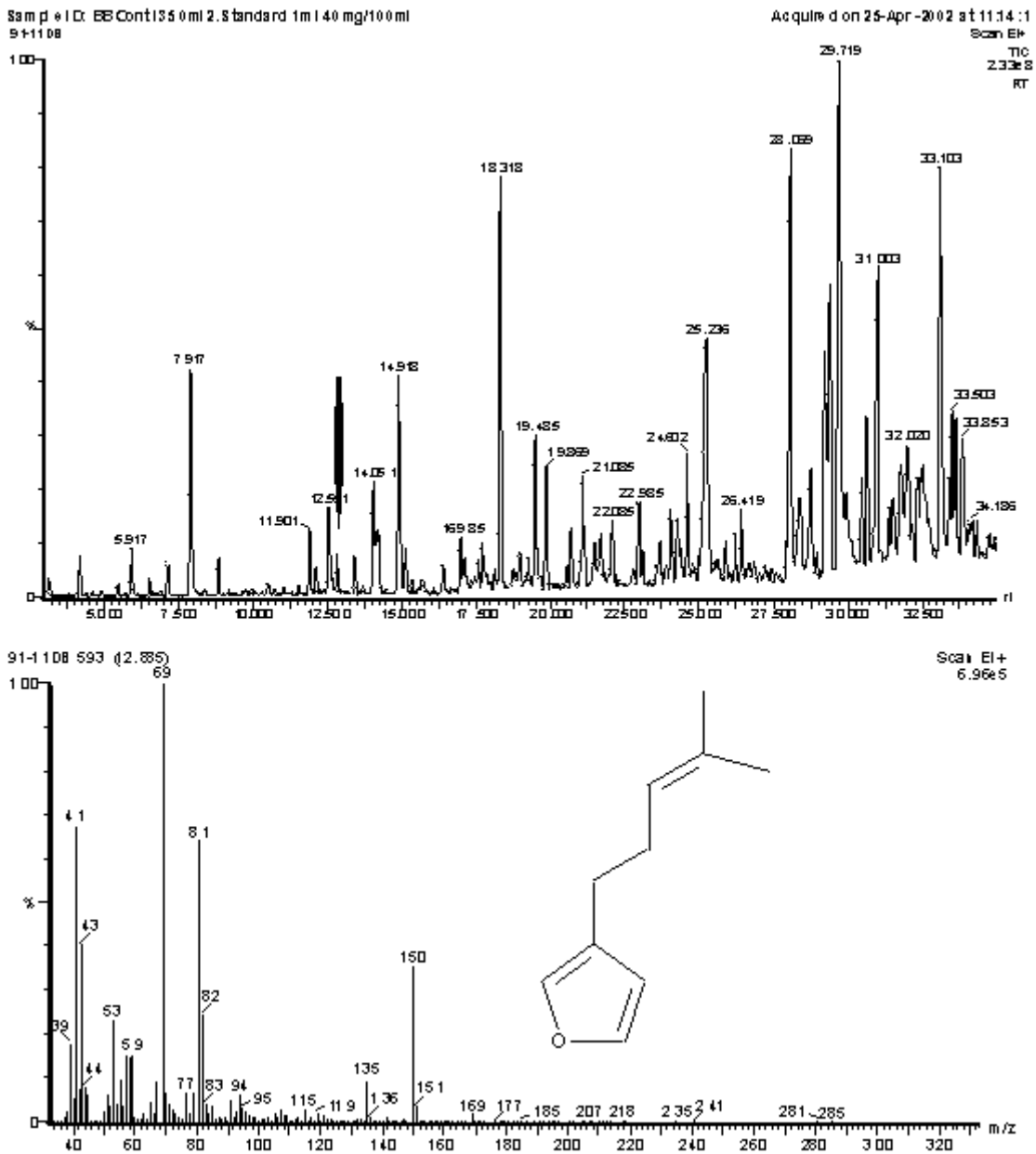


Abb. 2-27 **A** Transformationsprofil von *Pleurotus lampas* bei Supplementierung mit  $\beta$ -Myrcen  
**B** Massenspektrum von Perillin

Eine quantitative Bewertung der Perillenbildung ist in Abbildung 2-28 dargestellt.



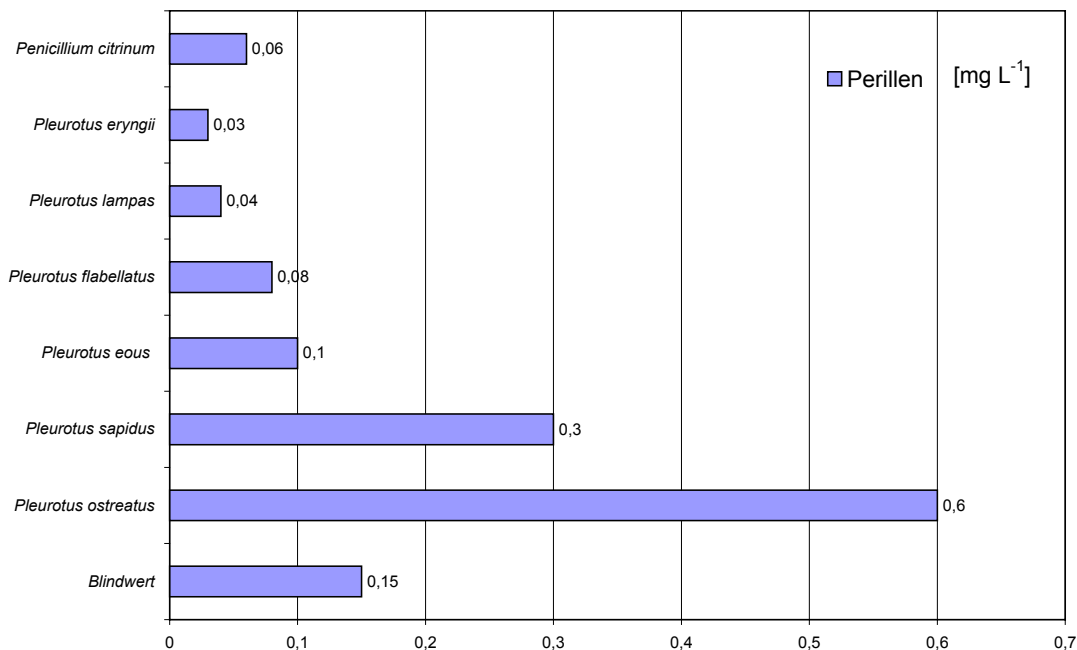


Abb. 2-28 Perillenbildung einiger Mikroorganismen bei optimierter Sauerstoffeintragsrate, die Quantifizierung erfolgte durch GC-MS am 8. Kulturtag

Erst eine Verminderung des Medienvolumens von 400 mL auf 200 mL zeigte eine Steigerung der Perillenbildung, die signifikant über denen des Blindwertes lagen. Der Organismus *Pleurotus ostreatus* (DSMZ 1020) zeigt die vierfache Perillenakkumulation im Vergleich zum Blindwert. Beim Vergleich der Transformationsleistungen erwies sich also diese Spezies (*Pleurotus ostreatus*) in Bezug auf Kulturführung und Wachstumsgeschwindigkeit zur Perillenbildung als geeignet.

### 2.3.3 Wachstumsverlauf von *Pleurotus ostreatus* bei $\beta$ -Myrcen-Supplementierung

Die gesamte Transformationsdauer betrug (ohne Anwuchszeit) zwischen 3 und 10 Tagen. Bereits am dritten Kulturtag konnte das Zielprodukt Perillen identifiziert werden. Am achten Kulturtag war die Kulturtrockenmasse von  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  auf  $1,13 \text{ g L}^{-1}$  angestiegen. Die Identifizierung der sensorisch aktiven Verbindungen erfolgte aufgrund von MS-Daten (GC-MS), Geruch (GC-O) und Kováts-Indizes (GC-FID). Das nachgewiesene Transformationsprodukt ist in Abbildung 2-29 dargestellt.

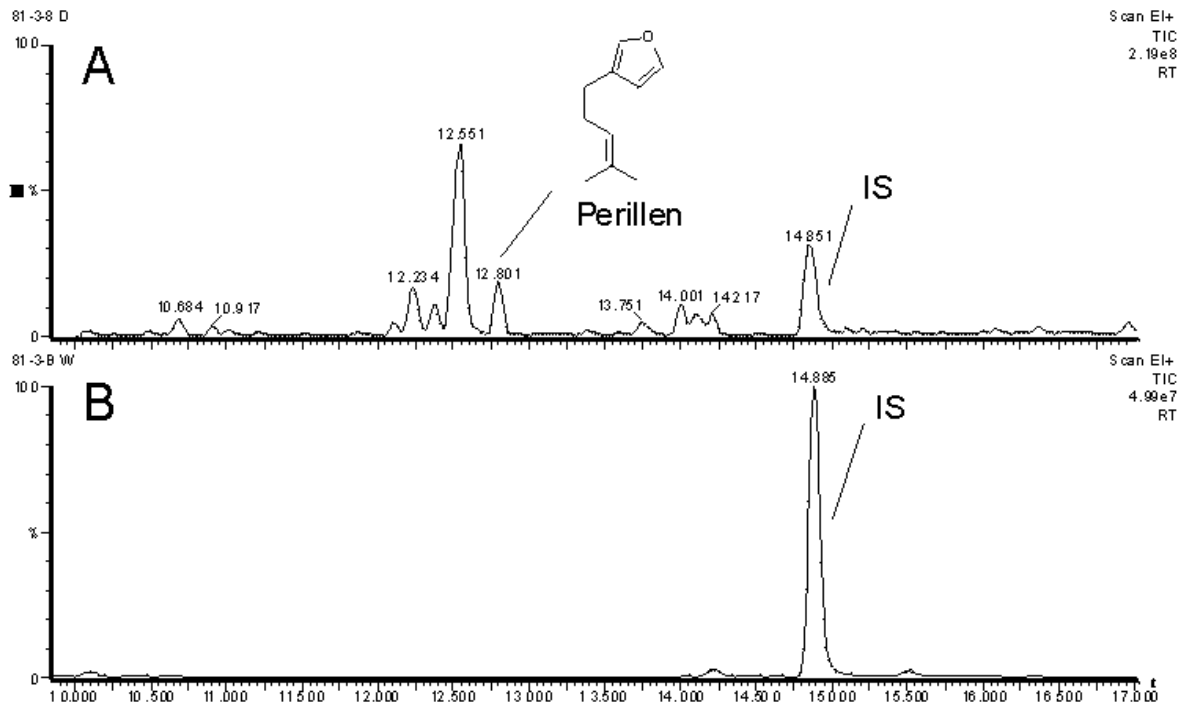


Abb. 2-29 **A** Transformationsprofil von *Pleurotus ostreatus* (DSMZ 1020) mit Dosierung von 30 mM und **B** 0 mM  $\beta$ -Myrcen

### 2.3.4 Optimierungsversuche durch Emulgatorzugabe

Es wurde versucht, eine Optimierung der Bioverfügbarkeit von Myrcen durch Emulgatorzugabe zu erreichen. Mit dem Substrat Myrcen wurde vor Dosierung eine Emulsion hergestellt, die für 12 h stabil war. Auf 800 mg Myrcen wurde 20 mg Emulgator gegeben. Das emulgierte Substrat sollte im Überschuss vorliegen und keine zusätzliche Kohlenstoffquelle darstellen. Allerdings ließen sich durch Zugabe von Cremophor® [Polyoxyethylenglyceroltricinoleat 35] als Emulgator nur leicht erhöhte Produktausbeuten erzielen. Bei der Transformation von Myrcen konnte eine Vielzahl von neuen Metaboliten identifiziert werden. Als Haupttransformationsprodukte konnten folgende Verbindungen mit der Perillenbildung korreliert werden (Abb. 2-30).

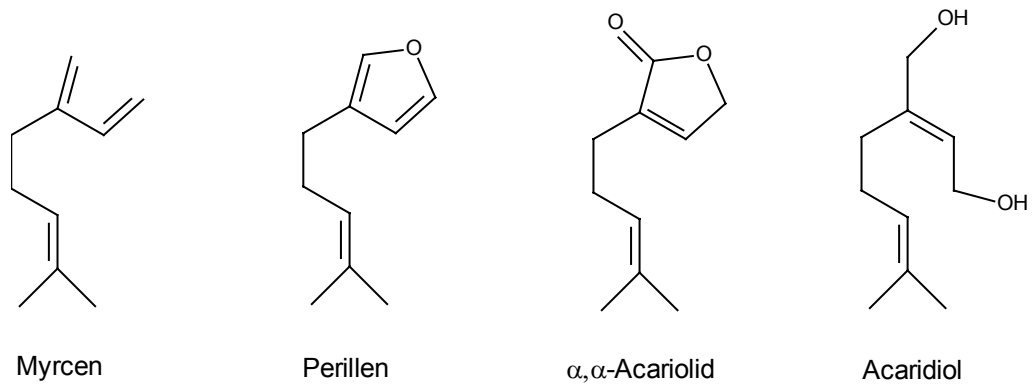


Abb. 2-30 Transformationsprofil von *Pleurotus ostreatus* bei  $\beta$ -Myrcen Dosierung

Diese Metabolite wurden anhand GC-FID und ihrer Massenspektren (GC-MS) identifiziert.

Tab. 2-9 Konversionsprodukte [ $\text{mg L}^{-1}$ ] von Myrcen durch *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus lampas* bei optimiertem Sauerstoffeintrag

	Perillen	$\alpha, \alpha$ -Acariolid	Acariolid	Myrcenol	Geraniol	Rosenoxid
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,60	0,40	3,00	0,57	0,008	+
<i>Pleurotus lampas</i>	0,04	0,27	5,98	0,10	0,04	+
RI	1381	2002	1947	1638	1720	+

+ qualitativ nachgewiesen

Eine Quantifizierung der Bildungsprodukte ist in Tabelle 2-9, die Massenspektren in Abbildung 2-31 dargestellt.

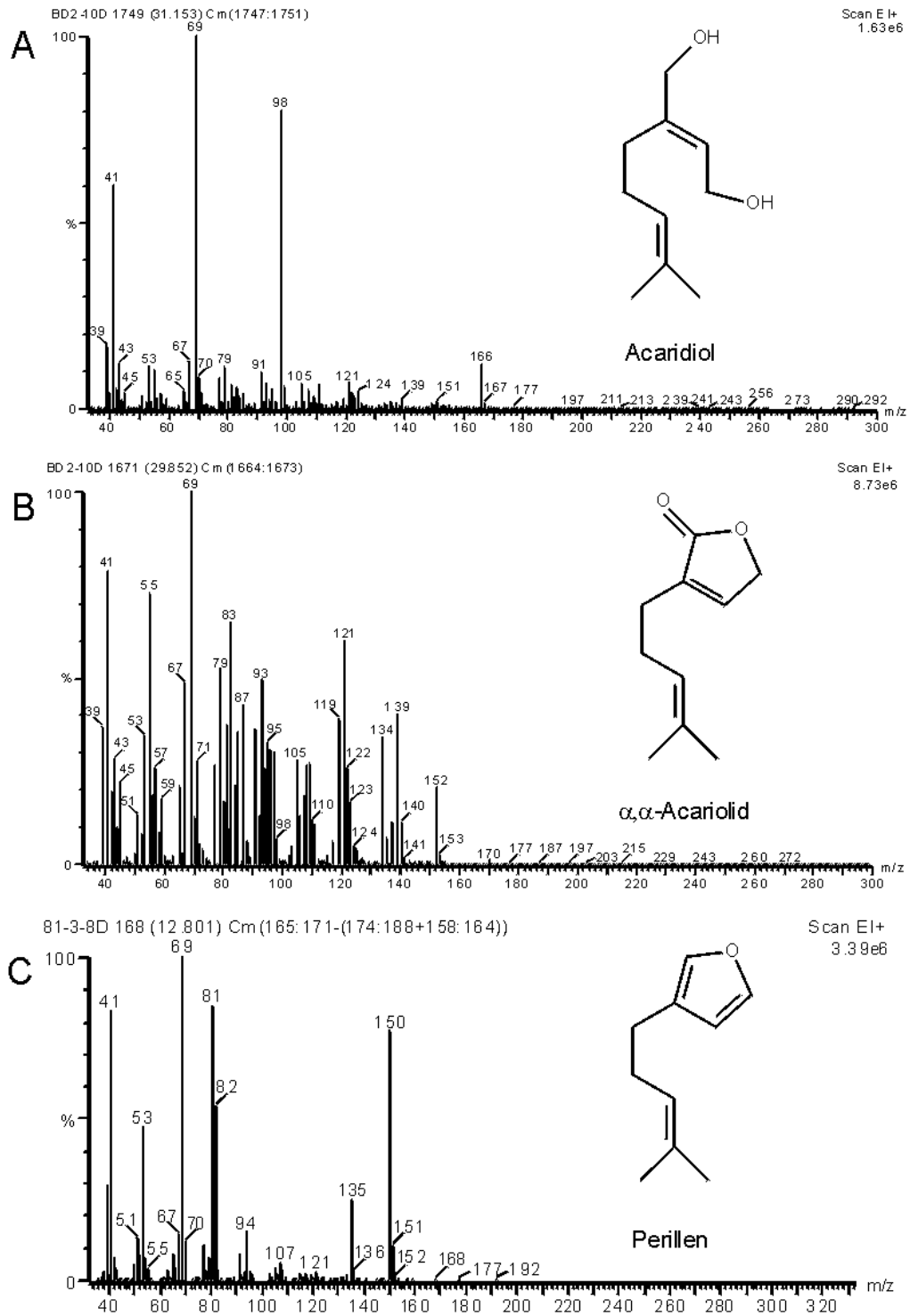


Abb. 2-31 **A** Massenspektrum von Acariol, **B** Massenspektrum von  $\alpha,\alpha$ -Acariolid, **C** Massenspektrum von Perillen aus Kultivierung von *Pleurotus ostreatus* (DSMZ 1020) bei  $\beta$ -Myrcen Supplementierung

### 2.3.5 Isolierung von Perillen aus *Perilla frutescens*

Da Perillen als authentischer Standard kommerziell nicht verfügbar und die Chemosynthese sehr aufwendig ist, wurde das etherischen Öl von *Perilla frutescens* untersucht. Bei diesem Experiment wurde parallel ein methanolischer Aufschluss und eine Chlorophyllfällung durchgeführt. Es konnten Perillen sowie Rosenfuran anhand der Massenspektren identifiziert werden (Abb. 2-32).

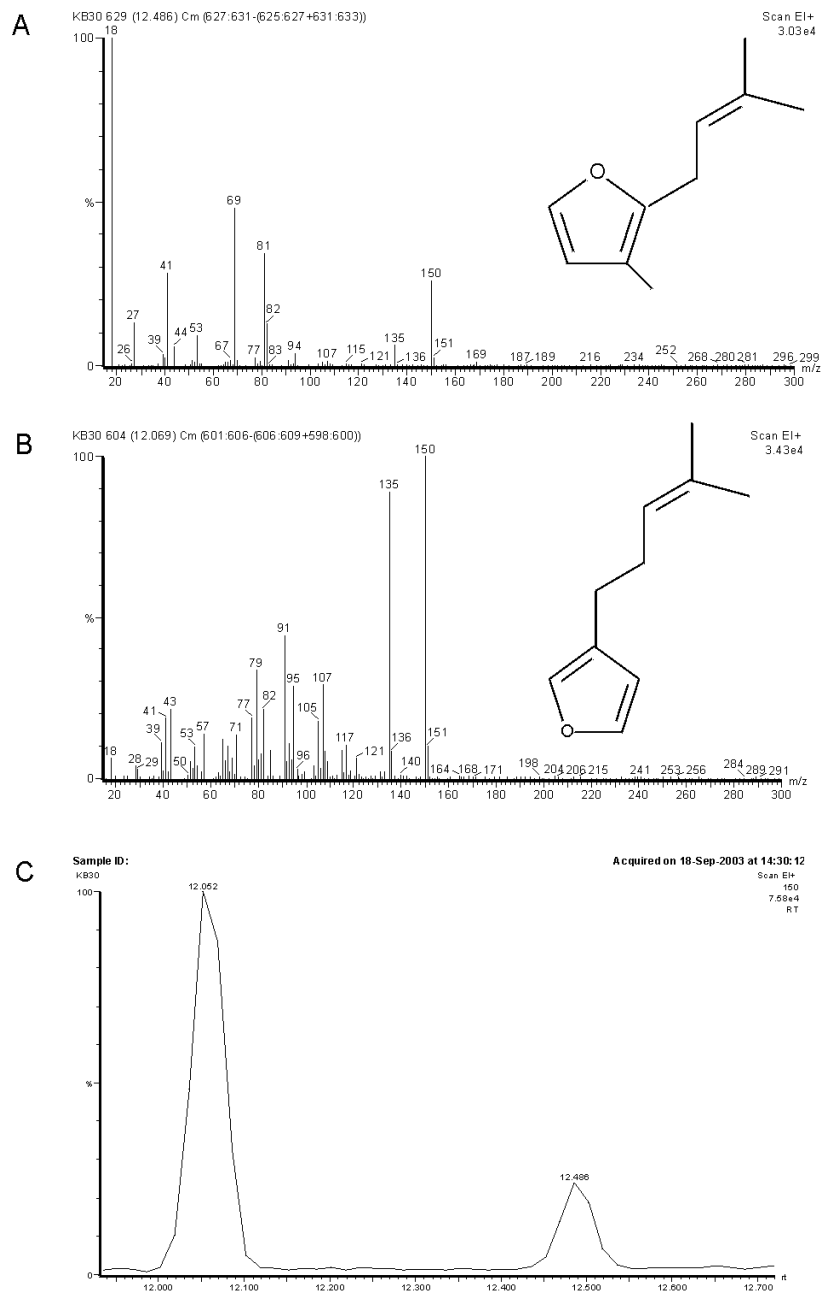


Abb. 2-32 **A** Massenspektrum von Rosenfuran sowie **B** Massenspektrum von Perillen aus dem etherischen Öl von *Perilla frutescens* **C** Ausschnittsvergrößerung des RIC

Die Furanmonoterpene Perillen und Rosenfuran konnten eindeutig identifiziert werden.

### 2.3.6 Teil-Zusammenfassung

Zur Optimierung der Perillen-Produktausbeute bot sich die Variation des Verhältnisses von Oberfläche der Submerskultur zu Kulturvolumen (Medienvolumen) an. Erst ein Kulturvolumen von 200 mL in 500 mL Kulturkolben ermöglichte eine Steigerung der Perillenkonzentration im Vergleich zum chemischen Blindwert. Eine geringe Verbesserung der Löslichkeit und somit der Verfügbarkeit des Substrates konnte durch Zugabe von Emulgatoren beobachtet werden. Daher wurde die Wirkung einer Dosierung des Substrates in Emulsionen auf die Transformationsrate der Myrcenbiokonversion untersucht.

Es konnte eine Produktbildung von  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  durch *Pleurotus ostreatus* etabliert werden.

Zahlreiche andere sensorisch wertvolle Verbindungen bilden die Haupttransformationsprodukte.

---

## 2.4 Biotransformation von $\gamma$ -Terpinen

Im Rahmen des Screenings wurden 36 Organismen einer  $\gamma$ -Terpinen Dosierung unterzogen. Für über 90% der Organismen war die Dosierung von 15 mM letal. Nur ein einziger Organismus zeigte im Vergleich zu den verbleibenden 35 Organismen ein Transformationsprodukte im zweistelligen Milligrammbereich (Abb. 2-33).

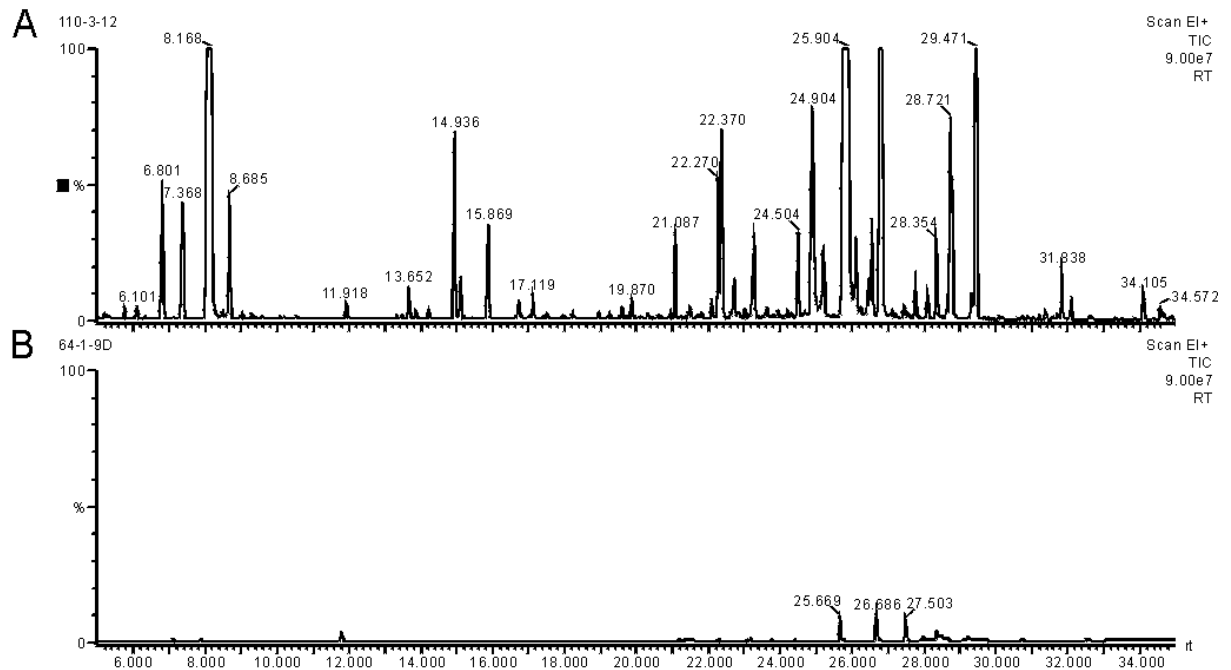


Abb. 2-33 Vergleich der Produktvielfalt von Organismus **A** Salbeiisolat (Selbstisolat) und **B** *Thelebolus caninus* (CBS 710,69)

Hierbei handelte es sich um ein Isolat aus Salbei, das sich im Gegensatz zu anderen  $\gamma$ -Terpinen transformierenden Organismen (*Thelebolus*) neben einem ausreichenden Transformationsvermögen durch schnelles Wachstum und eine hohe Substrattoleranz auszeichnete. Bei der Isolierung des Organismus konnte von einer erhöhten Terpentoleranz ausgegangen werden, da dieser phytopathogene Pilz in der Lage war, selektiv auf den terpenhaltigen Drüsenhaaren der Salbei-Pflanze (*Salvia officinale*) zu wachsen, wie Abbildung 2-34 verdeutlicht.

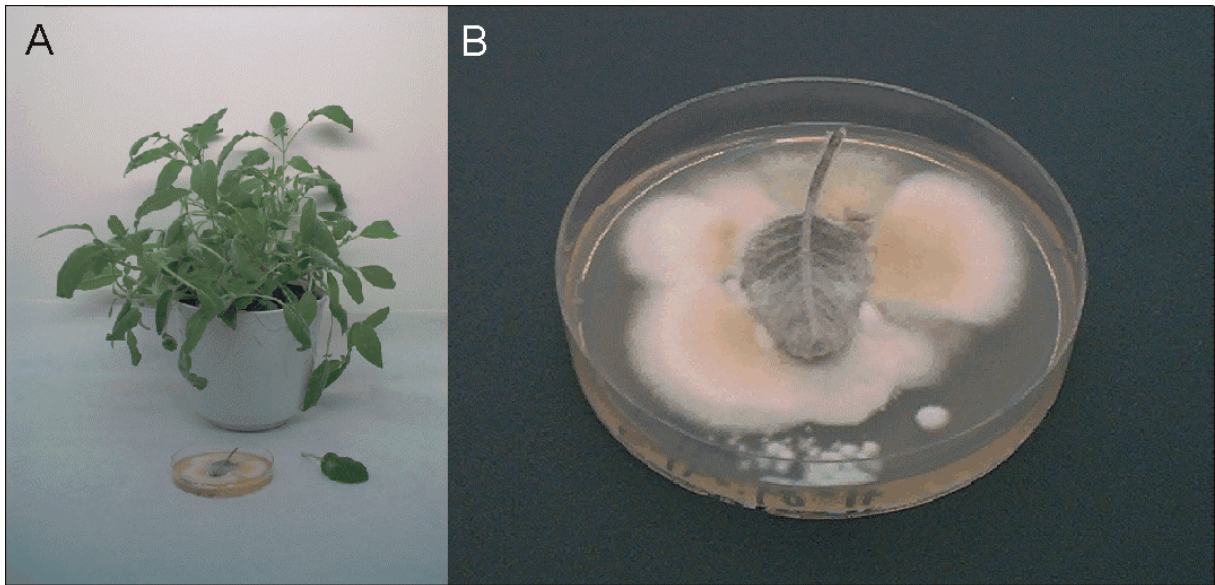


Abb. 2-34 A Isolierung eines Deuteromyceten aus der natürlichen Quelle (*Salvia officinale*), B Habitus von *Stemphylium botryosum* (Wallroth), Synonym *Pleospora herbarum*.

#### 2.4.1 Identifizierung eines Salbeiisolats

Das Salbeiisolat wurde der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) zur Bestimmung übersandt. Das Isolat wurde anhand der morphologischen Merkmale überprüft und als *Stemphylium botryosum* (Wallroth) identifiziert. Die genaue phylogenetische Einordnung und Klassifizierung ist im folgenden Absatz zusammengefasst.

Taxonomie: *Eukaryota*; *Fungi*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Dothideomycetes*; *Pleosporales*; *Pleosporaceae*; *Pleosporaceae*

Um einige der an den anabolen Prozessen beteiligten Verbindungen zu charakterisieren, wurde eine sensorische Bewertung der Intermediate bzw. der im Medium befindlichen flüchtigen Verbindungen mittels GC-O durchgeführt. Ein Chromatogramm inklusive der sensorischen Eindrücke ist in Abbildung 2-35 dargestellt.



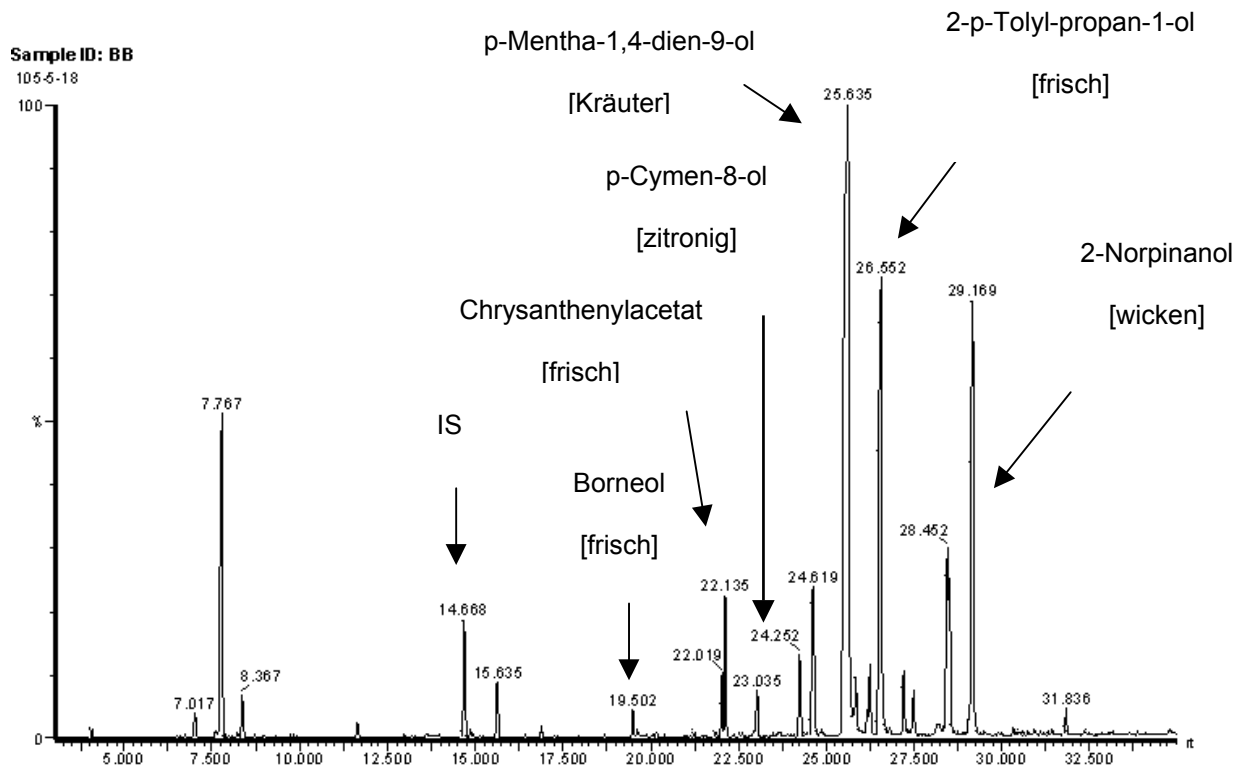


Abb. 2-35 GC-O Chromatogramm mit einigen aromarelevanten Verbindungen von *Stemphylium botryosum* (Selbstisolat) am 18. Kulturtag nach  $\gamma$ -Terpinen-supplementierung (15 mM)

Der Extrakt aus 100 mL Kulturmedium wurde hierzu dreimal einer Analyse mittels GC-O unterzogen. So konnten sechs sensorisch interessante Verbindungen identifiziert werden: Chrysanthenylacetat und p-Cymen-8-ol (frisch, zitronig), p-Cymen-9-ol, Norbornan und 2-Norpinanol (blumig) und p-Mentha-1,4-dien-9-ol (würzig, krautig). Das Haupttransformationsprodukt zeigte sowohl intensiv würzige Kräuternoten als auch mentholische, grüne, an Waldboden erinnernde Geruchseindrücke. Auffällig war, dass die Sensorik des Hauptproduktes an die herben, moosigen, Chypre und Fourgère-Noten des Salbeiöl erinnerte. Um den Aromastoff zu charakterisieren, wurde eine Verdünnungsanalyse durchgeführt (Abb. 2-36).

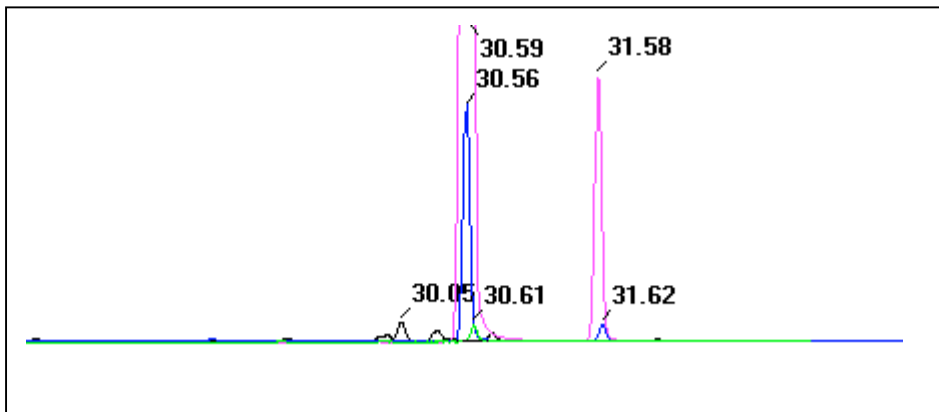


Abb. 2-36 GC-O Chromatogramm, Verdünnungsanalyse von p-Mentha-1,4-dien-9-ol, rosa Linie 0,8  $\mu\text{g}$  (absolut); Sensorik: frischer Dill, blaue Linie 5,6  $\mu\text{g}$  (absolut), Sensorik: getrockneter Dill, grüne Linie 4,0 ng, Geruchswahrnehmung

Bei der Verdünnungsanalyse wurden intensive Dillnoten beschrieben. Eine spezifische Geruchswahrnehmung konnte noch bei einer Konzentration von 5,6  $\mu\text{g}$  (absolut) p-Mentha-1,4-dien-9-ol verzeichnet werden.

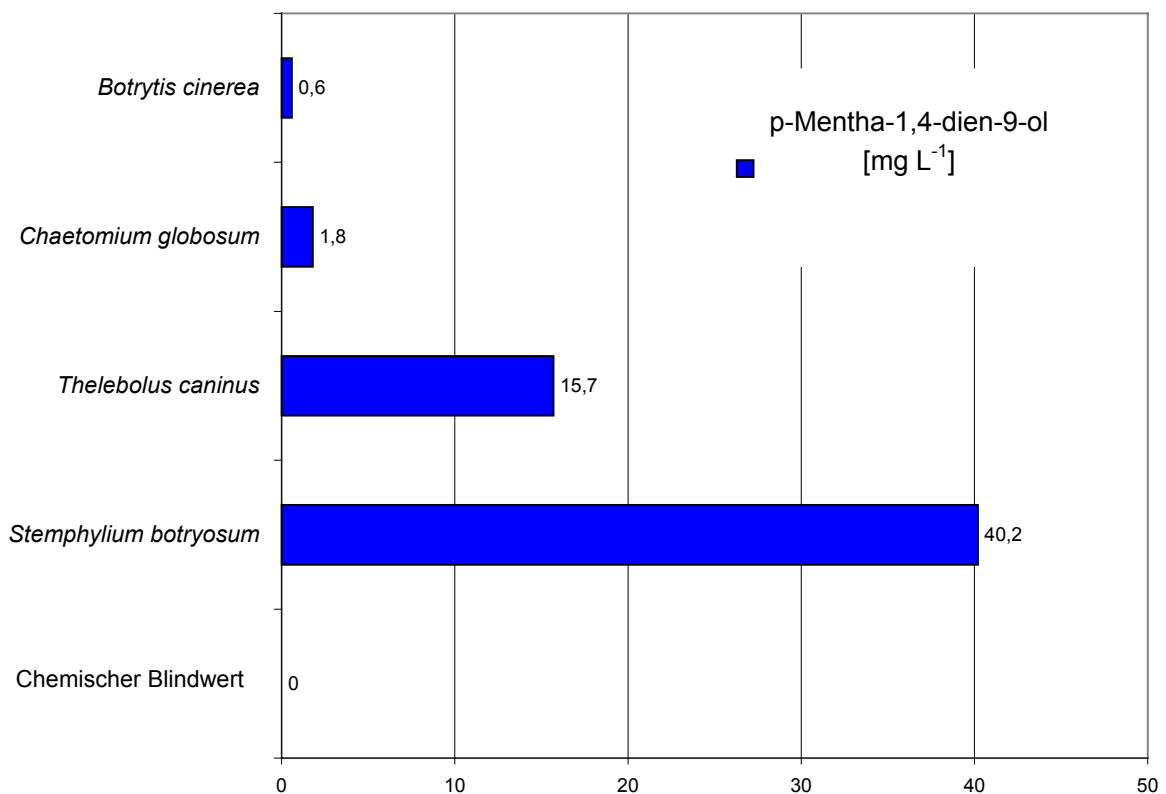


Abb. 2-37 Bildung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol bei der Biotransformation von  $\gamma$ -Terpinen durch ausgewählte Mikroorganismen

Bei der Biotransformation von  $\gamma$ -Terpinen wurden am 18. Kulturtag  $40 \text{ mg L}^{-1}$  p-Mentha-1,4-dien-9-ol gebildet. Transformationen im zweistelligen Milligramm-Bereich zeigte außerdem *Thelebolus caninus*, wesentlich geringere Produktbildung wiesen *Botrytis cinerea* und *Chaetomium globosum* auf (Abb. 2-37).

Aufgrund der hohen Konzentrationen an gebildeten p-Mentha-1,4-dien-9-ol und der ungewöhnlichen Hydroxilierung einer nicht aktivierten Methylgruppe, wurden auch die weiteren Transformationsprodukte von *Stemphylium botryosum* untersucht. *Thelebolus caninus*, *Chaetomium globosum* und *Botrytis cinerea* wurden in der Arbeit nicht weiter verfolgt.

Neben dem Haupttransformationsprodukt wurden alle weiteren Transformationsprodukte untersucht und mit Hilfe von authentischen Standards, Kovats-Indizes und Massenspektren sowie den sensorischen Daten charakterisiert (Davies 1990, Jennings et al. 1980). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 2-38 dargestellt.

---

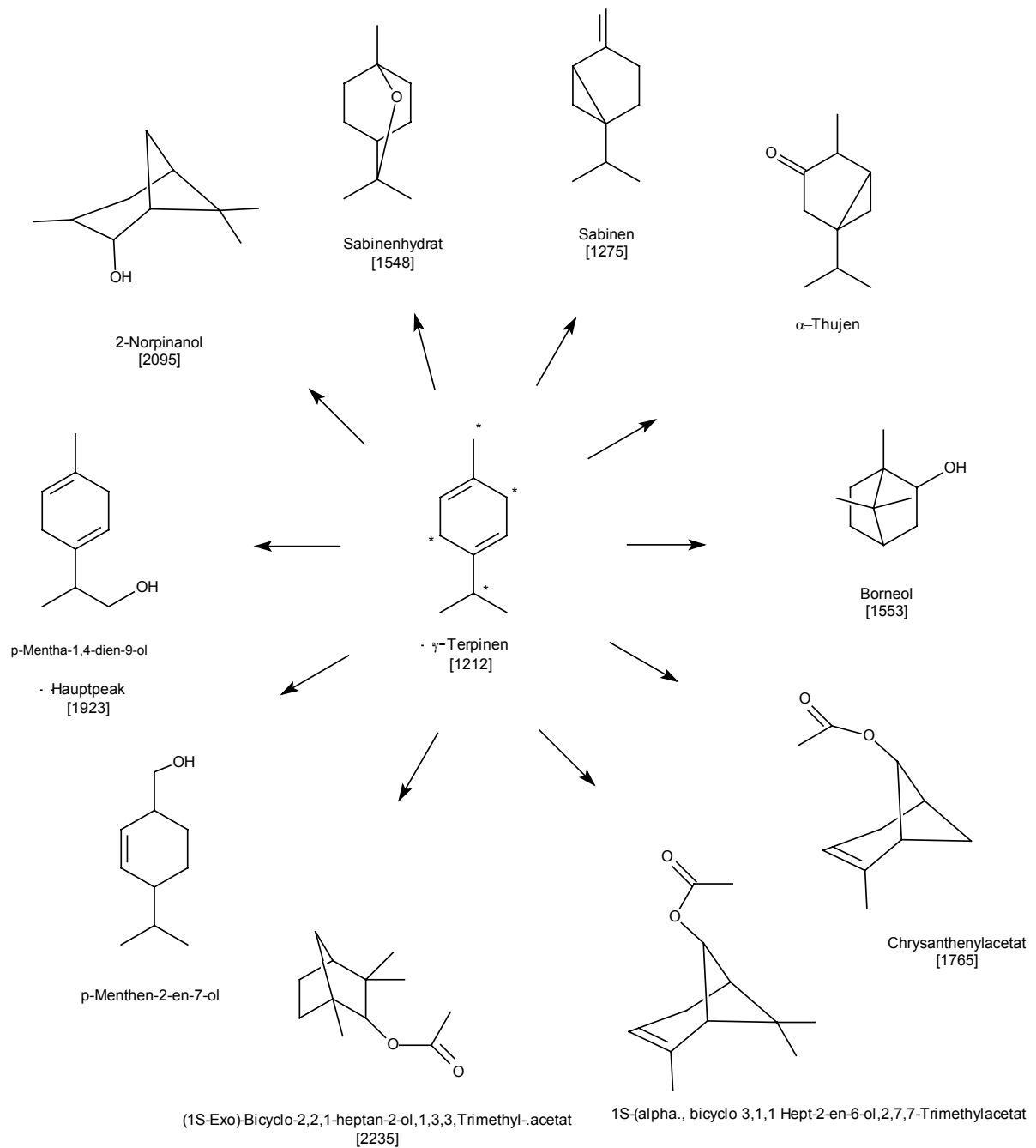


Abb. 2-38 Haupttransformationprodukte bei Konversion von  $\gamma$ -Terpinen durch *Stemphylium botryosum* (Eigenisolat), Kovat-Indizes in eckigen Klammern, \* allysische Position

Zahlreiche Verbindungen wurden auf die Dosierung von  $\gamma$ -Terpinen zurückgeführt (Tab. 2-10).

Tab. 2-10 Identifizierung des Produktspektrums durch Vergleichsmassenspektren, authentische Standards sowie durch den sensorischen Eindruck, ggf. wurden die Identifizierungen anhand von Kovats-Indizes (RI) bestätigt.

Verbindung	Sensorik	RI (Trennphase)	Identifizierung
$\gamma$ -Terpinen [Ausgangsverbindung]	Plastik	1212	MS, KI, ST
p-Cymen		1235	MS, KI
Sabinen	Pfeffer	1275	MS, KI
Fenchon	frisch	1350	MS, KI, ST
Limonenoxid		1495	MS, KI
cis-Sabinenhydrat		1563	MS, KI, ST
(+)-Fenchol	frisch	1548	MS, KI, ST
Borneol	campherartig	1653	MS, KI, ST
Exo-2-Hydroxycineol		1760	MS
Chrysanthenylacetat	frisch	1765	MS
p-Cymen-8-ol	zitronig	1803	MS
p-Mentha-1,4-dien-9-ol	Kräuter, Waldboden	1923	MS, NMR
2-p-Tolyl-propan-1-ol	frisch	1962	MS, NMR
exo-2-Hydroxy-5-Ketobornan		2058	MS,
2-Norpinanol	Wicken	2095	MS,

Die erzielten Produktbildungen und Kinetiken wurden durch Vierfachbestimmung überprüft (Abb. 2-39). Beobachtet wurde ein Kulturverlauf von 10 Tagen.

Dabei wurden bis zu 65 mg p-Mentha-1,4-dien-9-ol gebildet. Zum Vergleich wurde die Transformationsleistung eines weiteren *Stemphylium* Stammes der Kultursammlung DZMZ als Referenz-Stamm analysiert (Abb. 2-39 E).

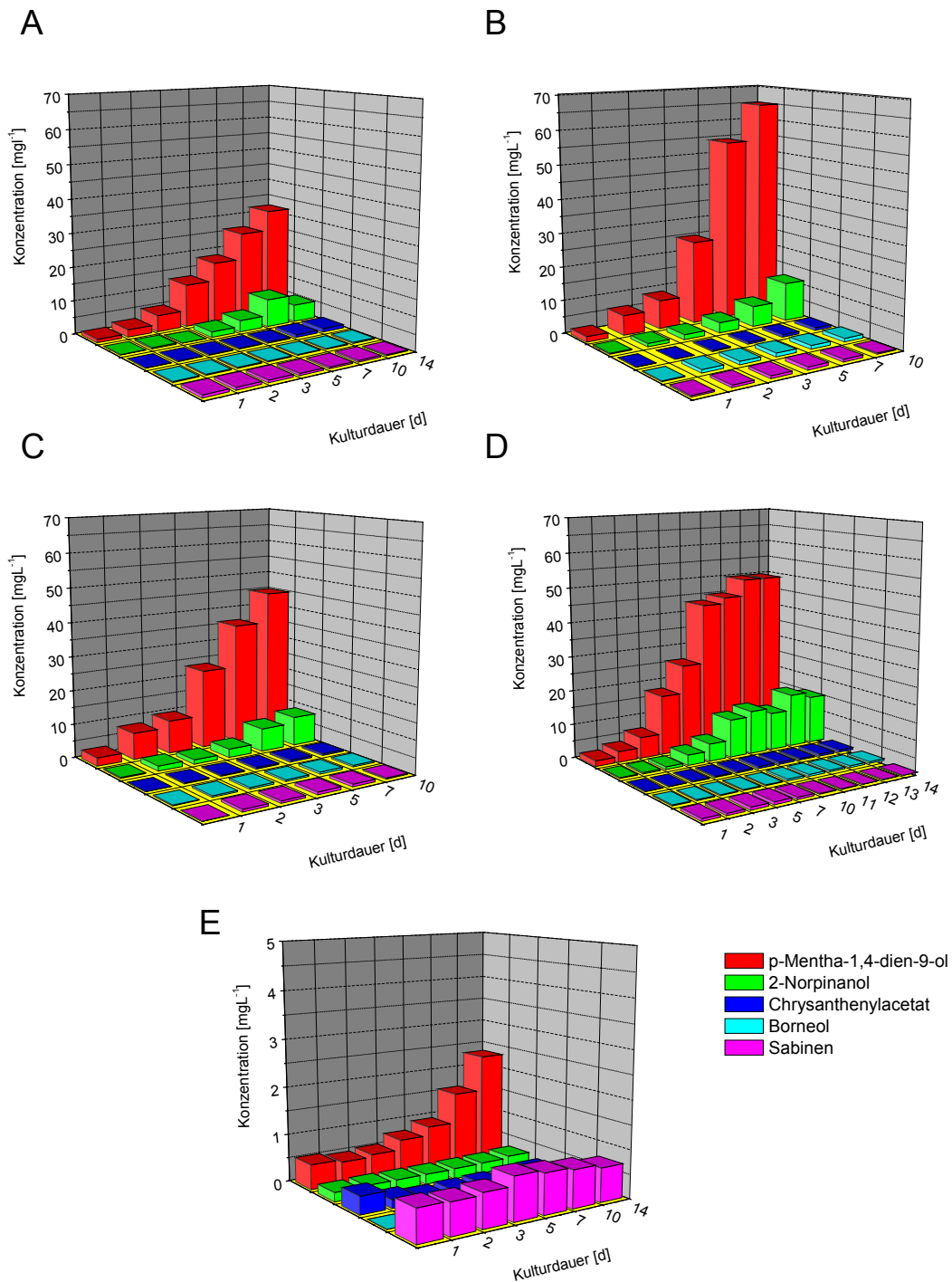


Abb. 2-39 **A-D** zeigt die Reproduzierbarkeit der Produktkinetik von *Stemphylium botryosum* (Selbstisolat) bei der Biotransformation von  $\gamma$ -Terpinen [15,58 mM], **E** Referenzorganismus *Stemphylium botryosum* (DSMZ 62928) mit  $\gamma$ -Terpinen-Supplementierung von 15,58 mM

Bei *Stemphylium botryosum* (DSMZ 62928) wurden dieselben Transformationsprodukte wie bei dem Selbstisolat gefunden. Das Mycel von *Stemphylium botryosum* (DSMZ 62928) zeigte im Gegensatz zum Selbstisolat

kein homogenes Wachstum. Unterschiedlich war auch die Menge an gebildeten Transformationsprodukten. So zeigte der Organismus aus der Kultursammlung am 10. Kulturtag nur 2,4% der Produktbildung im Vergleich zum Selbstisolat [65,09 mg L<sup>-1</sup> (Selbstisolat), 1,56 mg L<sup>-1</sup>(DSMZ 62928)]

#### **2.4.2 Biotransformation im Bioreaktor**

Um eine Bilanzierung der flüchtigen Stoffströme zu gewährleisten, wurde der Organismus *Stemphylium botryosum* (Selbstisolat) im Bioreaktor kultiviert (Abb. 2-40). Der Organismus wurde 2%ig (v/v) zum Gesamtkulturvolumen inokuliert und nach 6 Stunden mit  $\gamma$ -Terpinen versetzt. Der Organismus zeigte eine erhöhte Produktion von Biomasse, sodass ab dem fünften Kulturtag 1 L des Kulturvolumens (2 L) aus dem Reaktorraum entfernt wurde. Ein Verlust der Zielverbindung über die Gasphase wurde nur in geringem Maße beobachtet (<10 mg L<sup>-1</sup> in 8 Tagen).

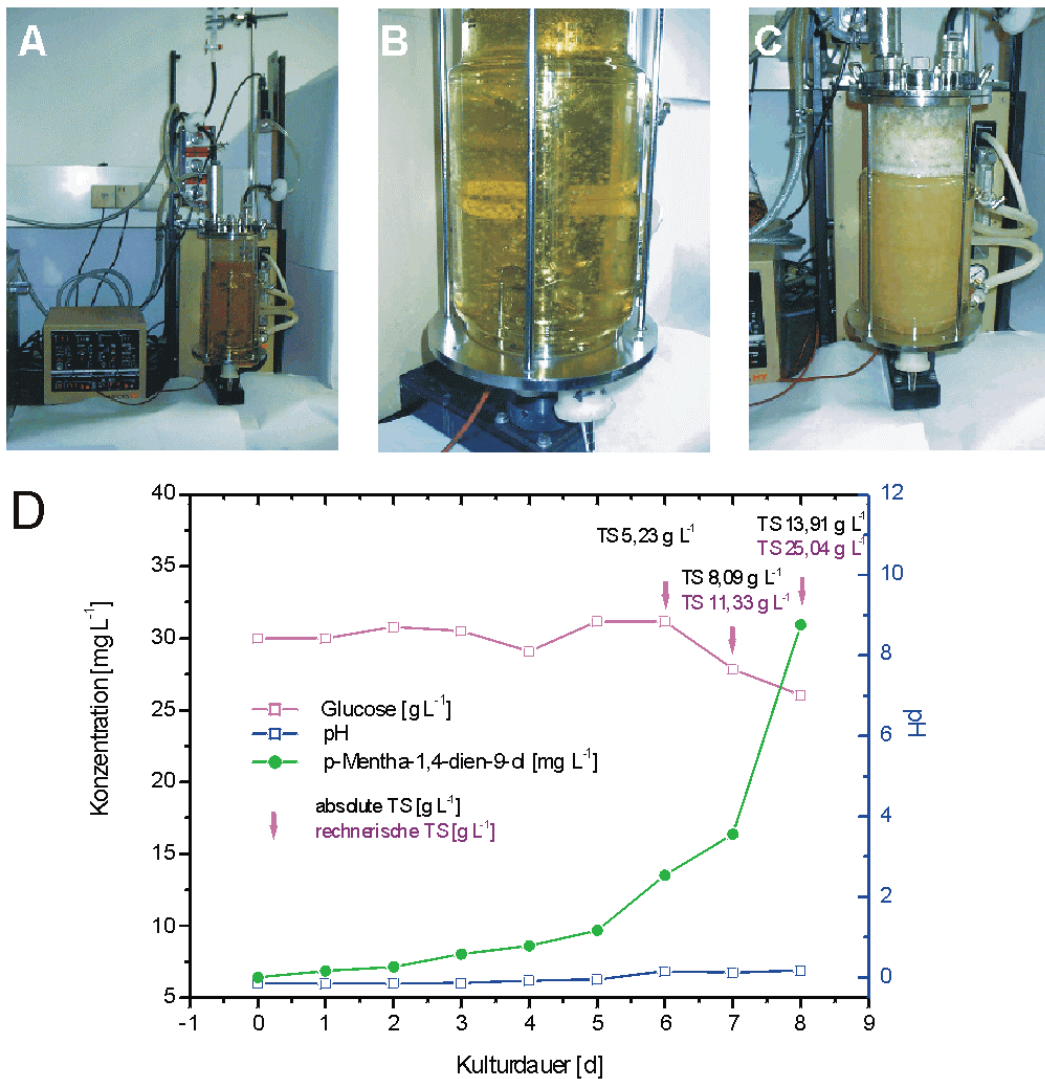


Abb. 2-40 **A** Bioreaktoraufbau, **B** Kultivierung von *Stemphylium botryosum* (Selbstisolat) im Bioreaktor bei einer Kulturdauer von 0h, **C** bei 6 d, **D** Biogenese von p-Mentha-1,4-dien-9-ol und Kulturparameter (Glucose, pH, und Trockensubstanz (TS))

Wie beim Organismus *Penicillium solitum*, wurde bei Anwesenheit von Glucose ein starker Zuwachs der Biofeuchtmasse über den Kulturverlauf beobachtet (Abb. 2-40 **D**). Am achten Kulturtag ergab sich eine berechnete Trockenmasse von  $25 \text{ g L}^{-1}$ .



### 2.4.3 Identifizierung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

Das Transformationsprodukt mit dem KI von 1923 (CW 20M) wurde aus dem Kulturüberstand (10. Tag) durch kontinuierliche Extraktion isoliert und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel 60 vorgereinigt. Es erfolgte eine Identifizierung anhand der Massenspektren an einer polaren sowie apolaren Phase. Die Hauptverbindung zeigte folgendes Massenfragmentierungsmuster mit einer Molekülmasse von 152 m/z (Abb. 2-41), abgeleitet vom Molekulargewicht von  $\gamma$ -Terpinen mit 136 m/z.

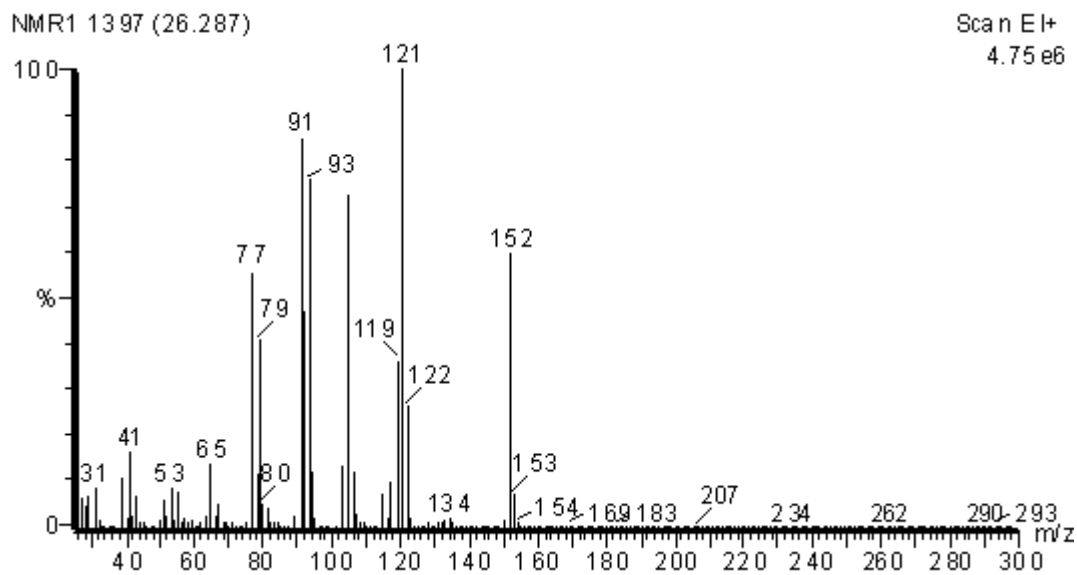


Abb. 2-41 GC-MS, Massenspektrum von p-Mentha-1,4-dien-9-ol auf polarer Säule

Um Gewissheit hinsichtlich der molekularen Masse zu erhalten wurden eine Silylierung durchgeführt (4.11.2).

Der Gesamtextrakt wurde silyliert. Auf der apolaren Phase konnte das vermutete Molekulargewicht von 152 m/z bestätigt werden (Abb. 2-42).

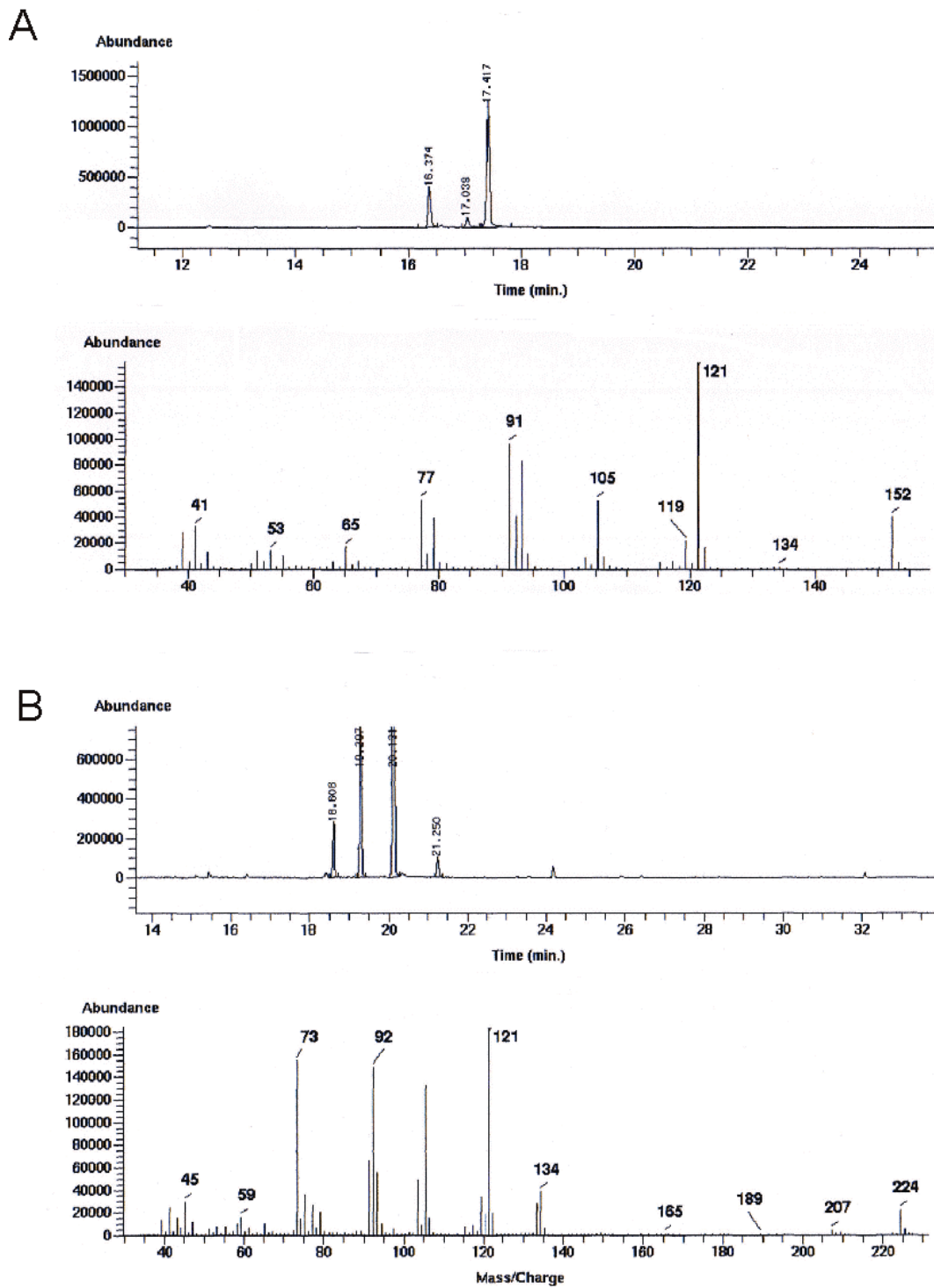


Abb. 2-42 GC-Chromatogramm und dazugehöriges Massenspektrum auf unpolare Säule von p-Mentha-1,4-dien-9-ol (MW 152) trimethylsilyliert (MW 224)

### 2.4.3.1 Aufreinigung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

Um nun auch die genaue Position der Doppelbindungen sowie die absolute Stellung der Hydroxygruppe an der C<sub>9</sub>-Position abzusichern wurde das Produkt für die NMR aufgereinigt. Diese Aufreinigung war schwierig, da der Aromastoff immer wieder disproportionierte. Dies zeigt das folgende Chromatogramm (Abb. 2-43).

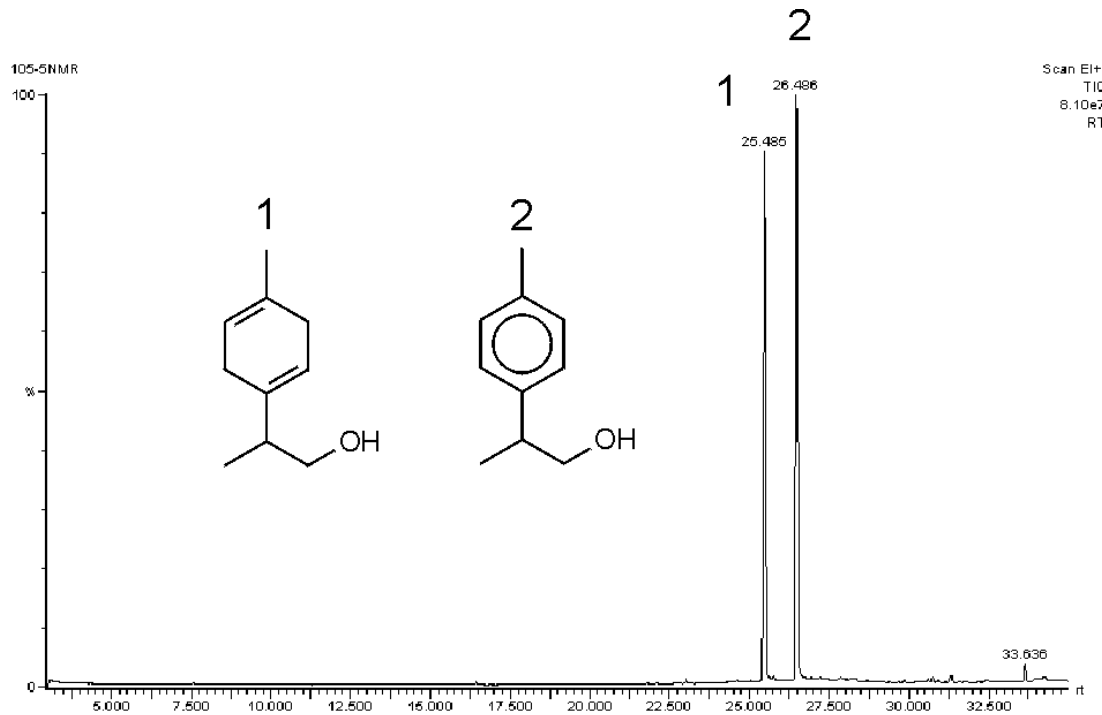


Abb. 2-43 Chromatogramm des vorgereinigten Extraktes von p-Mentha-1,4-dien-9-ol gebildet durch *Stemphylium botryosum*

Es wurden die flüchtigen Bestandteile aufkonzentriert, vorgereinigt (LC) und mittels präparativer Gaschromatographie isoliert (4.12). So konnten 12 mg des Transformationsproduktes erhalten werden (Abb. 2-44).

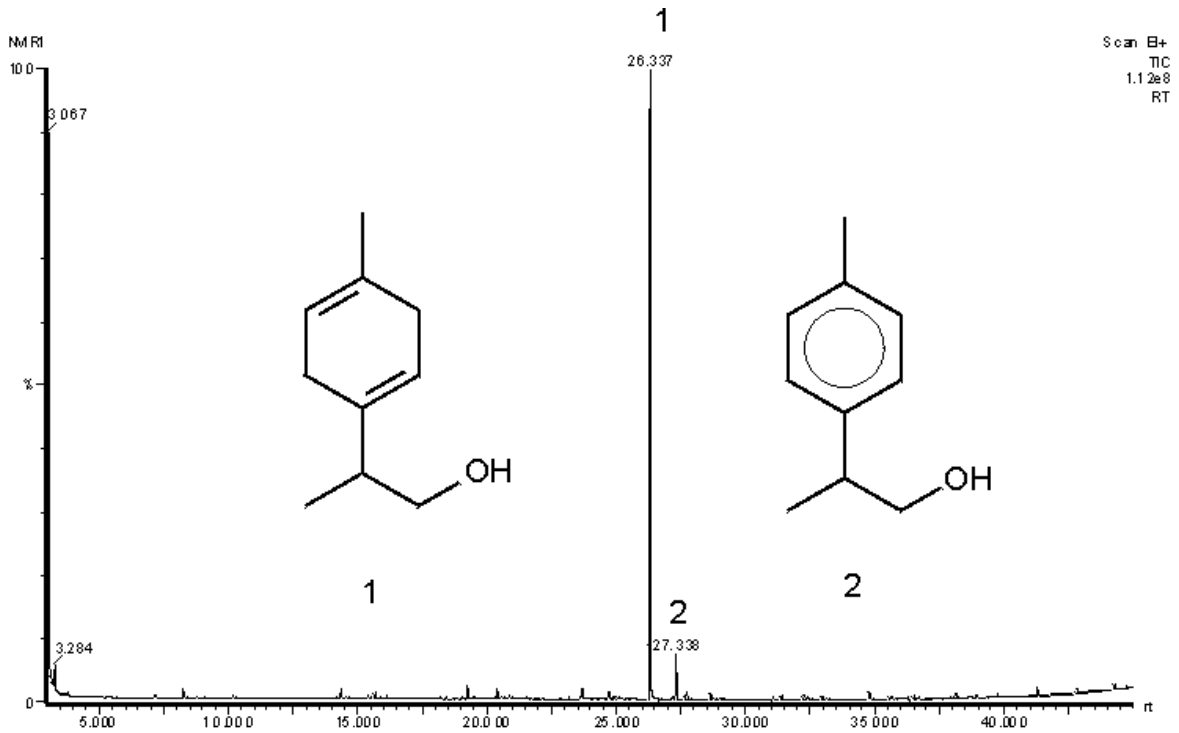


Abb. 2-44 Chromatogramm von aufgereinigtem p-Mentha-1,4-dien-9-ol (mittels LC und anschließender präparativer GC)

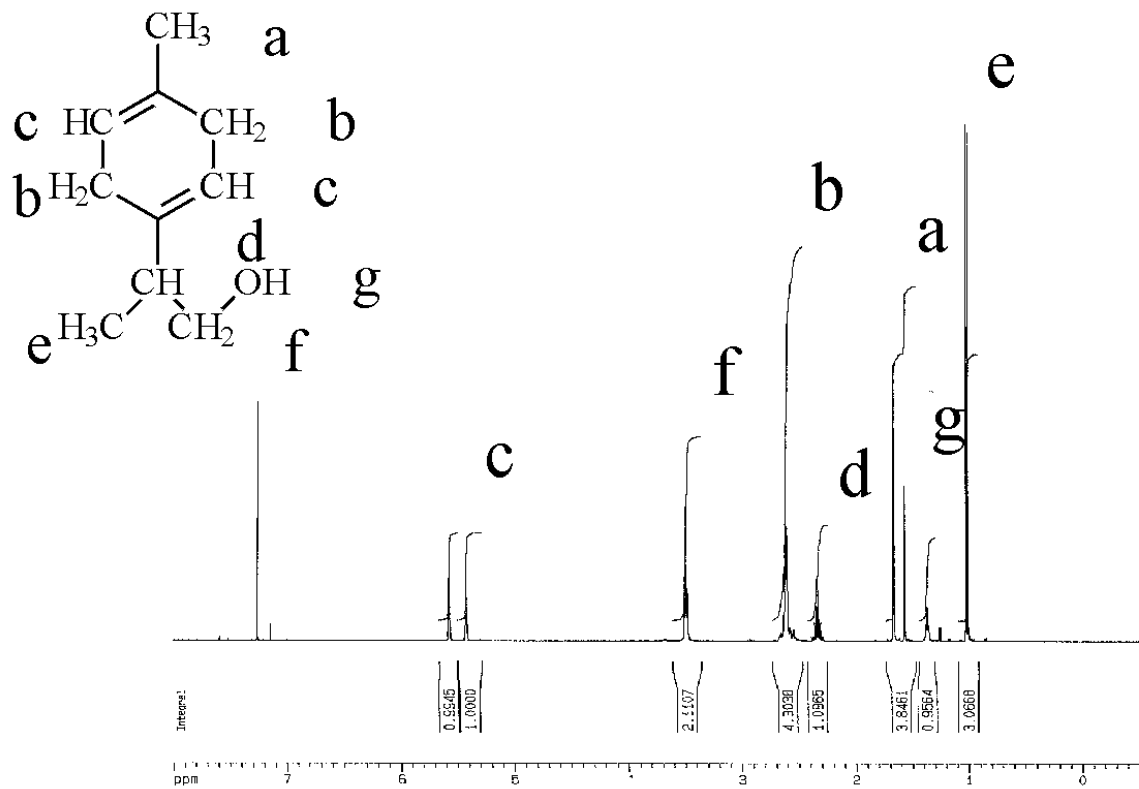


Abb. 2-45  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von p-Mentha-1,4-dien-9-ol, 400 MHz

Da sich am C 7 ein Chiralitätszentrum befindet, ist eine chirale GC-Analyse durchgeführt worden. Sie zeigte die Bildung eines Isomers mit 74% (74% ee; enantiomerer Überschuss). Es konnte keine Aussage über die Konfiguration gemacht werden, da für diesen Naturstoff keinerlei Referenzverbindungen verfügbar waren.

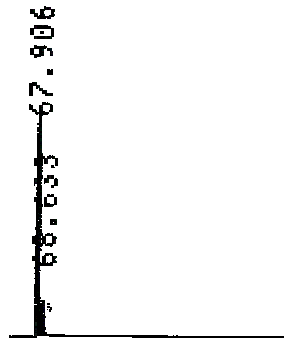


Abb. 2-46 Chromatogramm der chiralen Analyse ee=74%

#### 2.4.4 Identifizierung von 2-p-Tolyl-propan-1-ol

Die Verbindung 2-p-Tolyl-propan-1-ol wurde mittels GC-MS untersucht (Abb. 2-47)

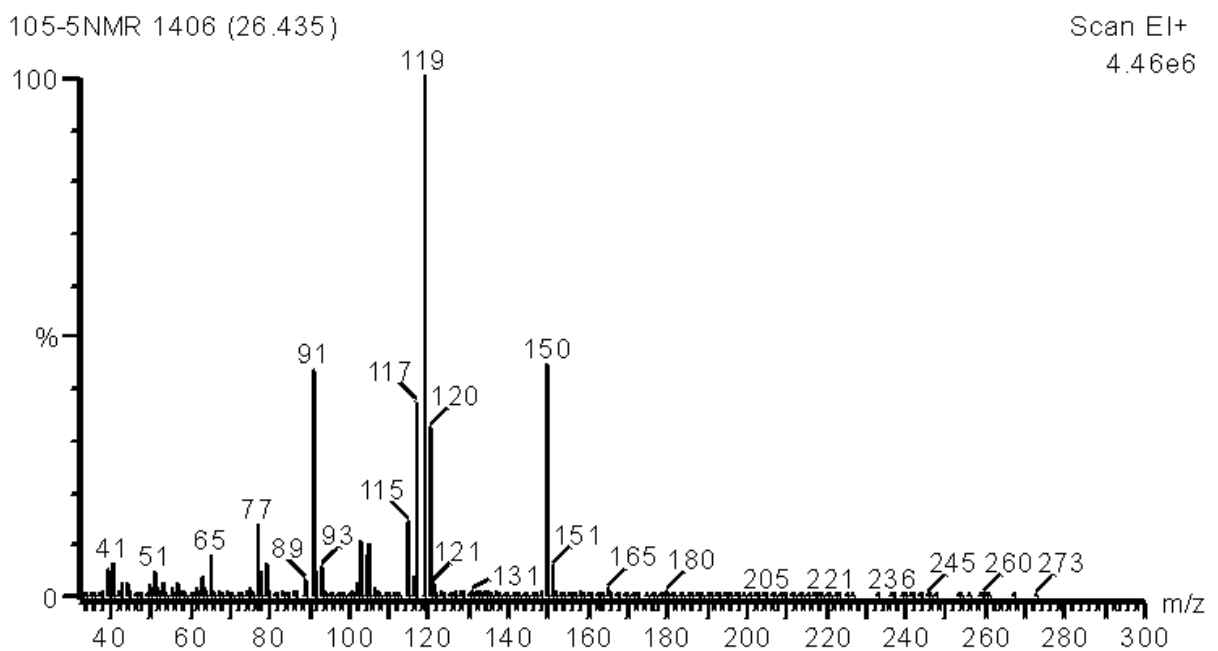


Abb. 2-47 Massenspektrum von 2-p-Tolyl-propan-1-ol

Auch hier wurde eine Silylierung durchgeführt.

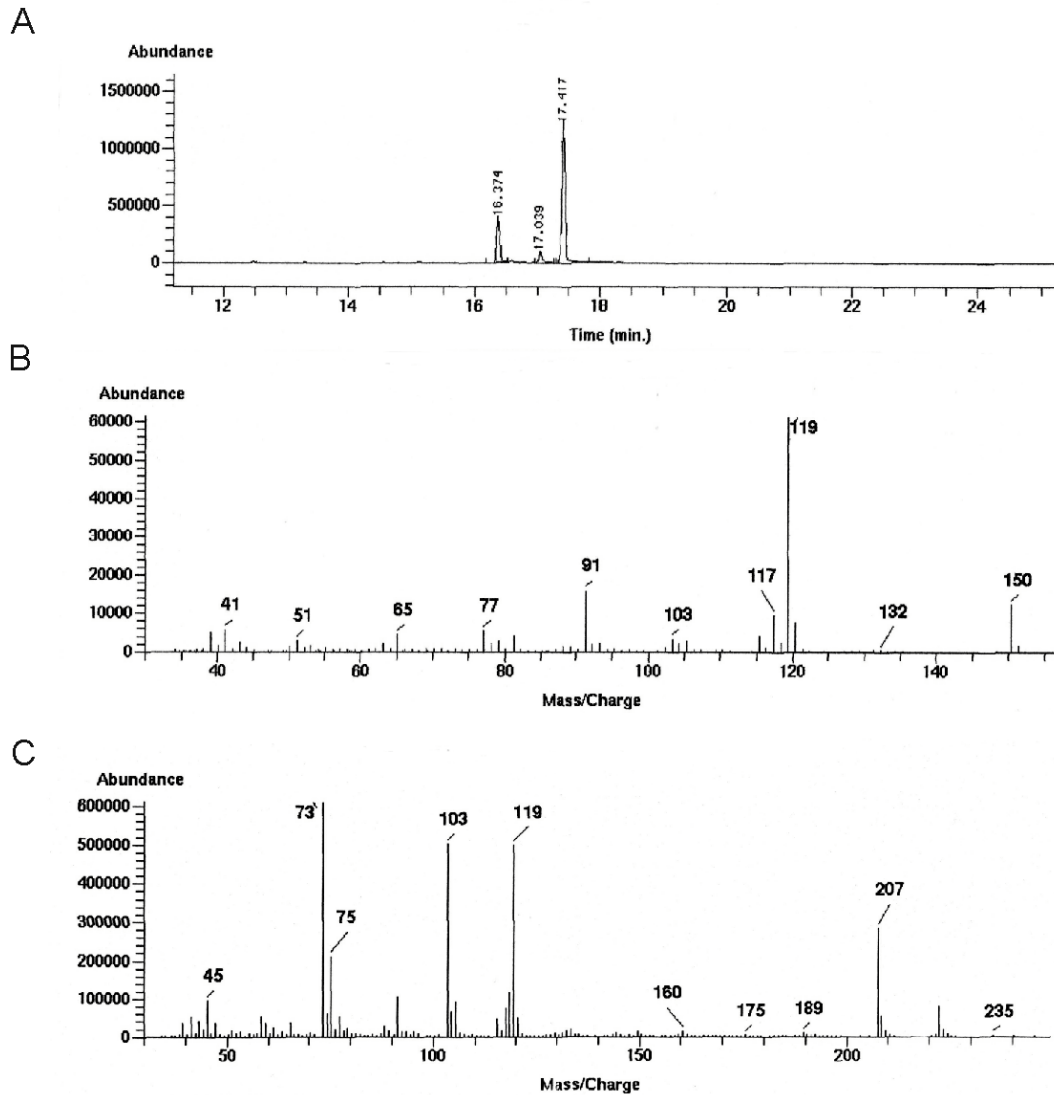


Abb. 2-48 **A** Extrakt des Kulturüberstandes von *Stemphylium botryosum* auf apolarer Säule, **B** Massenspektrum von 2-p-Tolyl-propan-1-ol, **C** Massenspektrum von 2-p-Tolyl-propan-1-ol nach Silylierung

#### 2.4.4.1 Aufreinigung von 2-p-Tolyl-propan-1-ol

Die Struktur von 2-p-Tolyl-propan-1-ol wurde mittels GC-MS und NMR aufgeklärt. Dieser Aromat konnte mit 2,7 mg aufgereinigt werden, wobei die Verunreinigungen unter 1% ausmachten (Abb. 2-49).

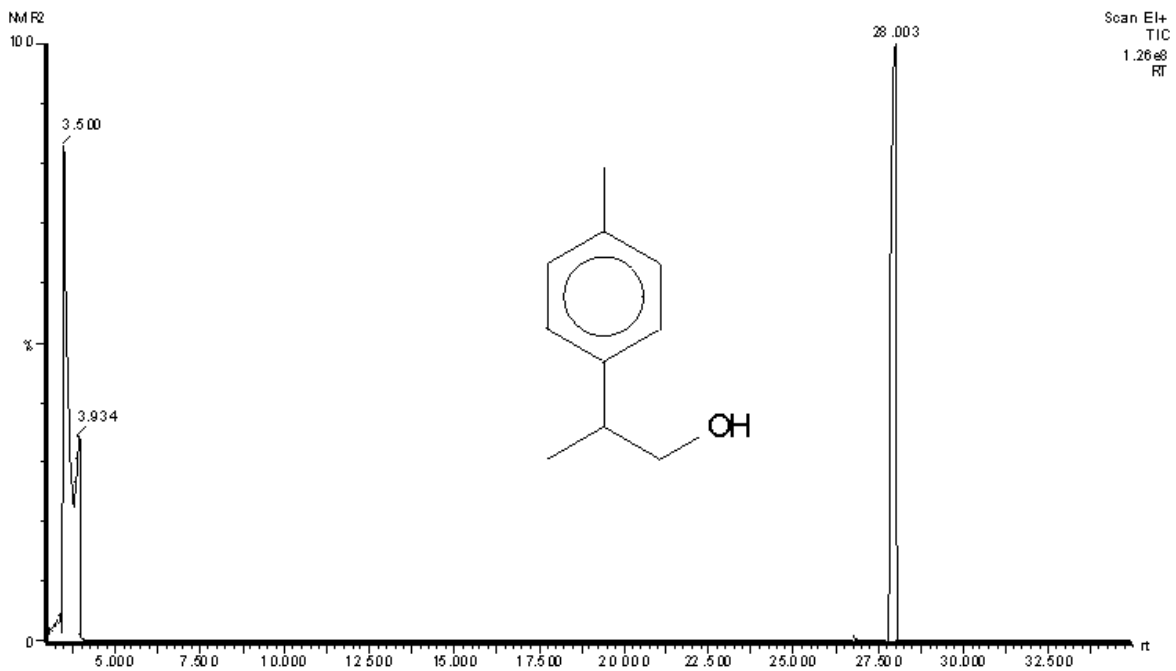


Abb. 2-49 Aufreinigung des Aromaten 2-p-Tolyl-propan-1-ol

#### 2.4.5 Oxidation von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

Zur Strukturabsicherung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol wurde die Verbindung oxidiert und die daraus resultierenden Oxidationsprodukte identifiziert. Sekundäre Alkohole reagieren bei Oxidation schon unter wesentlich mildereren Bedingungen, während tertiäre Alkohole sich nur schwer und unter C-C-Spaltung oxidieren lassen. Mit diesen Experimenten würde die Stellung der Hydroxgruppe in Position 8 ausgeschlossen werden können (Abb. 2-50). Hierzu wurde der vorgereinigte Extrakt mit  $\text{MnO}_2$  behandelt. Es wurden nach einer, zwei, zweieinhalb und drei Stunden Reaktionszeit Proben entnommen und mittels GC-MS analysiert. Nach drei Stunden wurde noch zusätzlich eine  $\text{KMnO}_4$ -Behandlung durchgeführt.

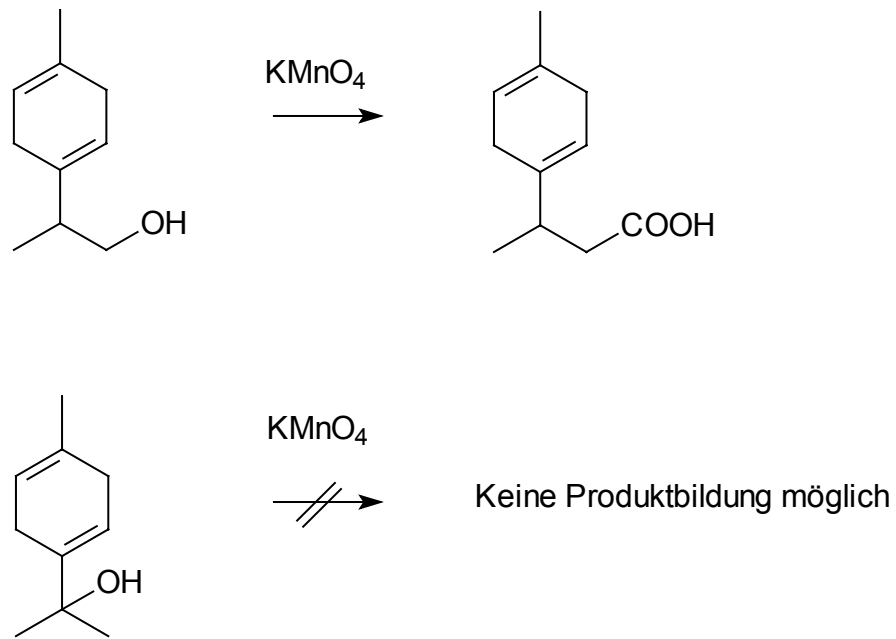


Abb. 2-50 Oxidation von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

In der folgenden Abbildung sind die Oxidationsprodukte nach zweitägiger  $\text{KMnO}_4$ -Behandlung dargestellt. Ausgehend vom p-Mentha-1,4-dien-9-ol konnten vier Oxidationsprodukte identifiziert werden (Abb. 2-51).



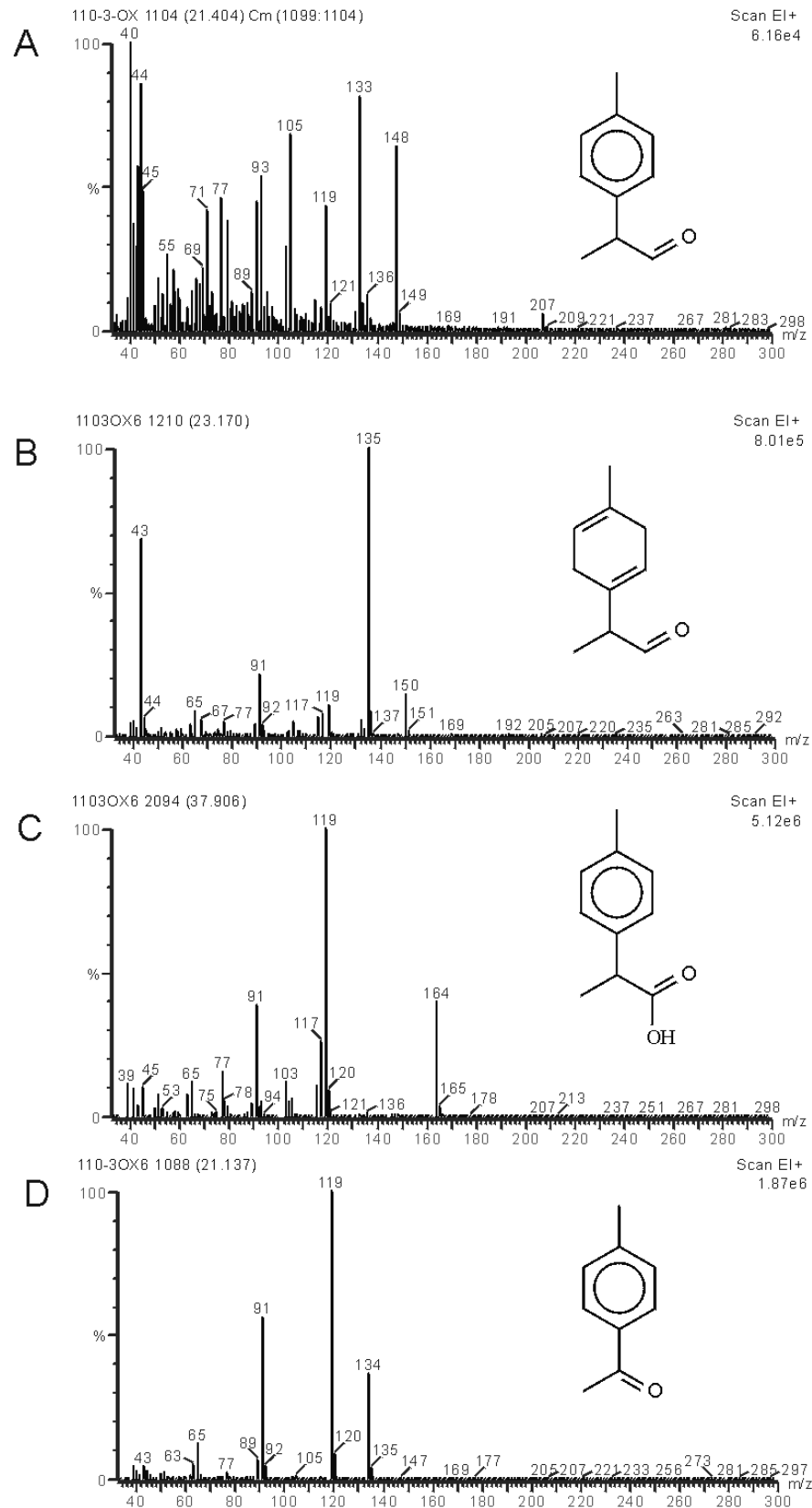


Abb. 2-51 **A** 2-p-Tolylpropanal (nach einstündiger Behandlung mit  $\text{MnO}_2$ )  
**B** 2-(4-Methyl-cyclohexa-1,4-dienyl)-propanal (p-Mentha,1,4-dien-9-al) und  
**C** 2-p-Tolylpropansäure **D** 1-p-Tolylethanon (B-D nach jeweils Behandlung mit  $\text{KMnO}_4$   
über 48 h)

### 2.4.6 Nachweis von p-Mentha-1,4-dien-9-ol in etherischen Ölen

Der Naturstoff p-Mentha-1,4-dien-9-ol muss, um als natürlicher Aromastoff deklariert werden zu können, in mindestens einem Lebensmittel gefunden werden. Somit wurden kommerzielle Öle aus Pflanzen hinzugezogen, bei denen 2-p-Tolyl-propan-1-ol oder  $\gamma$ -Terpinen bereits identifiziert worden waren (Tab. 2-11). Betrachtet wurden Extrakte aus Eukalyptus, Lavendel, Salbei, Rosmarin und Tequila (*Agave tequilana*). Ferner wurden Quellen verwendet bei denen die Ausgangsverbindung  $\gamma$ -Terpinen bereits identifiziert wurde. Leider erwiesen sich die kommerziellen Öle als unzureichend für diese Anwendungen, sodass die etherischen Öle selbst hergestellt wurden. Nach einer Chlorophyllfällung wurden weder 2-p-Tolyl-propan-1-ol noch p-Mentha-1,4-dien-9-ol nachgewiesen.

Tab. 2-11 Literaturscreening nach  $\gamma$ -Terpinen oder 2-p-Tolyl-propan-1-ol in etherischen Ölen von Pflanzen

Quelle	Art	Literatur ( $\gamma$ -Terpinen oder 2-p-Tolyl-propan-1-ol)
Dill	<i>Anethum greveolens</i>	Hassanzadeh et al. 2000
Dillsamenöl (Bulgarien)	<i>Anethum greveolens</i>	Hassanzadeh et al. 2000
Dillspitzen	<i>Anethum greveolens</i>	Hassanzadeh et al. 2000
Eukalyptus	<i>Eukalyptus sp.</i>	Pass et al. 2002
Eukalyptusöl	<i>Eukalyptus globulus</i>	Pass et al. 2002
Kümmelöl (Polen)	<i>Carum cavi</i>	Roth et al. 1996
Lavendel	<i>Lavandula hybrida</i>	Kokkalu et al. 1988 ( <i>Lavandula stoechas</i> L.)
Lavendelöl	<i>Lavandula hybrida</i>	Kokkalu et al. 1988 ( <i>Lavandula stoechas</i> L.)
Rosmarin	<i>Rosmarinus officinale</i>	Ibanez et al. 1999
Rosmarinöl	<i>Rosmarinus officinale</i>	Ibanez et al. 1999
Salbei	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Roth et al. 1996
Salbeiöl	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Roth et al. 1996
Teebaumöl (Australien)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Roth et al. 1996
Tequila	<i>Agave tequilana</i>	Benn et al. 1996
Thymianöl	<i>Thymus serpyllum</i>	Mockute et al. 2003

Bei chlorophyllhaltigen Extrakten (Soxhlet-Extrakt) allerdings konnte 2-p-Tolyl-propan-1-ol eindeutig identifiziert werden.

#### 2.4.6.1 Nachweis von p-Mentha-1,4-dien-9-ol in Dill

Aufgrund der sensorischen Hinweise wurde zum Nachweis von p-Mentha-1,4-dien-9-ol in Lebensmitteln Dill (*Anethum graveolens* L.) extraktiv aufgearbeitet.

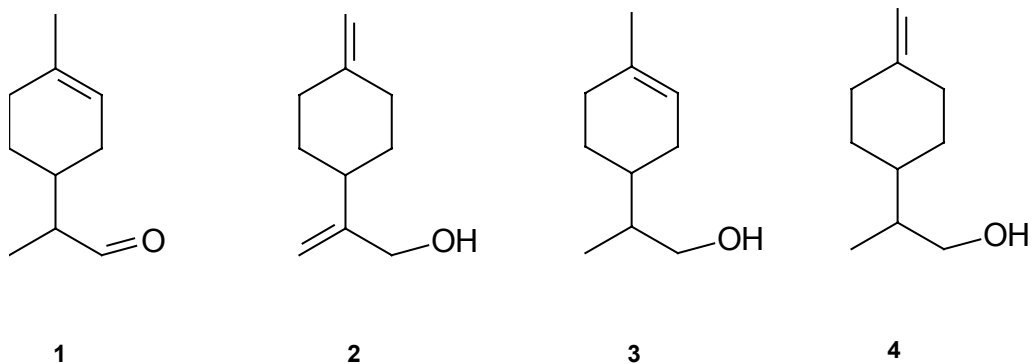


Abb. 2-52 Identifizierte Verbindungen aus Dill, **1**  $\alpha$ -4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-acetaldehyd, **2** p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol, **3**  $\beta$ -4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-ethanol (p-Mentha-1-en-9-ol), **4** p-Mentha-1(7)-en-9-ol

Wie Abbildung 2-52 zeigt, konnten vier dem p-Mentha-1,4-dien-9-ol ähnliche Terpenoide gefunden werden. Eindeutig konnte p-Mentha-1-en-9-ol in Dill identifiziert werden (Abb. 2-53).

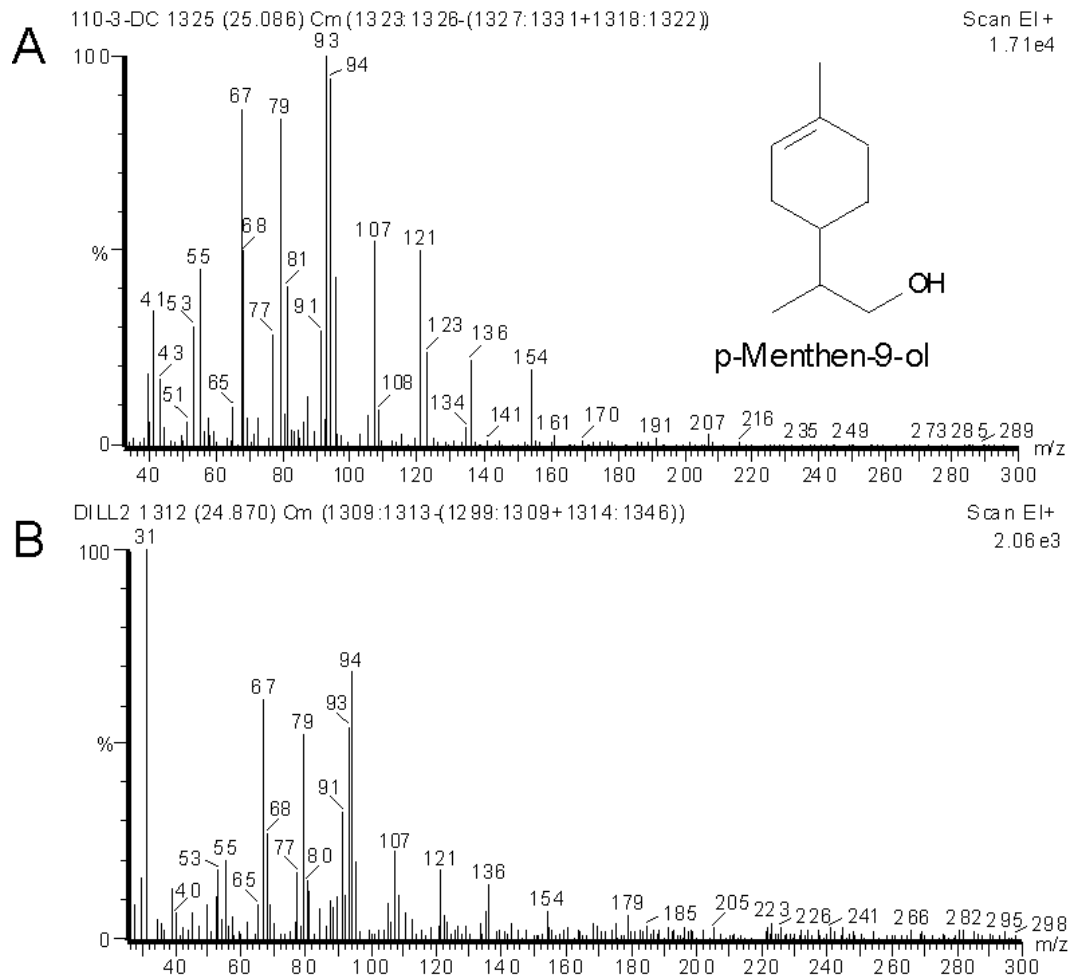


Abb. 2-53 **A** p-Menthen-9-ol aus vorgereinigtem Extrakt von *Stemphylium botryosum* (Eigenisolat) und **B** Dill-Aufarbeitung

Tab. 2-12 Kovats-Indizes der oben erwähnten Strukturformeln Dill

Nr.	Verbindung	Kovats-Indizes
1	$\alpha$ -4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-acetaldehyd	1556
2	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	1620
3	p-Mentha-1-en-9-ol	1761
4	p-Mentha-1(7)-en-9-ol	2089

Da sich dieser Aromastoff (p-Mentha-1,4-dien-9-ol) als instabil erwies, wurden flüchtige Bestandteile mittels Thermodesorption (TDS) untersucht, da sich diese Methode besonders für empfindliche Verbindungen eignet. Hierzu wurden 938 g Dill zerkleinert und in ein 5 L-Gefäß gefüllt (Abb. 2-54).

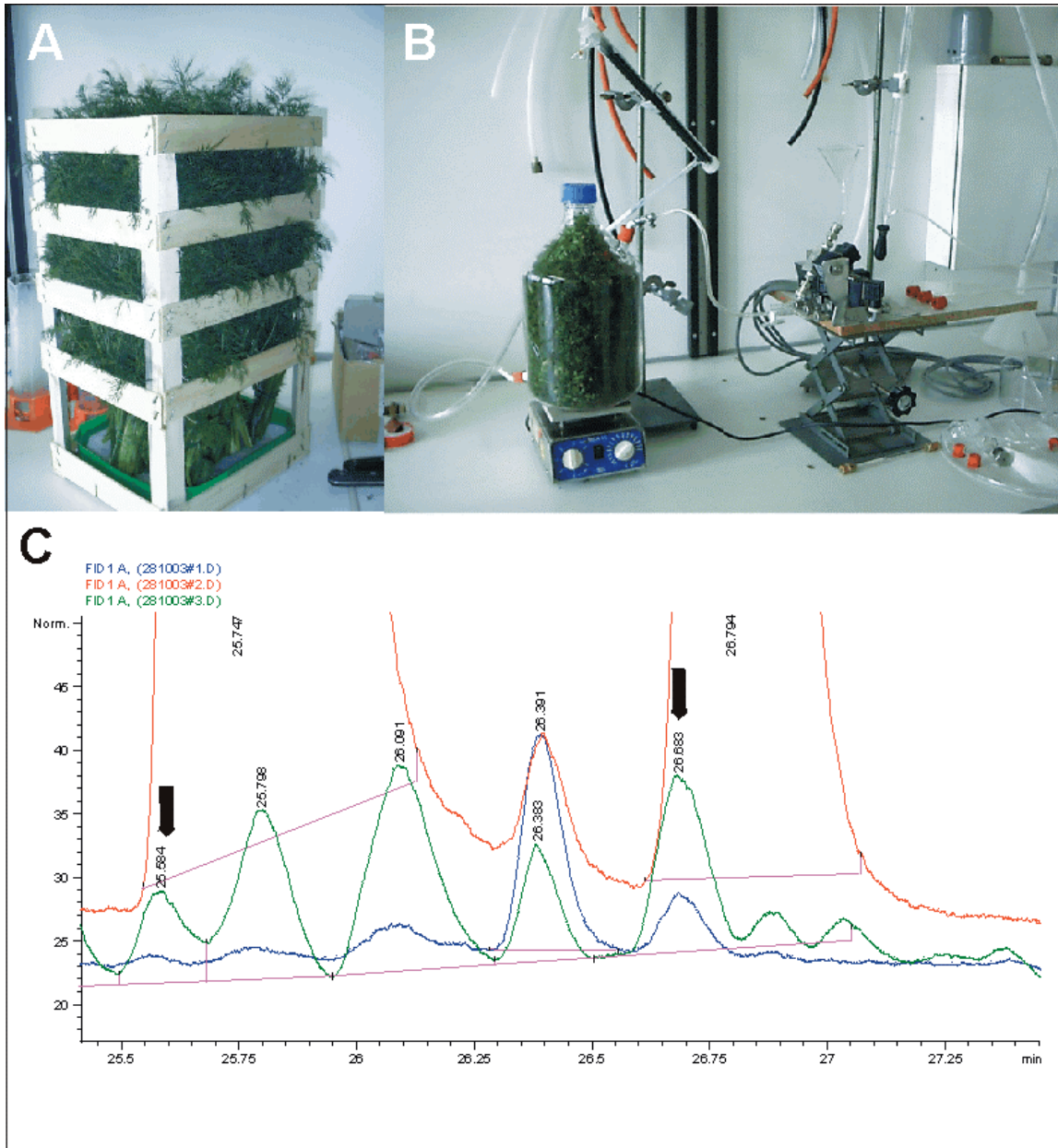


Abb. 2-54 **A** Pflanzenmaterial **B** Experimenteller Aufbau **C** TDS-Chromatogramm, rote Linie entspricht dem Standard (p-Mentha-1,4-dien-9-ol sowie 2-p-Tolyl-propan-1-ol), blaue Linie 1 min Adsorptionsdauer, grüne Linie 5 min Adsorption.

Mit einem Volumenstrom von  $133 \text{ mL min}^{-1}$  wurde in Zeitabständen von 1, 5 und 20 min an Tenax bzw. an Lewatit (4,3 g) adsorbiert (Rabe 2003). Entsprechend der Adsorptionsdauer wurden durch Thermodesorption zwei Verbindungen bei den entsprechenden Retentionszeiten gefunden.

#### 2.4.6.2 Nachweis von p-Mentha-1,4-dien-9-ol in Tequila

Tequila wird aus dem doppelt destillierten, fermentierten Saft von *Agave tequilana* gewonnen (Valenzuela-Zapata 1985). Bei der Extraktion wurde auf eine Chlorophyllextraktion verzichtet. 2-p-Tolyl-propan-1-ol konnte, wie Abbildung 2-55 zeigt, eindeutig identifiziert werden.

---

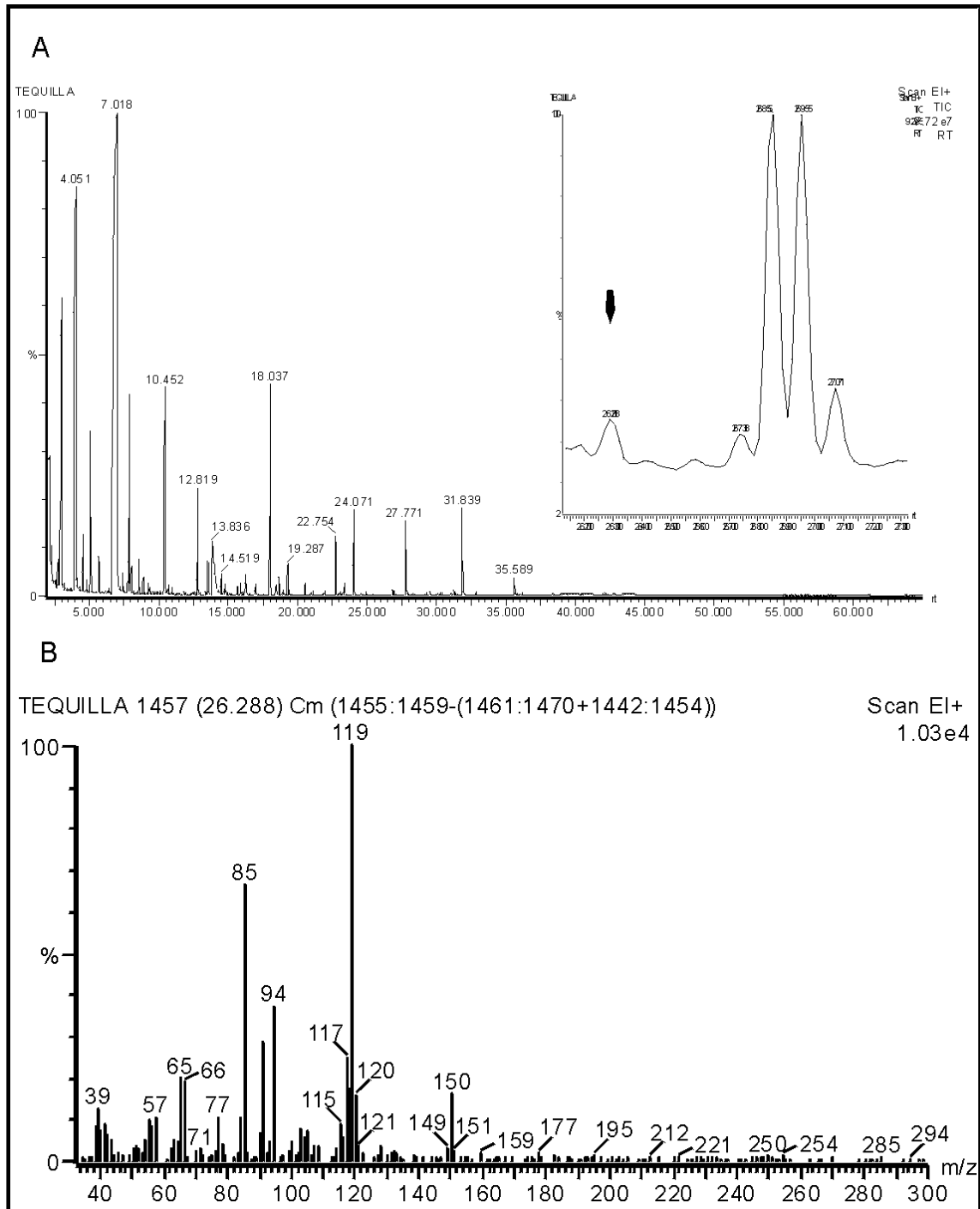


Abb. 2-55 GC-MS-Chromatogramm und Spektrum von 2-p-Tolyl-propan-1-ol isoliert aus Tequila

Hier konnte bei gleichen Retentionszeiten eine Verbindung nachgewiesen werden, die alle entsprechenden Massenfragmente von p-Mentha-1,4-dien-9-ol enthielt (3.5.2).

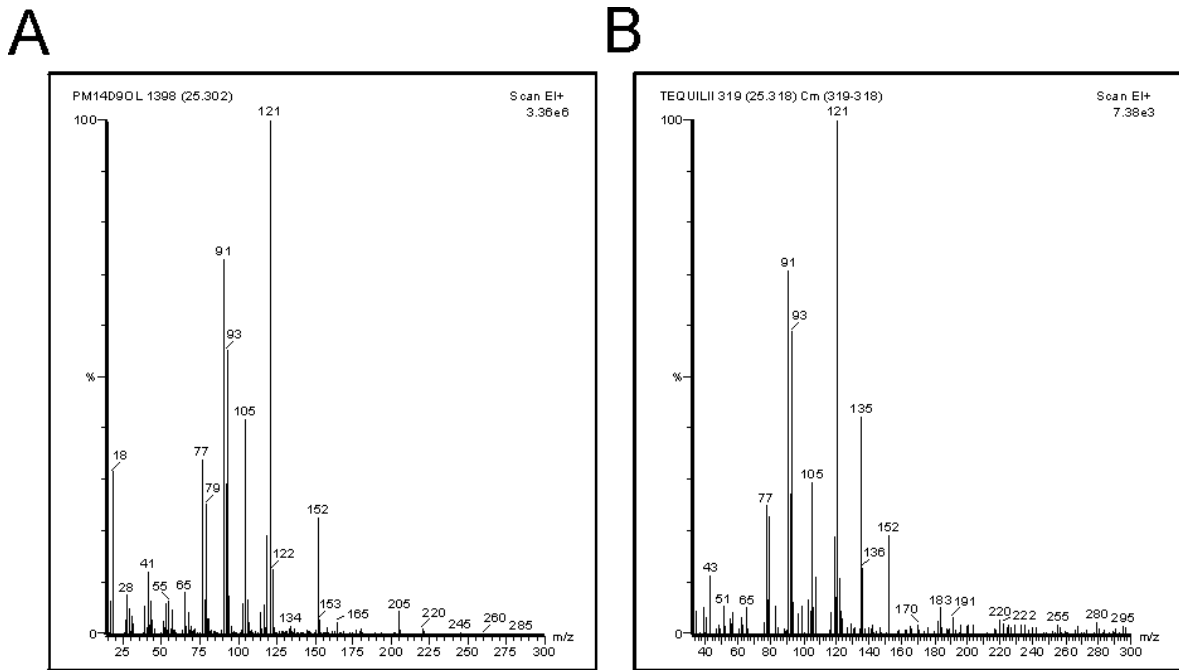


Abb. 2-56 MS-Spektren von **A** p-Mentha-1,4-dien 9-ol. **B** entsprechende MS Spektren aus Tequila.

#### 2.4.7 Biokatalyse von RSF mit industrieller Anwendung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Supplementierungsversuche mit Terpenkohlenwasserstoffen als Reinstoffe (Reinheit 98%) sind in der authentischen industriellen Anwendung wegen der kostenintensiven Aufreinigungsschritte wenig zielführend. Vielmehr fallen eben diese Kohlenwasserstoffe mit geringer sensorischer Relevanz wie  $\gamma$ -Terpinen bei der Aufkonzentrierung der hochwertigen geruchsaktiven Verbindungen in Form von Gemischen an. Das bearbeitete Substrat  $\gamma$ -Terpinen besitzt Modellcharakter für die jeweilig anfallende Reststofffraktionen von z.B. italienischen oder argentinischen Mandarinenölen. So war es möglich, mit Hilfe von *Stemphylium botryosum* als Biokatalysator, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, eine aktuell anfallende Reststofffraktion zu biotransformieren. Das argentinische Mandarinenölterpen RSF-Gemisch enthielt 97,8% Limonen und 2,4%  $\gamma$ -Terpinen. Wegen der geringen Menge  $\gamma$ -Terpinen wurde p-Mentha-1,4-dien-9-ol nur in Spuren gefunden ( $<10 \text{ mg L}^{-1}$ ).



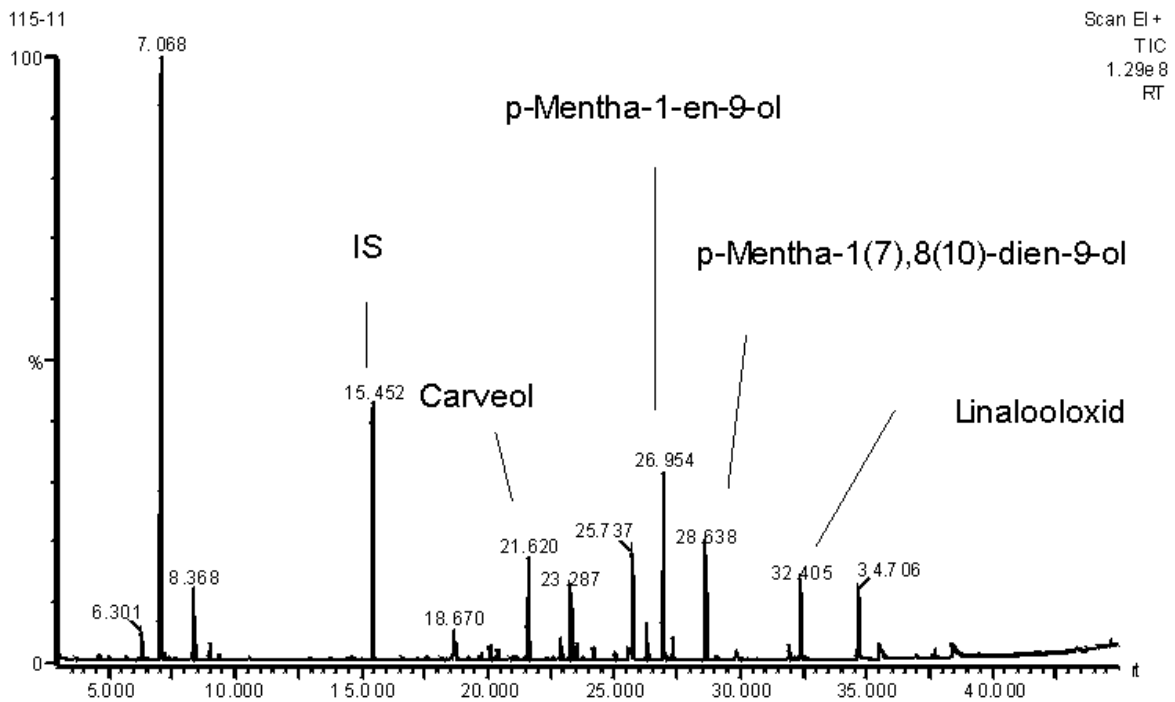


Abb. 2-57 Transformationsprofil einer anfallenden authentischen Reststofffraktion, Dosierung  $5 \text{ mL L}^{-1}(\text{v/v})$ , durch Biokatalyse mit *Stemphylium botryosum* am 11. Kulturtag

#### 2.4.8 Teil-Zusammenfassung

Aus dem Screening kristallisierte sich ein Stamm heraus, der sich im Gegensatz zu 35 anderen Kulturen als  $\gamma$ -Terpinen tolerant erwies (Isolat aus Salbei). Im Medium konnten acht sensorisch interessante Verbindungen auf die Dosierung von  $\gamma$ -Terpinen zurückgeführt werden. Das Hauptprodukt der Biotransformation, p-Mentha-1,4-dien-9-ol, konnte mit  $65 \text{ mg L}^{-1}$  am 10. Kulturtag quantifiziert werden. Durch die präparative Gaschromatographie ist es gelungen, das instabile Transformationsprodukt p-Mentha-1,4-dien-9-ol mit 12 mg und einer Reinheit von 97% zu isolieren. Ein Restbestandteil von 3% bildete der zugehörige Aromat 2-p-Tolyl-propan-1-ol. Die Auswertung der Kernresonanzspektren der  $^1\text{H-NMR}$  bestätigte die Struktur von p-Mentha-1,4-dien-9-ol.

## 3 DISKUSSION

### 3.1 Terpenoide: Aromastoffe und Aromavorstufen

Aromastoffe sind flüchtige Verbindungen, die mit den Geruchsrezeptoren wahrgenommen werden können. Sie erreichen die Rezeptoren beim Einatmen durch die Nase (orthonasale Wahrnehmung) und über den Rachenraum, nachdem sie beim Kauen freigesetzt worden sind (retronasale Wahrnehmung). Unter den Aromastoffen verdienen diejenigen Verbindungen besondere Beachtung, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittels prägen und deshalb als Schlüsselaromastoffe ("*character impact compounds*") bezeichnet werden. Aromastoffe werden über eine Vielzahl von Reaktionen gebildet, die im normalen Stoffwechsels von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen ablaufen. Darüber hinaus sind für die Aromabildung enzymatische Reaktionen von Bedeutung, die erst nach der Zerstörung des Gewebeverbandes eintreten z.B. beim Zerkleinern von Obst und Gemüse. Enzyme können weiterhin indirekt an der Aromabildung beteiligt sein, in dem sie Vorstufen bereitstellen, die dann nicht-enzymatisch zu Aromastoffen weiter reagieren. Auf diese Weise verstärken Enzyme das Aroma z.B. bei Brot, Fleisch, Bier, Tee und Kakao. Im Gegensatz dazu können enzymatische Reaktionen die Aromen auch im negativen Sinne verändern und so zu Aromafehlern ("*off-flavour*") führen. Fehleraromen entstehen vor allem durch Hydrolyse von Estern oder durch oxidative Spaltung ungesättigter Fettsäuren (Belitz et al. 2001).

Das Einsatzgebiet der Terpenoide umfasst mittlerweile eine große Anzahl von Parfümerieprodukten und Kosmetika (besonders blumige Düfte), aber auch eine Vielzahl von Lebensmitteln (Citrusaromen), Haushaltsprodukten und Pharmaka. Die Gehalte an etherischen Ölen in Pflanzen sind jedoch mit Konzentrationen <0,1 bis 5% gering und die Komplexität der Öle so groß, dass eine industrielle Gewinnung von Spurenaromastoffen aus diesen natürlichen Quellen selten wirtschaftlich ist. Zur Bedarfsdeckung werden >80% der weltweit verwendetet Aromastoffe chemosynthetisiert, so auch viele Terpenoide. Da Terpenkohlenwasserstoffe als Hauptbestandteil einiger in großen Mengen erhältlicher etherischen Öle auftreten, dienen sie als ideales Startmaterial für chemische Synthesen von Terpenoiden. Sowohl im Aroma- und Duftsektor

---

besteht allerdings Interesse, die chemosynthetisierten ("naturidentischen") durch biotechnologisch hergestellte ("natürliche") Aromen zu ersetzen. Hierdurch können chemische Synthesen, die aufgrund der eingesetzten Reagenzien und Prozessbedingungen mit hohen Belastungen für Mensch und Umwelt einhergehen, teilweise substituiert bzw. ganz eingespart werden. Natürliche Aromastoffe sind

- aus regenerierbaren Rohstoffquellen gewinnbar,
- durch biologische Produktionsverfahren umweltfreundlich,
- von besserer Produktqualität (hohe Enantiomerenreinheit, wenig unerwünschte Nebenprodukte)
- besser akzeptiert beim Verbraucher.

### **3.1.1 Natürliche Aromastoffe: Marktsituation**

Trotz der bereits erwähnten Schwierigkeiten gilt der Biotransformation großes Interesse. Ein überzeugendes Beispiel für eben diese Marktsituation ist der weltweit exzellent vermarktete Aromastoff Vanillin. Von den jährlich konsumierten über 12 000 Tonnen werden weniger als 1% aus den fermentierten, tropischen Orchideenschoten isoliert. Der Unterschied zwischen dem Chemosyntheseprodukt und dem natürlichen Vorbild zeigt sich in dem von der Deklaration abhängigen Preis. So wird das naturidentische Vanillin mit einem Wert von 12 \$ pro Kilogramm, das natürliche Vanillin im Gegensatz dazu mit über 4000 \$ pro Kilogramm vermarktet (Berger 1999). Der Preis resultiert aus den ökologisch begrenzten Ressourcen, der kostenintensiven Isolierung und den geringen Ausbeuten aus den natürlichen Quellen.

### **3.1.2 Bildungsort der Terpenoide**

Die Bildungswege der Terpene oder Terpenoide sind immer noch Gegenstand der Forschung. Orte des Terpenmetabolismus sind bei Pflanzen meist die Plastiden, bei den Pilzen die zahlreichen Mitochondrien und das Endoplasmatische Reticulum (Turner et al. 1999). Einige Limonensynthesen wurden bereits charakterisiert (Tab. 3-1).

---

Tab. 3-1 Charakterisierte Monoterpensynthasen

Enzym	Spezies	Literatur
Limonensynthase	<i>Mentha spicata</i>	Colby et al. 1993, Turner et al. 1999
	<i>Perilla frutescens/citriodora</i>	Karp et al. 1990, Ohara et al. 2003 Yamada et al. 2001
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bohlmann et al. 2000
Myrcensynthase	<i>Quercus ilex</i>	Fischbach et al. 2001
	<i>Ips pini</i>	Martin et al. 2003
	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann et al. 1997
	<i>Thymus vulgaris</i>	Alonso et al. 1991
Terpinensynthase	<i>Thymus vulgaris</i>	Poulose et al. 1978

### 3.1.3 Produktion von neuen Naturstoffen

Monoterpene sind mit etwa 400 Naturstoffen (Devon et al. 1972) wichtige Duft- und Aromastoffe. Wegen der großen Akzeptanz des Verbrauchers gegenüber natürlichen Aromastoffen ist für die Aromaindustrie das Auffinden neuer Aromastoffen zur Abrundung der Aromabouquets von hohem Interesse. Der biotechnologische Ansatz ermöglicht die Verfügbarkeit neuer Naturstoffe oder Komponenten, deren Vorkommen in der Natur nur als Minorbestandteile determiniert ist. Neben diesen Gründen stellen die milden Reaktionsbedingungen der Biotransformation eine nützliche Alternative zur gesellschaftlich stigmatisierten Chemosynthese dar. Der nicht unerhebliche Energie- und Reagenzienaufwand schlägt sich in einer ungünstigen ökologischen Bilanzierung nieder. Ein weiterer Vorteil ist die Verfügbarkeit von Mehrstufensynthesen in einem biotechnologischen Ansatz.

### 3.1.4 Rohstoffe und Marktsituation

Ein biokatalytischer Prozess basierend auf nachwachsenden Rohstoffen (Monoterpenkohlenwasserstoffe) ist im Gegensatz zu einer Kohlenwasserstoffquelle wie Benzen oder Toluol vielversprechend, da die resultierenden Produkte der Öffentlichkeit unter ökologischen Aspekten akzeptabel erscheinen.

#### 3.1.4.1 $\alpha$ -/ $\beta$ -Pinen

Die Pinene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen fallen als Nebenprodukte mit einem Gehalt von 10% in Citrusölen an. Die wichtigste natürliche Quelle der Pinene ist neben den Citrusfrüchten das Kiefernharz. Diese Monoterpenkohlenwasserstoffe werden dort mit 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr isoliert. (+)- $\alpha$ -Pinen ist im Öl von *Pinus palustris* Mill in einer Konzentration von über 65% vorhanden, bei den Spezies *Pinus pinaster* und *Pinus caribaea* sogar mit 70 bis 80%. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Pinen werden aus dem Terpentibaum (*Pistaceae terebinthus* L.) mit einem Gehalt von 22,5%  $\beta$ -Pinen und 15,6%  $\alpha$ -Pinen isoliert (Couladis et al. 2003).  $\beta$ -Pinen, mit einem Marktwert von 0,0075 \$ kg<sup>-1</sup> (Agrawal et al. 1999), ist somit ein ideales Ausgangsmaterial für eine Biotransformation.

#### 3.1.4.2 Limonen

Limonen wird zumeist aus den Schalen von Orangen (*Citrus sudachi*, *Citrus sinensis*) isoliert, die bis zu 95% Limonen enthalten (Ziegler et al. 1998). Die Biosynthese des Limonens findet in den Chromoplasten von *Citrus sinensis* statt (Pérez et al. 1990). Citrusöle wurden 1995 mit einer geschätzten Weltjahresproduktion von ca. 120 000 t gewonnen. Davon beträgt alleine der mengenmäßig dominierende Limonenanteil 36 000 t. Der Preis für Limonen ist mit 1 bis 3 \$ kg<sup>-1</sup> ebenfalls gering (Teunissen et al. 1995, Matthews et al. 1987).

#### 3.1.4.3 $\beta$ -Myrcen

Myrcen fällt weltweit mit 300 bis 600 t pro Jahr an. Mit 2% kommt es in Mandarinenölen und in der Tangerine vor (Feger et al. 2003).

Neben den Citrusölen findet man es ebenso im etherischen Öl der Sitka-Fichte (*Sitka spruce*) mit einem Gehalt von 95% (Hayward et al. 2001).

#### 3.1.5 Die Biotransformation von Terpenen

Seit langem sind Biotransformationen bei der Modifikation von Steroiden bekannt. Hier steht eine Oxofunktionalisierung des Substrates in Anwesenheit von glucosereichen Medien im Vordergrund des Interesses. Die Biotransformation findet so in Form eines Co-Metabolismus statt. In letzter Zeit allerdings widmet man sich vermehrt Organismen, die aktiv in der Lage sind, Terpene zu

---

mineralisieren. Diese Organismen, hauptsächlich Bakterien wie *Pseudomonaden*, sind in der Lage, bei Anwesenheit von bis zu 50% Monoterpenanteil zu wachsen. Interessant sind diese Organismen auch insofern, als dass man mit ihnen eine in der Verfahrenstechnik bevorzugte Zweiphasenfermentation durchführen könnte. Dabei ist die Produktanreicherung in der Terpenphase, als eine Art Lösungsmittel, ein willkommener Nebeneffekt, der die Produktabtrennung erheblich vereinfachen würde. In den letzten 10 Jahren wurde sich vermehrt dem Auffinden lösungsmittel- und terpentoleranter Bakterien, die auch als Expressionssystem dienen sollen, gewidmet. Hiermit verbunden ist die begründete Hoffnung, dass sich diese Organismen als Quelle "organophiler Enzyme" erweisen würden. Der Abbau von Terpenen ist in einigen Fällen bereits gut verstanden und einige Gene sind bereits kloniert (Koga et al. 1989, Ropp et al. 1993, Unger et al. 1986). Diese Organismen (z.B. Basidiomyceten) sind unter natürlichen Bedingungen nicht in der Lage, die jeweiligen Zielprodukte zu akkumulieren. So erfolgt die Produktakkumulation in den meisten Fällen nur transient und in geringen Konzentrationen während einer definierten Kulturphase (Griffiths et al. 1987 a und b, Kieslich et al. 1986, Krasnobajew et al. 1984 und Trudgill 1986). Yamazaki berichtet von Produktausbeuten von weniger als 5%. Eine Ausnahme bilden die Arbeiten Abraham et al. 1985. Hier konnten Produktausbeuten von  $0,46 \text{ g L}^{-1}$   $\alpha$ -Terpineol aus *Penicillium digitatum* erreicht werden. Herausragende Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe mit einem Organismus, der eine Produktion von 900 g (1S,2S,4R)-p-Menth-8-en-1,2-diol aus 1300 g (+)-Limonen innerhalb von vier Tagen durchführte (Abraham et al. 1985).

Die Biotransformation von Terpenen wurde innerhalb der letzten 30 Jahre intensiv erforscht. Sie bietet zahlreiche Vorteile wie:

- Neue Verbindungen mit interessanten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bioaktivität
  - Ressourcenschonende Herstellung natürlicher Aromastoffe
  - Die Ausgangsverbindungen der Biotransformation sind in der Natur als preiswerte, nachwachsende Rohstoffe verfügbar
  - Erzeugung von chiralen Synthone z.B. als Startmaterial für die Chemosynthese (Kieslich et al. 1986)
-

Die mikrobiologische Transformation von Monoterpenen für die Produktion von Terpenoiden ist in der Literatur bereits gut beschrieben (Abraham et al. 1994, Agrawal et al. 2000, Schrader et al. 2001). Sie ermöglicht das Einfügen funktioneller Gruppen an definierten Positionen im Molekül bei milden Reaktionsbedingungen und einem hohen Grad an Enantiomerenreinheit (Einsele et al. 1985, Kaspera 2004). Wegen der Instabilität einiger bereits isolierter Enzyme und ihrer Abhängigkeit von Cofaktoren sind Oxidationen in intakten Zellsystemen sehr wichtig. Obwohl diesen Terpenbio-transformationsprozessen großes ökonomisches Interesse gilt, ist die technische Durchführung meist schwierig. Bisher konnte kein Biotransformationsprozess mit Terpenkohlenwasserstoffen kommerzialisiert werden. Die Entwicklung eines Bioprozesses benötigt die Kenntnis der Löslichkeit, des Dampfdruckes und der Toxizität der entsprechenden Terpene und Terpenoide. Zu den primären Schwierigkeiten gehört die Instabilität der Monoterpene. Es kommt spontan zu chemischen Autoxidationen, E/Z-Isomerisierung, Racemisierung, Hydratisierung, Cyclisierung und zur Polymerisation der Monomere (Clark et al. 1992, Yamazaki et al. 1988). Häufig finden derartige (Autoxidations-) Reaktionen analog zu den biokatalytischen Reaktionen statt. Dies macht es schwierig, zwischen chemischer und biologischer Reaktion zu unterscheiden (Wright et al. 1986). Weitere Schwierigkeiten in Hinblick auf die Autoxidation von ungesättigten Verbindungen können bei pH-Werten über 8 und unter 6 entstehen (Clark et al. 1992). Ebenso katalysieren Metall-Ionen diese chemischen Autoxidationsreaktionen. Auch ein vermehrter Sauerstoffeintrag oder eine Bestrahlung mit UV-Licht können die Autoxidation verstärken (Fröhlich et al. 1990). Wegen der angeführten Gründe war es notwendig, unter milden Bedingungen zu arbeiten, das bedeutet bei milden Temperaturen (24 °C) und möglichst neutralem pH-Wert.

Es ist zu erwarten, dass in einer aktiven Kultur durch die erhöhte Sauerstoffzehrung geringere Sauerstoffeintragsraten vorliegen. Daher wurden die Werte für die Produktbildung während des Kulturverlaufes nicht um den Blindwert korrigiert. Um dennoch die erzielten Ergebnisse angemessen diskutieren zu können, wurde zum Vergleich bei jedem Experiment ( $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen,  $\beta$ -Myrcen und  $\gamma$ -Terpinen Supplementierung) ein Organismus, der kein biochemisches Potential zur Terpententransformation besitzt, gegenübergestellt.

---

### 3.1.6 Geringe Löslichkeit von Terpenkohlenwasserstoffen

Weitere Schwierigkeiten ergaben sich, wie in der folgenden Tabelle 3-2 zusammengefasst, durch die geringe Löslichkeit der Terpensubstrate. Damit ist die Substratverfügbarkeit zumeist der limitierende Faktor in der Biotransformation. Häufig wird die sich dadurch ergebende Problematik mittels Substratvermittlern in Form von Emulgatoren, Gasphasendosierung oder Cosolventien behoben (Van Keulen et al. 1998, Demyttenaere et al. 2001 a).  $\alpha$ -Pinen weist mit  $0,026 \text{ mmol}^{-1}$  die beste Löslichkeit aller eingesetzter Monoterpene in wässrigen Medien auf.

Tab. 3-2 Stoffeigenschaften von Monoterpenkohlenwasserstoffen aus Citrusfrüchten

	$\alpha$ -Pinen	$\beta$ -Pinen	Limonen	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen
CAS	7785-70-8	19902-08-0	5989-27-5	99-85-4	123-35-3
Log P <b>a</b>	4,44	3,97	4,03	4,43	4,49
Löslichkeit [mmol L <sup>-1</sup> ] <b>c</b>	0,026	0,049	0,045	-	0,043
Siedepunkt [°C] <b>b</b>	156	164	178	182	167
LD50 <sub>Ratte</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ]	3700	4700	5300	3650	>500
Kennzeichnung	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub>	-
d <sub>4</sub> <sup>20</sup>	0,855	0,872	0,841	0,849	0,794
Dampfdruck P <sup>0</sup> [Pa] [25°C] <b>d</b>	529±73	-	213±29	-	251±35

**a** www.logp.com **b** nach Beilstein **c** Löslichkeiten nach Schmid et al. 1992, **d** Dampfdruck nach Fichan et al. 1999

### 3.1.7 Flüchtigkeit der Monoterpene

Die maßgebende Eigenschaft für die Verwendung von Monoterpenen als Aromastoffe, ist ihre Flüchtigkeit. Allerdings führt diese physikalische Eigenschaft oft zu Verlusten über den Kulturverlauf. Hier ist ein Mittelweg zu suchen, da ein optimaler Sauerstoffeintrag für den Mikroorganismus essentiell ist, dies aber meist zu Substrat- und Produktverlusten führt. Diese Information über die Flüchtigkeit einer Verbindung ist für die Behandlung des biologischen Transformationsprozesses, bei dem Terpene als Substrat in rein wässrigen Phasen verwendet werden, sehr nützlich. So macht Fichan die geringe Löslichkeit der Substrate und deren hohe Flüchtigkeit für die fehlende Produktbildung verantwortlich (Fichan et al. 1999) (Tab. 3-2).



### 3.1.8 Toxizität und Löslichkeit von Terpenen

Das größte Problem allerdings stellt die Cytotoxizität der Terpenkohlenwasserstoffe dar. So führt eine Terpendosierung im geringsten Fall zu einer Wachstumshemmung, im dramatischsten Fall zur Zellyse (Andrews et al. 1980, Kurita et al. 1981, Wolken et al. 2002). Nach Van der Werf zeigt eine Kultur bei einer Monoterpensupplementierung von über 0,05% (v/v) kein weiteres Wachstum mehr (Van der Werf et al. 1997). Es wird davon ausgegangen, dass die lipophilen Terpene an die Zellwände adsorbieren und schließlich die Membranfluidität massiv stören. Folge der Überdosierung kann ein Zusammenbruch der Permeabilität und ein Verlust der Membranintegrität sein. Aber auch eine erhöhte Membranfluidität kann zum Funktionsverlust von membrangebundenen Enzymkomplexen, die bei der oxidativen Transformation von Terpenen beteiligt sind, führen (Masaphy et al. 1995, Sikkema et al. 1994).

Offensichtlich gibt es jedoch einige Stämme, die dort eine Ausnahme bilden. Sie sind in der Lage, hohe Gehalte von zum Beispiel Toluol zu tolerieren. Diese Organismen reagieren auf Lösungsmittelstress mit einer *cis-trans*-Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren (Membranphospholipide) (Heipieper et al. 1994, Weber et al. 1994).

Viele Studien belegen den wachstumsinhibierenden Effekt von Limonen bei zahlreichen Mikroorganismen (Bowen 1975, Chang et al. 1994, Uribe et al. 1990). Sie machten dafür den Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung verantwortlich. Ein guter Indikator für die Cytotoxizität einer Verbindung ist der Log P-Wert, also der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Wasser. So gelten Substanzen mit einem Log P-Wert zwischen 1 und 5 als cytotoxisch. Die in dieser Arbeit verwendeten Terpene besitzen Log P-Werte zwischen 4,0 bis 4,5 (Tab. 3-2). Ein Weg zur Prävention bildet die Gasphasendosierung (Hartmans et al. 1990).

In Hinblick auf ihre Cytotoxizität gelten die Terpenoide generell als bedenklicher als ihre Ausgangsverbindungen (Knobloch et al. 1988).

### 3.1.9 Lange Inkubationszeiten

Viele Biokonversionen, besonders durch Pilze, gelten gemeinhin in der Kulturführung als zeitaufwendig. In Ganzzellsystemen erwiesen sich die Organismen als weniger kostenintensiv, da ein endogenes Co-Faktorrecycling

---

erfolgte. Im Gegensatz zu den kostenintensiven Enzymbehandlungen bildet die Ganzzellbiokatalyse eine sinnvolle Alternative.

### 3.1.10 Enzyme

Das Vorhandensein terpen-metabolisierender Enzymsysteme ist Grundvoraussetzung für die Möglichkeit zur effektiven Transformation exogener Terpene, die im natürlichen Substrat saprotroph oder parasitisch wachsender Pilze enthalten sind. Ähnliche Nahrungsquellen müssen auch durch Hefen oder Bakterien erschlossen werden. Die verantwortlichen Exoenzyme erweisen sich als zumeist sehr stabil. Sie stammen unter anderem aus Mikroorganismen, die in der Lage sind, unter extremsten Bedingungen zu überleben. Diese Organismen sind thermophil, acidophil, psychrophil, halophil oder barophil. Für diese stabilen Enzyme gibt es in der Industrie vielseitige Verwendung, unter anderem als Ersatz für existierende Katalysatoren (Fessner et al. 2001). Letztendlich stammen die meisten in der Lebensmittelindustrie verwendeten Enzyme aus lediglich ca. 25 Mikroorganismen. Zahlreiche chemische Reaktionen sind durch Biokatalyse prinzipiell möglich, wie zum Beispiel Oxidationsprozesse durch Oxidoreduktasen, Esterspaltungen durch Hydrolasen, aber auch Lyasen und Isomerasen. Eine Zusammenfassung des Potentials von katalytischen Möglichkeiten resümiert die folgende Tabelle 3-3.

Tab. 3-3 Enzymklassen in der Biokatalyse (verändert nach Van der Werf et al. 1997)

Enzymklasse	Reaktion
Oxidoreduktase	Redoxprozess
Hydrolase z.B. Esterase, Lipase und Amidase	Hydrolyse
Lyase	Öffnung von C-C, C-O und C-N Bindung, Eliminierung oder Addition der Doppelbindung
Isomerasen	Isomerisierung, Epimerisierung, Racemisierung

### 3.1.10.1 Allylische Hydroxylierung

Die allylische Hydroxylierung ist aus der Sicht des Aromabiotechnologen die wichtigste Enzymreaktion. Ihren Produkten gilt ökonomisches Interesse, wie zum Beispiel bei Carveol, Borneol, Verbenol und Nootkatol.

### 3.1.10.2 Ringschluss und Ringöffnung

Monoterpene können in acyclische, monocyclische und bicyclische Terpene eingeteilt werden. Anwendungen finden diese Ringschluss-Reaktionen zum Beispiel bei der patentierten Cyclisierung von Citronellal zu Pulegol durch *Penicillium digitatum* (Babicka et al. 1955). Andererseits konnten auch die bicyclischen Terpene wie  $\alpha$ -Pinen zu monocyclischen Verbindungen wie Limonen und Sotroterol konvertiert werden (Wright et al. 1986, Shukla et al. 1968, Narushima et al. 1982). Eine  $\alpha$ -Pinenoxidlyase konnte charakterisiert werden, die  $\alpha$ -Pinen zu *cis*-2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (*iso*-Novalal) konvertierte (Trudgill 1994).

### 3.1.10.3 Monooxygenasen katalysieren Hydroxylierungen

Terpenoide besitzen zumeist einen stärkeren Geruchseindruck als ihre entsprechenden Terpenkohlenwasserstoffe. Monooxygenasen katalysieren das Einfügen eines Sauerstoffatoms z.B. in ein Monoterpensubstrat. Drei Terpenmonooxygenasen wurden bereits aufgereinigt und charakterisiert (verändert nach Van der Werf et al. 1997):

1. Campher Monooxygenase (*Pseudomonas putida*)
2. Linalool Monooxygenase (*Pseudomonas putida*)
3.  $\alpha$ -Terpineol Monooxygenase (*Pseudomonas sp.*)

Diese Monooxygenasen sind in der Lage eine breite Palette von ähnlichen Substraten zu katalysieren. So sind sie für die industrielle Anwendung von großem Interesse. Wegen ihrer breiten Substratspezifität sind diese Monooxygenasen auch zur Produktion von chiralen Synthonsen wichtig.

---

### 3.1.11 Aktivitätsscreening: Auswahl der Organismen und Selbstisolate

Jährlich werden in der Natur etwa  $1,75 \times 10^8$  Tonnen Terpene, vorwiegend in Wäldern, produziert (Voisvillo et al. 1970). Insbesondere unter den Basidiomyceten und Ascomyceten findet man zahlreiche Stämme, die von terpenhaltigen Substraten wie z.B. Nadelhölzern oder Citrusfrüchten isoliert wurden. Es liegt nahe, dass diese Mikroorganismen fähig sind, Monoterpenkohlenwasserstoffe zu verstoffwechseln.

In einem Screening sollten zunächst monoterpenabbauende Organismen selektioniert werden. Die Mikroorganismen wurden nach verschiedenen Kriterien, die im Einzelnen näher erläutert wurden, ausgewählt (siehe 2.2.1). In 104 Screeningexperimenten in Submerskultivierung wurden Ascomyceten, Basidiomyceten, Hefen und Bakterien auf ihre Fähigkeit zur Monoterpenbiotransformation untersucht (Tab. 6.1-6.3 im Anhang). Es zeigte sich, dass die meisten der in der Literatur beschriebenen Organismen nicht in der Lage waren, Terpensupplementierungen von über 10 mM zu tolerieren. Daher wurden Organismen isoliert, die bereits augenscheinlich in der Lage waren, z.B. beim Wachstum auf terpenhaltigen Drüsenhaaren von Salbei, auf terpenhaltigen Substraten zu wachsen.

Bei den Trichomen von Salbei handelt es sich um Drüsenhaare, die zwischen Zellwand und Cuticula terpenhaltige Sekrete (etherische Öle) ausscheiden. Dieses etherische Öl kann wegen seiner lipophilen Beschaffenheit durch die abgehobene Cuticula hindurch verdunsten. In anderen Fällen reißt die Cuticula, z.B. durch Berührung, auf und lässt das Sekret austreten (Turner et al. 1999). Das sekretierte etherische Öl besteht hauptsächlich aus acht Verbindungen:  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, 1,8-Cineol,  $\alpha$ -Thujon,  $\beta$ -Caryophyllen,  $\alpha$ -Humulen, Leden und Biformen (Trillini et al 1999; Vera et al.1999). Dieses durch Wasserdampfdestillation gewonnene, hochwertige pflanzliche Öl findet in Zahnpasta, Mundwässern und in der Parfümerie als Gewürznoten Lavendel, Chypre, Fourgère Verwendung (Roth et al. 1996).

Isolate aus natürlichen Habitaten sind in der Mikrobiologie für ihre herausragenden Eigenschaften bekannt, so zum Beispiel für ihre Fähigkeit Toluol, Benzen, Xylen und Ethylbenzen zu degradieren (Lau et al. 1997, Lee et al. 2001). So ist ein fluoreszierendes Erdbakterium *Pseudomonas putida* F1 (PpF1) für seine Fähigkeit, Toluol zu degradieren (*tod*-Pathways), bekannt (Lau et al. 1994). Neben einem Wachstum auf Toluol, Ethylbenzen oder Benzen als Kohlenstoffquelle ist

---

*Pseudomonas putida* F1 (PpF1) auch in der Lage auf p-Cymen (p-Isopropyltoluen), seinen Säurederivaten sowie p-Cumat zu wachsen (Eaton et al. 1996,1997). Ausgelöst durch Lösungsmittelstress werden eine Reihe von Genen angeschaltet, die für die Lösungsmitteltoleranz verantwortlich gemacht werden (Phoenix et al. 2003).

Interessanterweise finden Ascomyceten sowie Basidiomyceten eine breite Anwendung bei der Lösung vielfältiger technischer Probleme wie z.B. bei der Klärung von Abwässern der olivenölproduzierenden Industrie (Kahraman et al. 1999). Aber auch im negativen Sinne ist die Fähigkeit von Mikroorganismen, eine Vielzahl von Substraten zu metabolisieren, herausragend. So beschreibt zum Beispiel Gaylarde (Gaylarde et al. 1999) eine massive mikrobiologische Kontamination von gelagerten Dieselfässern. In Brasilien wird eine Menge von 0,05% Wasser in Diesel geduldet. Dies kommt durch eine allmähliche Kondensation von Wasser an den Tankwänden sowie durch die hohe Luftfeuchtigkeit zustande. Hill et al. 1993 konnte ein mikrobiologisches Wachstum bei einem Wassergehalt von 1% verzeichnen. Ein feiner Wasserfilm auf der Tankoberfläche gilt als ausreichend. Folge dieses Bewuchses sind, neben der Korrosion der Tankbehälter, eine Blockierung der Filter sowie Faulprozesse, die großen technischen und finanziellen Aufwand bedeuten. So gestaltet sich die Lagerung eben dieser Fassware als äußerst kritisch. Identifiziert wurden Organismen der Gattung *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* und *Stemphylium*.

Im Screening wurde die Annahme, dass auch die Terpene einem mikrobiellen Abbau unterliegen können, bestätigt. Vor allem die von Citrusfrüchten isolierten Organismen waren in der Lage, größere Mengen der anfallenden Terpenfraktionen zu biodegradieren. Leider erfolgte hier nur eine geringe Produktakkumulation ( $< 10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Zwei Organismen fielen durch ihre hohe Terpentoleranz und erhöhte Produktbildung auf. Diese Organismen (*Penicillium solitum* und *Stemphylium botryosum*) tolerierten Konzentrationen von über 30 mM (Limonen und  $\gamma$ -Terpinen).

---

### 3.2 Transformation von $\alpha$ -Pinen

Im Screening in Submerskultur war ein Organismus aufgefallen, der  $\alpha$ -Pinen abbaute und die Zielverbindungen Verbenol und Verbenon bildete. Acht weitere sensorisch interessante Verbindungen konnten über den Kulturverlauf von 10 Tagen identifiziert werden (2.2.6).

*Serratia marcescens*, ein Prokaryont, wurde als ein  $\alpha$ -Pinen transformierender Stamm aus einer Abwasserprobe isoliert. *trans*-Verbenol war bei diesem Transformationsprozess das Hauptprodukt neben den Minorprodukten Sobrerol und Verbenon. Wright et al. 1986 postulierte die in Abb. 3-1 gezeigten Degradationswege für  $\alpha$ -Pinen.

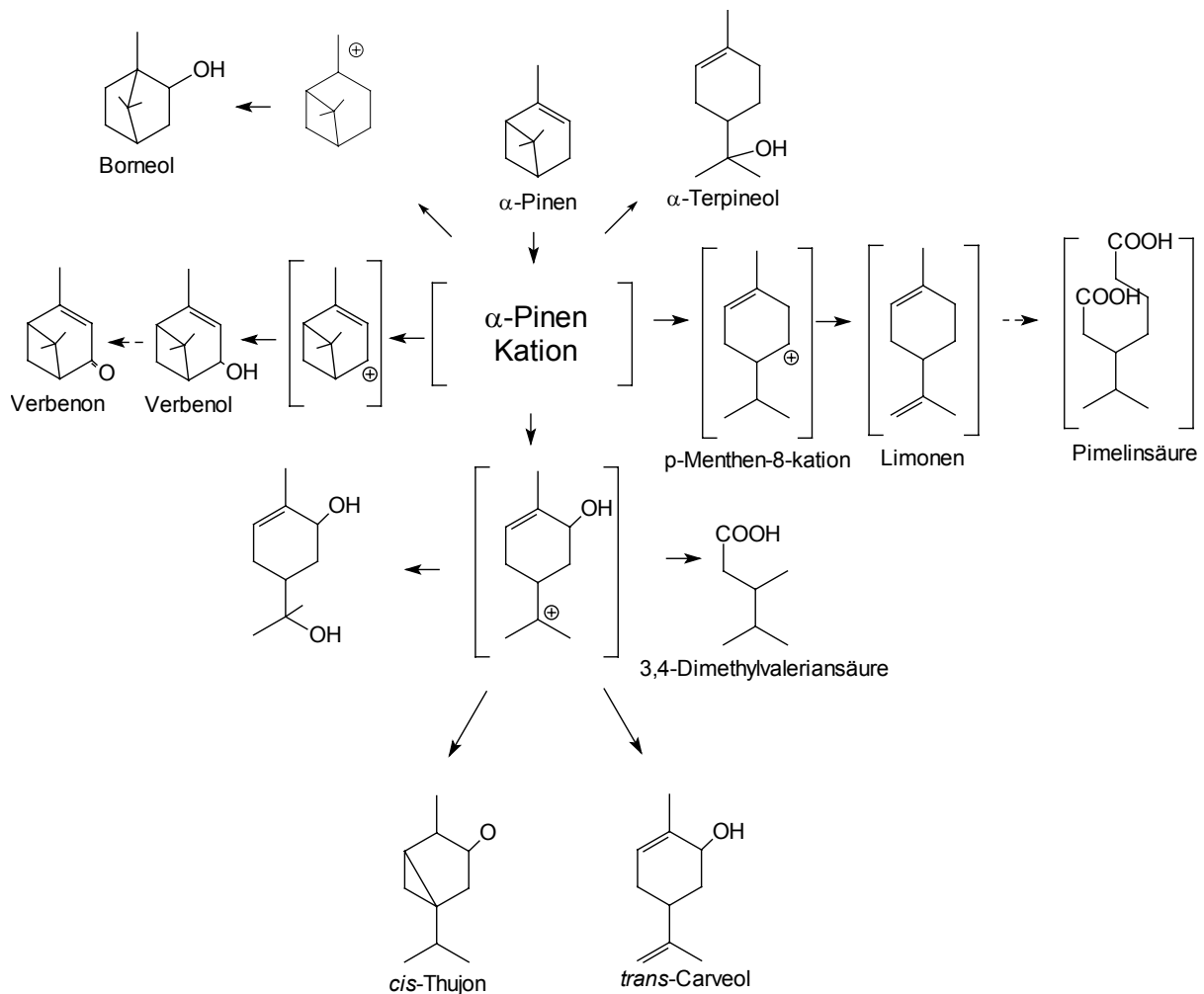


Abb. 3-1 Hauptwege der  $\alpha$ -Pinendegradation bei *Serratia marcescens* (verändert nach Wright et al. 1986)

Ausgehend vom Kation folgt eine Degradation über ein postuliertes p-Menthen-8-kation. Shukla und Bhattacharyya (1968) berichteten über einen Abbauweg über Limonen zur  $\beta$ -Isopropylpimelinsäure. Gibbon et al. (1972) konnten zeigen, dass *cis*-Thujon und *trans*-Carveol gebildet werden, wenn im Degradationsweg 3,4-Dimethylvaleriansäure gebildet wird.

Griffiths (Griffiths et al. 1987 a, b) fertigte detaillierte Studien vom ( $\pm$ )- $\alpha$ -Pinen-Metabolismus und dem postulierten Abbauweg bei einem *Nocardia*-Stamm an. Dieser Organismus war nicht in der Lage auf Pinen bei einer direkten Zugabe ins Medium zu wachsen. Wurde Pinen über die Gasphase dosiert, konnte ein Wachstum des Stammes beobachtet werden. Es konnte ein Epoxid als erstes Produkt der Pinendegradation identifiziert werden. Verantwortlich gemacht für einen Schritt in der Pinenbiodegradation wurde eine  $\alpha$ -Pinen-Oxidlyase. Die Aufreinigung wurde durch Griffiths et al. 1987 beschrieben. Dieses Enzym katalysiert die Öffnung des bicyclischen Monoterpenes  $\alpha$ -Pinen unter Bildung eines Aldehyds.

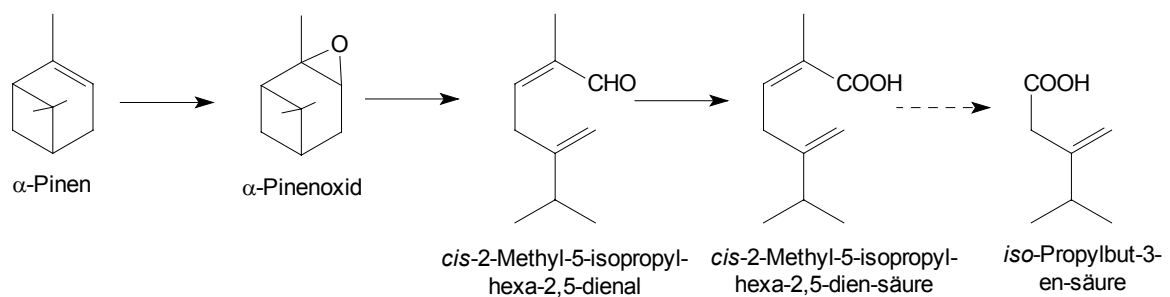


Abb. 3-2 Degradation von  $\alpha$ -Pinen durch *Nocardia* sp. (nach Griffiths et al. 1987)

Erstaunlich war die Charakterisierung des  $\alpha$ -Pinen-Abbaus durch einen *Pseudomonas*-Stamm. Dieser Stamm war in der Lage eine NADH-vermittelte Oxidation des Pinens zum  $\alpha$ -Pinenoxid durchzuführen. Dieses Pinenoxid wurde ähnlich wie bei *Nocardia* durch eine  $\alpha$ -Pinen-Lyase weiter degradiert. So konnte gezeigt werden, dass eine adaptierte Kultur in der Lage war, bei Anwesenheit von 0,1 bis 0,5%  $\alpha$ -Pinen zu wachsen (direkte Dosierung ins Medium) (Best et al. 1987). Eine Degradation von  $\alpha$ -Pinenoxid konnte auch bei *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761 beobachtet werden. Für diese Umsetzung konnten eine Carboxylase, Lyase und eine Epoxidase verantwortlich gemacht werden (Zorn et al. 2004). Die Hauptkonversionsprodukte von  $\alpha$ -Pinen

durch *Aspergillus niger* (NCIM612) waren Verbenol, Verbenon und (+)-*trans*-Sobrerol (Bhattacharyya et al. 1960). Weber et al. 1988 patentierte einen Prozess, in dem *Acetobacter methanolicus* in 100 min mit einer Ausbeute von 47% *trans*-Verbenol aus 30 g  $\alpha$ -Pinen transformiert. Diese Transformation fand in glucosereichen Medien mit Methanol statt, bei Limitierung der Stickstoffquelle. Einige Organismen schlugen einen anderen enzymatischen Weg bei der Oxidation von  $\alpha$ -Pinen ein. Die daraus resultierenden Verbindungen sind neben anderen Borneol, Myrtenol, Verbenol und Verbenon (Mikami 1988).

Die Konversion von  $\beta$ -Pinen fand bevorzugt zu Myrtenol, Pinocarveol und Pinocarvon statt (Abraham et al. 1985). Van Keulen et al. 1998 zeigte, dass es mit einer Zweiphasenfermentation durch *Pseudomonas putida* und einer Supplementierung von 0,5% (v/v)  $\alpha$ -Pinen zu keiner Wachstumsinhibierung des Pseudomonadenstammes kam. Der Zusatz von  $\alpha$ -Pinenoxid zeigte jedoch eine schwere Inhibierung im Wachstumsverhalten.

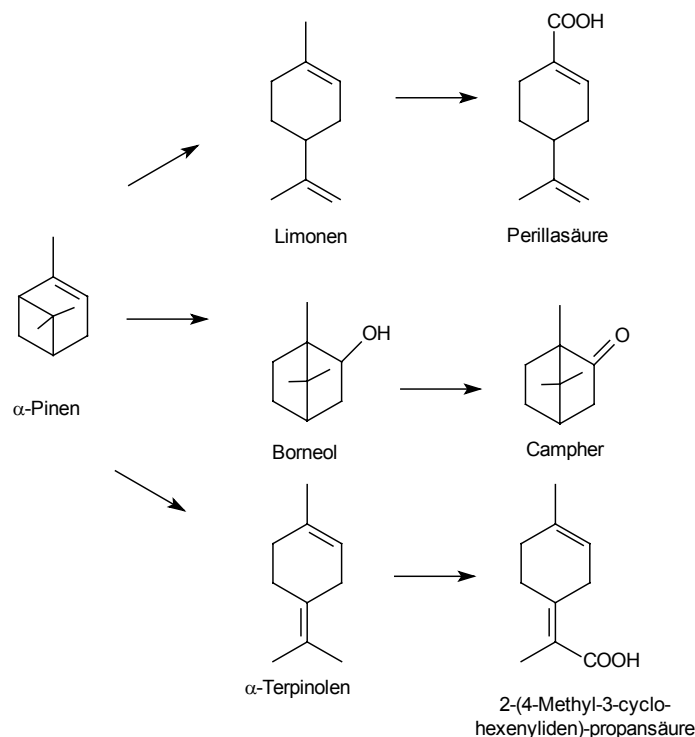


Abb. 3-3 Schematischer Transformationsweg von  $\alpha$ -Pinen durch *Pseudomonas maltophila* S201-1 (Narushima et al. 1982)

Als Produkte der Biokonversion durch *Pseudomonas maltophila* konnten Limonen, Borneol, Campher, Perillasäure und 2-(4-Methyl-3-Cyclohexenyliden)-propansäure identifiziert werden (Narushima et al. 1982). Kultiviert wurde dieser *Pseudomonas*-



Stamm bei 30 °C für fünf Tage, bei einer Dosierung von 31 mM Pinen (Mineralmedium).

Die Hauptmetabolite bei der Biotransformation mit  $\alpha$ -Pinen waren Verbenol, Verbenon, Myrtenol und *trans*-Pinocarveol.

Verbenol, Verbenon und Myrtenol resultieren aus der allylischen Oxidation des  $\alpha$ -Pinens, wohingegen unter Myrtenolbildung das C1-Atom bei  $\alpha$ -Pinen oxidiert wurde. In geringen Mengen konnte auch Myrtenal gefunden werden. Busmann et al. 1994 b konnten das spezifische Einfügen der Hydroxygruppe in dem bicyclischen System als hoch regioselektiv charakterisieren. In Pseudomonaden wurde  $\alpha$ -Pinen zu  $\beta$ -Isopropyl-pimelinsäure und  $\beta$ -Isopropenyl-pimelinsäure durch Ringöffnung des Substrates transformiert (Hungund et al. 1970). Bei der Biotransformation der Substrate  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen durch *Penicillium solitum* wird eine Oxidation in allylischer Position bevorzugt. Eine hohe Stabilität des allylischen Kations in der Position 3 kann für die hohen Konzentrationen von *trans*-Pinocarveol, Verbenol und Myrtenol verantwortlich sein.

Bei Transformationsversuchen mit dem Basidiomycet *Pleurotus flabellatus* konnte nach einem Kulturtag eine maximale Produktakkumulation von 4 mg L<sup>-1</sup> Verbenon (Dosierung 9 mM  $\alpha$ -Pinen) erreicht werden (Busmann et al. 1994 b). Es wurden insgesamt in einer Zeit von acht Tagen 6 g L<sup>-1</sup> Glucose abgebaut. Es bleibt festzuhalten, dass bei der Biokatalyse mit Basidiomyceten ähnliche Transformationsprodukte wie mit dem Ascomyceten *Penicillium solitum* zugänglich sind, aber wesentlich geringere Produktausbeuten erreicht werden können. Bei einer Bilanzierung der Produktausbeuten ist desweiteren zu berücksichtigen, dass größere Mengen Glucose über den gesamten Kulturverlauf verfügbar sein müssen.

---

### 3.2.1 *Penicillium solitum* in der Biotechnologie

*Penicillium* ist eine Gattung mit ca. 150 Spezies mit ähnlicher Morphologie. Dieser Genus ist von einer großen Variabilität der Spezies geprägt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Organismen der gleichen Art bei einem Aktivitätsmonitoring ein heterogenes Profil hinsichtlich ihres Potentials zeigten. Es sind fast 10000 verschiedene Phänotypen charakterisiert (Pianzzola et al. 2004). Gerade diese Variabilität der Gattung *Penicillium* erschwert eine genaue Klassifizierung. Die meisten taxonomischen Einordnungen basieren primär auf der Mikro- bzw. Makromorphologie und den vom Mycel produzierten Farbstoffen. Die rein morphologische Bestimmung beschreiben zahlreiche Autoren (Frisvad 1981 und 1983, Pitt 1988). Mit Hilfe einer genotypischen Charakterisierung können diese Ascomyceten eindeutig durch Sequenzvergleiche identifiziert werden.

Bei der Identifizierung wird zunächst eine Reinkultur auf Standardmedium kultiviert und hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Anschließend erfolgt eine Analyse der Fettsäuren, ein Oxidase- und Katalasetest sowie eine Ansequenzierung der 18S rDNA (White et al. 1990). Sollte keine eindeutige Identifizierung mit diesen Methoden möglich sein, folgen individuelle physiologische Tests und Spezialanalysen wie die Analyse der DNA-Zusammensetzung (G/C mol %) mittels HPLC und eine DNA-DNA Hybridisierung (Ribotyping).

*Penicillium solitum* wurde von Pitt et al. (1991) als phytopathogener Organismus, der vorwiegend auf Obstgehölzen wächst, beschrieben. Rundberget bezeichnete *Penicillium solitum* als eine von 25 *Penicillium*-Arten, die auf sehr heterogenen Substraten wachsen (Rundberget et al. 2002). So gilt dieser Organismus unter dem Synonym *Penicillium casei* als Käseverderber, wächst aber hauptsächlich auf heterogenen Gemischen wie sie im häuslichen Abfall anfallen (Lund et al. 1998, Larsen et al. 2002).

In diesem Zusammenhang wird der Organismus von einer Arbeitsgruppe in Russland erforscht. Mittels cytochemischer Methoden und Immunfluoreszenz wurden aktive Lipasen in der Hyphenzellwand gefunden, die im Cytoplasma nicht vorhanden waren. Vermutet wurde eine aktive Sekretion des Proteins über den Kulturverlauf (Toskueva et al. 1988 a und b).

*Penicillium solitum* gilt als eine in der Taxonomie vernachlässigte Spezies. Als Organismus zur Transformation von Terpen-Kohlenwasserstoffen unter

---

aromabiotechnologischen Gesichtspunkten ist der Pilz in der Literatur nicht bekannt.

### 3.2.1.1 Mycotoxine

Für die industrielle Anwendung ist neben den Produktausbeuten und dem kostentragenden Produktionsverfahren auch die Produktqualität von Bedeutung. Da das Wachstum von filamentösen Pilzen auf Lebensmitteln eine Produktion von Mycotoxinen zur Folge haben kann, müssen diese Toxine entfernt werden (Pitt 2000). Nicht alle der aromastoffproduzierenden Organismen bilden prinzipiell Mycotoxine. Auch ist deren Produktion zumeist abhängig von bestimmten physiologischen Bedingungen wie z.B. UV-Bestrahlung oder Glucosemangel. In Submerskultivierung ist mit einer verstärkten Mykotoxinproduktion nicht zu rechnen. Sollte allerdings eine Akkumulation eines dieser Mykotoxine erfolgen, so ist es die in der Lebensmitteltechnologie übliche Methode der Destillation, mit deren Hilfe eine Abtrennung der flüchtigen Aromastoffe von den wenig flüchtigen Mycotoxine einfach erfolgen kann.

Ascomyceten der Gattung *Penicillium* gehören zu den wichtigsten Mycotoxinproduzenten (Frisvard et al. 1995) (Tab. 3-4). Die dominante Spezies ist *Penicillium crustosum* (Torp und Skaar et al. 1998). *Penicillium roquefortii* und *Penicillium carneum* sind gut charakterisierte Produzenten von Roquefortin C (*Penicillium roquefortii*) und Patulin (*Penicillium carneum*) (Frisvad et al. 1989).

Tab. 3-4 Mycotoxine aus *Penicillium* Stämmen

<b>Penicillium Spezies</b>	<b>Mycotoxin</b>
<i>Penicillium carneum</i>	Patulin
<i>Penicillium roquefortii</i>	Roquefortine C
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Penitrem A, Viomellein
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roquefortine C
<i>Penicillium expansum</i>	Roquefortin, Patulin, Chaetoglobosin
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Roquefortin C, Patulin, Griseofulvin
<i>Penicillium viridicatum</i>	Viomellein, Xanthmegrin
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Mycophenolsäure
<i>Penicillium verucosum</i>	Ochratoxin A, Citrin

Seit 1960 wird *Penicillium roquefortii* in der industriell patentierten Anwendung zur Produktion von Methylketonen, einem wichtigen Blauschimmelaroma, verwendet (Dwivedi et al. 1974, Nelson et al. 1970).

Für *Penicillium solitum* sind keine bedenklichen Mycotoxine in der Literatur beschrieben.

### **3.2.2 Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen RSF durch *Penicillium solitum***

Die etherischen Öle machen lediglich < 0,1% bis 5% der Pflanze aus und gelten als komplexe Gemische. Die kommerzielle Extraktion von Minorkomponenten gestalteten sich kostenintensiv. Mit Hilfe der Biotransformation können zahlreiche Aromastoffe bereits als Einzelkomponenten synthetisiert werden. Ein terpentolerantes Modellsystem, in dem eine Reihe von Terpenkohlenwasserstoffgemischen biokonvertiert werden konnte, wurde bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit ist es gelungen, ein  $\alpha$ -Pinen-Transformationssystem mit Modellcharakter zu etablieren. Der Organismus *Penicillium solitum* besitzt alle Vorteile von höheren Pilzen hinsichtlich der Oxofunktionalisierungsfähigkeit.

### **3.2.3 Limonentotalkatabolismus**

Die ersten Arbeiten zur Biodegradation von Limonen wurden vom Indian National Chemical Laboratory in den 60er Jahren durchgeführt (Dhavalikar et al. 1966 a, b). Die Autoren isolierten einen *Pseudomonas*-Stamm, der in der Lage war, auf Limonen als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass der Pseudomonadenstamm in der Lage war, neben Limonen auch auf p-Cymen als C-Quelle zu wachsen (Dhavalikar et al. 1966). *Pseudomonas* und *Bacillus* verwerten den Hauptteil der Limonenabbauprodukte als Kohlenstoff/Energiequelle durch die Oxidation der C7 Methylgruppe (Perillasäure) gefolgt von einer anschließenden  $\beta$ -Oxidation. Es wurden Produkte wie Dihydroxycarvon, Carvon, Carveol, Limonen-1,2-*cis*-diol, 1-Hydroxy-2-oxo-limonen, Limonen-1,2-*trans*-diol, Limonen-6,9-diol, Perillasäure,  $\beta$ -Isopropenylpimelinsäure, 2-Hydroxy-8-p-menthen-7-säure und 6,9-Dihydroxy-perillasäure gefunden.

---

Speelmans et al. 1998 isolierte einen *Pseudomonas putida* GC1 Stamm, der ebenfalls Limonen als Kohlenstoffquelle nutzte. Mars et al. 2001 postulierte, dass die ersten drei Enzyme vom Cymen-Degradationsweg in *Pseudomonas putida* GS1 (Cymen-Monooxygenase und zwei Dehydrogenasen) verantwortlich für die Biokonversion von Limonen zur Perillasäure sind. In einem molekularbiologischen Ansatz wurden die codierenden Gene kloniert. Diese rekombinanten *Escherichia coli* Stämme, die Gene *cym* des Cymen-Degradationsweg trugen, waren in der Lage, Limonen zu Perillasäure zu oxidieren. Ein großer Nachteil dieses molekularbiologischen Ansatzes ist jedoch die obligate Anwesenheit von reinen Ausgangsverbindungen (Mars et al. 2001, Chang et al. 1994).

Der Pilz *Corynespora cassicola* z.B. wurde zur Produktion von (1S,2S,4R)-p-Menth-8-en-1,2-diol verwendet (Abraham et al. 1985). Der Organismus wuchs in glucosereichem Medium in einem 70 L Batch-Bioreaktor. Um toxischen Effekten vorzubeugen, erfolgte die Limonendosierung durch die Gasphase. Mit dieser Headspace-Dosierung war man in der Lage, mehr als 1 kg des (1S,2S,4R)-p-Menth-8-en-1,2-diols aus Limonen zu transformieren. Als weiterer vielversprechender Organismus war *Pseudomonas alcaligenes* (IM88) in der Lage, in einem Zweiphasensystem Limonen/Medium zu wachsen. Da Limonen nur mit 0,045 mM in wässrigen Medien löslich ist und die potentiellen Produkte wie z.B. Terpenalkohole (Carveol) eine höhere Löslichkeit besitzen, ist eine Erhöhung der Cytotoxizität über den Kulturverlauf zu erwarten.

Ein weiterer Stamm ist bekannt für eine Limonendegradation. Eine *Pseudomonas* Species wurde aus einem bewachsenen Zweiphasensystem aus Limonen und Wasser isoliert. Eine Lyase konnte aus *Pseudomonas* aufgereinigt werden, die mit der Detoxifizierung von Limonen korreliert wurde (Teunissen et al 1995).

Bei den meisten Organismen ist eine hohe Terpentoleranz nicht gegeben. Die Arbeiten an einem Limonenbiokonversionssystem haben dann alle Nachteile, die durch den Umgang mit Terpenen entstehen. So gibt es ungewünschte Aspekte wie Substrat- und Produkttoxizität, chemische Instabilität der Substrate und Produkte, die eine erfolgreiche Biotransformation erschweren.

Um diese Nachteile von Substrat- und Produkttoxizität zu minimieren, wurde mit lösungsmitteltoleranten Organismen gearbeitet. Wenn man die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse betrachtet, werden Modifikationen seitens des Organismus in Position 2 und 4 des Limonens vorgenommen: Im Medium konnte über den Kulturverlauf von 12 Tagen Carveol und  $\alpha$ -Terpineol gefunden werden.

---

*Penicillium solitum* tolerierte eine Dosierung von 0,5% (v/v) Limonen. Dies ist insofern erstaunlich, da ein Gehalt von 0,02% Limonen als fungizid gilt (Murdock et al. 1960).

Bei der Hefe *Zygosaccharomyces* ist eine Konzentration von 0,02% Limonen bereits toxisch. In der Lebensmitteltechnologie sollen diese Schalenöle zur Prävention von mikrobiellen Kontaminationen eingesetzt werden.

In dieser Arbeit konnte ein Modellorganismus für die Biokatalyse einer Vielzahl von Terpenen und Terpenoiden gefunden werden. Eine Besonderheit bildete die selektive Degradation von Substraten wie  $\alpha$ -Pinen und (+)-Limonen.

Ferner wurde, ausgehend vom Modellcharakter der Reinstoffbiokatalyse, ein komplexes Terpengemisch transformiert. Im Unterschied zu den Transformationsversuchen mit Reinstoffen überwog bei der Dosierung der Reststofffraktion die Biodegradation der Terpenkohlenwasserstoffe, was zu einer Aufwertung des sensorischen Eindrucks führte.

Es ist notwendig, weitere Aufschlüsse über die Enzymatik dieses terpendegradierenden Organismus zu erhalten und diese beteiligten Enzyme in einem geeigneten Expressionssystem zu überexprimieren.

Die Degradation von Limonen ist von Bakterien der Gattung *Rhodococcus* und *Pseudomonas* bekannt (Mars et al. 2001, Van der Werf et al. 1999). Sie kommt in Form eines Co-Metabolismus in Anwesenheit von glucosereichem Medium nicht selten vor. Bei der Degradation durch *Penicillium solitum* schien es sich jedoch um eine selektive Degradation von Limonen unabhängig vom Glucosegehalt zu handeln.

*Rhodococcus erythropolis* assimiliert neben Limonen alle Stereoisomere von Carveol und Dihydrocarveol als Kohlenstoff- und Energiequelle. (Van der Werf et al. 1999). Van der Werf konnte zeigen, dass alle vier Diastereomere der Carveole über die Oxidation zu Carvon metabolisiert werden (Van der Werf et al. 2000). Ein weiterer Organismus, der in der Lage ist, auf Monoterpenen (Limonen) als Kohlenstoffquelle zu wachsen, ist *Rhodococcus erythropolis* (DCL 14). Es konnte ein 6 kb großes *PstI*-Fragment kloniert werden, das 68% Homologie zu einer Acetyl-Coenzym A (Co A) Dehydrogenase besaß. Diese Enzyme sind an der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren beteiligt. Als weiteres Enzym konnte eine Monoterpen- $\epsilon$ -lacton-Hydrolase von

---

*Rhodococcus erythropolis* charakterisiert werden. Sie katalysiert die Ringöffnung von Lactonen, die während der Degradation einiger monozyklischer Monoterpenoide gebildet werden z.B. Carvon und Menthol (Van der Vlugt-Bergmans et al. 2001).

Tab. 3-5 Biodegradation von Limonen

Organismus	Literatur	Produkte	postuliertes bzw. charakterisiertes Enzym
<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	Chang et al. 1994	Perillaalkohol, $\alpha$ -Terpineol, Perillaaldehyd	Limonen-Hydroxylase, Hydroxylierung in Position 6 oder 7
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14	Van der Werf et al. 1999 Barbirato et al. 1998	Limonen-1,2-epoxid, Limonen-1,2-diol	-
<i>Pseudomonas putida</i> GS1	Mars et al. 2001 Speelmans et al. 1998	Perillasäure	Cymen-Mono-Oxygenase
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> IM88	Teunissen et al. 1995	Terpinen-4-ol Carveol/Carvon $\alpha$ -Terpineol Perillaalkohol	Limonenlyase

Interessanterweise wurde das Hydroxylierungsprodukt *trans-iso*-Piperitenol aus Limonen bei Bakterienstämmen nicht gebildet. Erst bei Eukaryonten wie z.B. der Hefe *Hormonema* UOFS Y-0067 wurde diese physiologische Fähigkeit beobachtet (Van Dyk et al. 1998, Van Rensburg et al. 1997).

### 3.2.3.1 Terpensupplementierung von komplexen Gemischen

Für die citrusverarbeitende Industrie sind die mengenmäßig dominierenden Nebenproduktgemische von geringer Wertschöpfung. Bislang besteht die Nutzung der Monoterpenkohlenwasserstoffgemische überwiegend im Einsatz in der Lack und Farbindustrie, an die diese veräußert werden. Es ist jedoch zunehmend schwierig, die anfallende jährliche Gesamtmenge von 500 t an Limonen in diese Verwertungswege mit geringer Wertschöpfung einzubringen. Es kommt schon heute vor, dass einige Fraktionen, deren weitere Aufreinigung zu kostenintensiv erscheint, als Sonderabfall zur Verbrennung gegeben werden. Einzelne Inhaltsstoffe, allen voran das mengenmäßig dominierende Limonen, sind zudem

von der EU als "wassergefährdend" eingestuft worden, und es bleibt abzuwarten, wie sich dies auf die bisherigen Verwertungsmöglichkeiten auswirken wird.

Bei derartigen Produktgemischen ist die Anreicherung der Terpenoide für die Organismen toxischer als die reinen Terpenkohlenwasserstoffe (Precursoren). In diesem Zusammenhang wurde durch Messung der CO<sub>2</sub>-Freisetzung von *Penicillium digitatum* (ATCC 201169) die Konzentration ermittelt, die eine 50%ige Wachstumsinhibierung zur Folge hatte. Die geringste Wachstumshemmung ging von Citral und 6-Methyl-5-hepten-2-on aus, diese Verbindungen waren weniger toxisch als Geraniol, Nerol und Acetaldehyd (1,4 bis 1,8 mM). Die Applikation von 6-Methyl-5-hepten-2-on führte zu einer Wachstumsinhibierung von 27% bei der Mycelkultur (Wolken et al. 2002).

Eine derartige Wachstumshemmung konnte in dieser Arbeit für den Organismus *Penicillium citrinum* bestätigt werden, während sie für *Penicillium solitum* nicht beobachtet werden konnte. Das während der Kultivierung von *Penicillium solitum* akkumulierte Produkt 6-Methyl-5-hepten-2-on gilt als typisches Transformationsprodukt aus Geraniol, Nerol und Citronellol von *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* und *Botrytis cinerea* (Demyttenaere et al. 1996 und 1998). Die Herkunft der Transformationsprodukte von Menthon und Menthol konnte nicht eindeutig geklärt werden. Vermutlich handelt es sich dabei um Folgeprodukte aus Citronellol, einem Transformationsprodukt des Geranylacetats. Bekannt ist, dass ein Pseudomonadenstamm in der Lage ist, aus Citronellal als Vorstufe Menthol zu synthetisieren:

So metabolisiert *Pseudomonas aeruginosa* Citronellal zu 3,7-Dimethyl-6-octensäure (65%), Citronellol (0,6%), Dihydrocitronellol (0,6%), 3,7-Dimethyl-1,7-octandiol (1,7%) und Menthol (0,75%) (Demyttenaere 2001, Joglekar et al. 1969). Desweiteren wurde die Bildung von Menthol aus Citronellal, Pulegol oder Isopulegol für *Penicillium digitatum* 1955 patentiert (Babicka et al. 1955).

Neben der Fähigkeit Reinstoffe zu biokonvertieren, war der Organismus (*Penicillium solitum*) in der Lage, limonendominierte Reststofffraktion (RSF) zu verwerten, wobei eine Akkumulation von interessanten Terpenoiden zu beobachten war. In dieser Arbeit wurden 10 RSF einer biotechnologischen Veredelung unterzogen, bei denen sensorisch ansprechende Produkte

---



entstanden. Somit bietet die Biotransformation eine innovative Verwertungsstrecke für schwerlösliche, toxische Terpenkohlenwasserstoffe begleitet von einer Terpenoidakkumulation im zweistelligen Milligrammbereich. Das Produkt ist ein biotechnologisch gewonnenes, etherisches Öl ohne pflanzliches Vorbild.

Den bisher einzigen Hinweis auf Biotransformationen mit terpenhaltigen Gemischen aus dem etherischen Öl von *Citrus sinensis*-Schalen-Öl wurde in der Literatur von Singh et al. 2002 gegeben. Es wurde eine partielle Oxidation und Hydroxylierung zu Alkoholen (ohne weitere Angaben) durch *Epicocum nigrum*, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Trichothesium roseum* und *Curvularia pattescens* erwähnt.

### 3.2.3.2 Teil-Zusammenfassung

- Offensichtlich handelt es sich bei dem Organismus *Penicillium solitum* um einen bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen, limonendegradierenden Pilz (Ascomyceten). Der Degradationsweg konnte mit den in diesem Abschnitt (3.2.3) zitierten Arbeiten nicht zur Deckung gebracht werden, da dieser Organismus (*Penicillium solitum*), mit Ausnahme der geringen Mengen Carveol und *iso*-Piperiton ( $<10 \text{ mg L}^{-1}$ ), keine Parallelitäten zu den Degradationswegen von *Bacillus stearothermophilus* BR388, *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *Pseudomonas putida* GS1 und *Pseudomonas alcaligenes* IM88 aufwies (Tab. 2-5).
  - Mit Hilfe der "Biodestillation" von komplexen limonendominierten RSF durch *Penicillium solitum* war es erstmals möglich, Abfallstoffe zu veredeln und den industriellen Produktionsstufen als ein neues, sensorisch ansprechendes Produkt wieder zu zuführen.
-

### 3.3 Transformation von $\beta$ -Myrcen

Das Monoterpen  $\beta$ -Myrcen ist in vielen etherischen Ölen enthalten, unter anderem ist es z.B. in Zitronengras, Hopfen und Verbena zu finden (King et al. 2003, Roth et al. 1996). Basidiomyceten co-metabolisieren  $\beta$ -Myrcen begleitet von der Bildung zahlreicher oxidierter Derivate (Busmann et al. 1994 a).

#### 3.3.1 Perillen als Naturstoff

Das formal vom  $\beta$ -Myrcen ableitbare Furanmonoterpen Perillen ist für die aromaproduzierende Industrie, vor allem für die Parfümerie, von größerer Bedeutung (Breitmeier 1999). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Perillen aktuell als Reinstoff kommerziell auf dem Markt nicht zu erhalten ist. Biotechnologisch erzeugtes Perillen wurde in der Literatur durch Busmann beschrieben (Busmann et al. 1994 a).

Perillen erhielt seinen Namen wegen des Vorkommens in *Perilla frutescens* (Brenner 1993). Sie ist in der japanischen Heilkunde von großer Wichtigkeit. In europäischen Ländern bekommt sie zunehmend Bedeutung bei der Bereitung von typisch japanischen Sushi Gerichten. Biotechnologisch erzeugtes Perillen könnte neue Vermarktungswege erschließen und Synergieeffekte eröffnen, da eine Isolierung aus der natürlichen Quelle im allgemeinen sehr kostenintensiv und aufwendig ist, und diese natürlichen Ressourcen saisonalen Schwankungen unterzogen sind (Barma et al. 2002, Ito et al. 1999 a, Ito et al. 1999 b, Pan et al. 1992). Tatsächlich wurde bisher kein kostentragendes, natürliches Verfahren zur Perillengewinnung etabliert.

Eine weitere Quelle für Perillen stellt Rosenöl dar, aus dem es durch Extraktion gewonnen wird. Da dieses Öl jedoch zu den teuersten etherischen Ölen gehört, erweist sich auch dieses Verfahren als äußerst kostenintensiv.

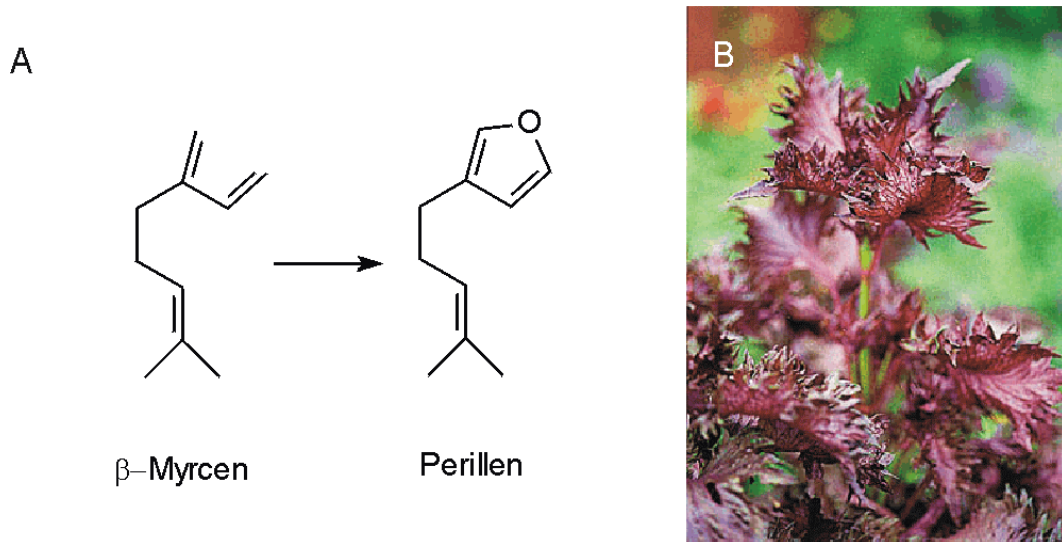


Abb. 3-4 **A** Postulierte Perillenbildung unter Cyclisierung des Monoterpens  $\beta$ -Myrcen  
**B** *Perilla frutescens* (L.) Britt. Var.

Perillen ist neben Rosenfuran,  $\beta$ -Damasconen,  $\beta$ -Damascon und Rosenketon eine charakterbildene Note in Rosenölen. Dem  $\beta$ -Damascon und Rosenketon wird ein narkotisch-würziger Geruch nach exotischen Blüten zugesprochen (Breitmeier 1999). Außer in Rosenölen wurde Perillen in zahlreichen weiteren etherischen Ölen gefunden, wie z.B. bei *Ficus*, bei Kardamom und einigen Artemisiaarten (Hu et al. 1985, Pieribattesti et al. 1988, Pige et al. 2002). Ito et al. (1999 c) konnte im etherischen Öl von *Perilla setoyensis* neben  $\beta$ -Myrcen, Limonen, Damasconen, Linalool auch Shisofuran, Neral, Geranial und Perillen identifizieren.

Die Verbindungen  $\alpha$ -Acaridial, Perillen und Rosenfuran sind als wichtige Monoterpene bei der Pheromonbildung von Milben (*Acaridae*) bekannt (Dusbábek et al. 1998, 1991). Ebenso kommt Perillen in den Mandibulardrüsen von *Alloxysta pleuralis* (Bernardi et al. 1967), *Lasius fuliginosus* (Longhurst et al. 1979) und *Tetramorium* (Hübner et al. 2002) als Pheromon vor.

### 3.3.2 Biotransformation mit dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus*

In einem ökologischen Ansatz widmet sich Reddy et al. 2000 der Verwertung von Bananenpflanzen durch *Pleurotus sajor-caju*. Dieser Organismus ist als effektiver Cellulose- und Lignindegradierer bekannt. Als Speisepilz steht *Pleurotus ostreatus* in der Beliebtheit gleich neben *Agaricus bisporus*, dem Champignon. In der Natur sind 39 Spezies der Gattung *Pleurotus* bekannt (Reddy et al. 2000). Neun konnten auf lignocellulosehaltigen Substraten in Kultur genommen werden. In der Biotransformation von Terpenen ist der Basidiomycet *Pleurotus ostreatus* nur

selten beschrieben. *Pleurotus ostreatus* wird weltweit auf ligninhaltigen Substraten kultiviert. Dies macht ihn zu einem Organismus mit Modellcharakter für das biochemische Verständnis des Ligninabbaus (Kofujita et al. 1991). Erst seit Kurzem gilt ihm größere Aufmerksamkeit für Anwendungen wie Bleichungsprozesse, Bodensanierung und zur Katalyse von chemisch schwierigen Konversionen (Vyas et al. 1994, Bezalel et al. 1996 und 1997, Sivrikaya et al. 2002).

Wichtig bei der Wahl der Organismen waren auch die lebensmitteltechnologischen Eigenschaften des Pilzes. Da es sich bei *Pleurotus ostreatus* um einen beliebten Speisepilz, den Austernseitling, handelt, können bei seiner Verwendung lebensmitteltechnologische Bedenken in Hinblick auf potentielle Mycotoxine ausgeräumt werden.

Über die enzymatischen Schritte bei der biotechnologischen Produktion von Perillen ist in der Literatur wenig bekannt (Busmann et al. 1994 a). Allerdings beschäftigt sich eine Arbeitsgruppe in Japan (Yuba et al. 1995) mit molekularbiologischen und physiologischen Studien an der Perillen synthetisierenden Pflanze *Perilla frutescens*. Da *Perilla frutescens* als Nahrungsmittel, Naturdroge, Pigment und Gewürz verwendet wird, gilt ihr besondere Aufmerksamkeit. Die Pflanze produziert verschiedene Typen von Furanoidmonoterpenen wie zum Beispiel Naginataketon und Elsholtziaketon (Başer et al. 2003) (Abb. 3-5).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in dem etherischen Öl bei der namensgebenden Pflanze *Elsholtzia fruticosa* bis zu 20,5% Perillen quantifiziert werden konnte (Thappa et al. 1999). Es handelt sich bei dieser Pflanze um eine sehr wertvolle Naturdroge, die hauptsächlich im asiatischen Raum, ebenso wie *Perilla frutescens*, Anwendung findet. Diese Pflanze (*Elsholtzia fruticosa*) hat mit weiteren 11 Arten ihren natürlichen Lebensraum am Fuße des Himalayas.

Postuliert wird, dass von der Mevalonsäure ausgehend Geranial und nachfolgend unter Bildung eines Furanrings Perillen synthetisiert wird. Die an dieser Katalyse beteiligten Proteine werden von den Genen Fr1 und Fr2 kodiert. Einige der Gene, die mit der Terpenbiosynthese zusammenhängen, sind sequenziert worden (Tab. 3-6). Neben den molekularbiologischen Arbeiten wurden die physiologischen Daten anhand des Aromaprofils überprüft (Yuba et al. 1995).

---

Tab. 3-6: Molekularbiologische Arbeiten zur Perillenbildung (Yuba et al. 1996, EMBL Nukleotid Sequence Database)

Spezies	Enzym	Sequenz
<i>Perilla citriodora</i>	Limonensynthase mRNA	komplett 2020bp
<i>Perilla frutescens</i>	Stamm 5598 Limonensynthase Gen	komplett 4495bp
<i>Perilla frutescens</i>	Terpensynthase mRNA	komplett 1978bp
<i>Perilla frutescens</i>	Stamm 9 Limonensynthase Gen	partiell 1025bp
<i>Perilla frutescens</i>	DNA für 1-Limonensynthase	komplett 5356bp
<i>Perilla frutescens</i>	mRNA für Limonencyclase	komplett 2008bp

Ausgehend vom Perillen lassen sich auch zwei weitere sensorisch interessante Komponenten des etherischen Öls von *Perilla* erklären, nämlich Egomaketon und Perillaketon (Abb. 3-5).

Anhand von molekularbiologisch überwachten Kreuzungsexperimenten bei *Perilla frutescens* B (*Lamiaceae*) wurde ein Biosyntheseweg für Perillen postuliert. Dies ist der einzige in der Literatur beschriebene Hinweis auf die biologische Synthese von Perillen. Über den enzymatische Weg zur Bildung von Monoterpenfuranen wie Menthofuran und Perillen ist ansonsten wenig bekannt (Porter 1981).

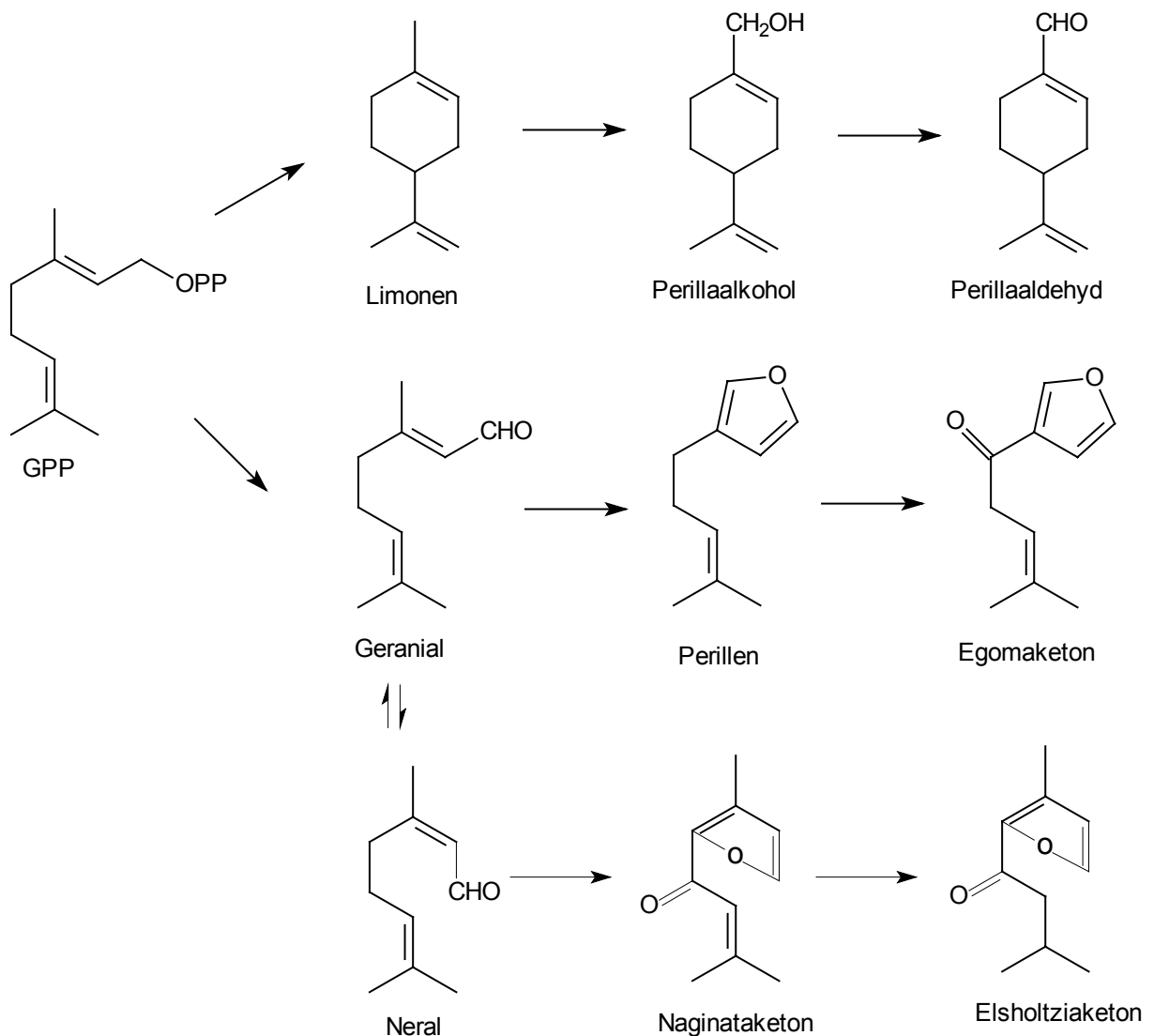


Abb. 3-5 Hypothetischer Biosyntheseweg für die Bestandteile des ätherischen Öls *Perilla frutescens* (verändert nach Yuba et al. 1995).

Nach Abspaltung des Pyrophosphat-Anions cyclisiert das gebildete Allyl-Kation zum Cyclohexyl-Kation. Dessen Deprotonierung ergibt (R)- oder (S)-Limonen. Anschließend wird die Methylgruppe in Position 7 zum Perillaalkohol hydroxyliert. Dieser Bildungsweg verläuft komplementär zur Perillaaldehydbildung von *Pleurotus ostreatus* bei Limonendosierung (Kaspera 2004). Eine Supplementierung mit der postulierten Vorstufe von Perillen (Citral, 29 mM) war für den Organismus *Pleurotus ostreatus* letal (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3 Biotransformationen mit $\beta$ -Myrcen

Breitmaier (1999) schreibt die Abstammung des Perillens formal dem  $\beta$ -Myrcen zu. Eine Arbeitsgruppe aus Italien charakterisierte einen *Pseudomonas* Stamm namens SpM1, der in der Lage war,  $\beta$ -Myrcen als C-Quelle zu nutzen. Es konnten 4 offene Leserahmen (*myrA*, *myrB* und *myrC*, *myrD*) mit der Biodegradation von  $\beta$ -Myrcen in Verbindung gebracht werden. Es sind wieder die Organismen der Gattung *Pseudomonas*, die in der Lage sind, Terpene vollständig zu mineralisieren, sie also als alleinige C- und somit Energiequelle zu nutzen. Diese Bioaktivität eröffnet bei der Verwendung von speziellen Mutanten oder bei der Klonierung der codierenden Gene eine Produktion von enantiomeren, reinen Metaboliten. Eine Blockierung der Dehydrogenasegene in einer Mutante N22 ließ ein  $\beta$ -Myrcenderivat, das (E)-2-methyl-6-methylen-2,7-octadien-1-ol akkumulieren. Als ein weiteres Produkt konnte 8-Myrcen-1-ol identifiziert werden (Iurescia et al. 1999).

In dieser Arbeit wurden 36 Organismen auf ihre Fähigkeit zur Biotransformation von  $\beta$ -Myrcen untersucht. 7 Organismen der Gattung *Pleurotus* zeigten biochemisches Potential zur Perillenbildung. Neben dem Zielprodukt Perillen konnten weitere Furanmonoterpenoide gefunden werden wie z.B.  $\alpha,\alpha$ -Acariolid (Abb. 3-6).

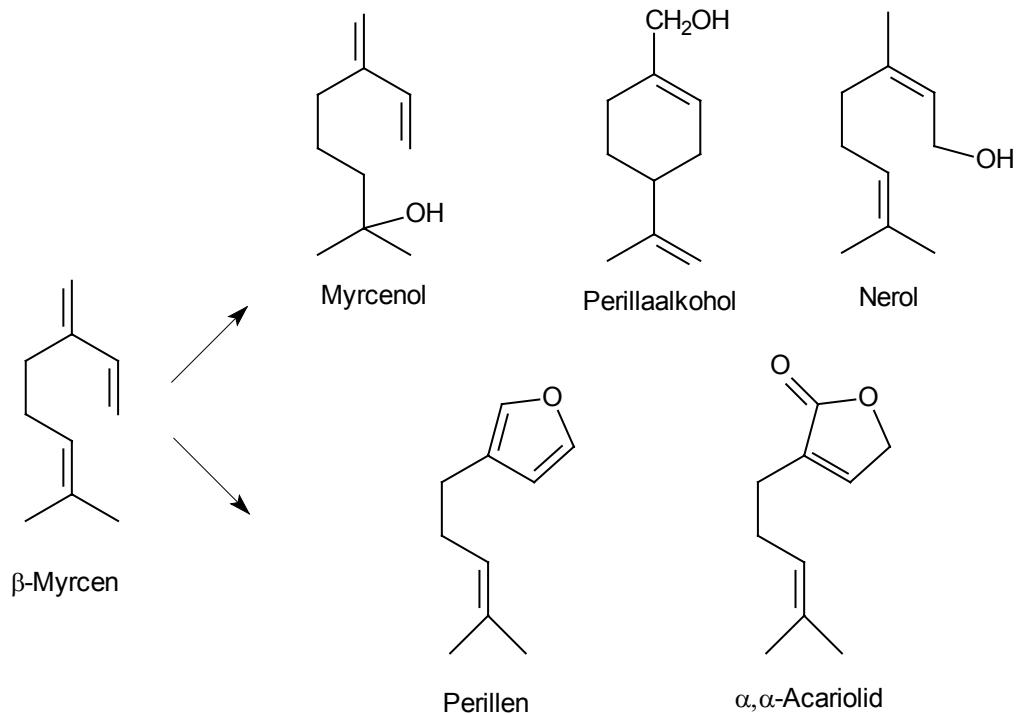


Abb. 3-6 Transformationsprodukte bei  $\beta$ -Myrcendosierung

Transformationsprodukte waren überwiegend korrespondierende Alkohole (Iurescia et al. 1999, Ishida et al. 1981 und 1977). Über den enzymatischen Mechanismus der Cyclisierung zum Furanmonoterpen sind keinerlei Daten verfügbar. Die Konzentrationen des auf biotechnologischem Wege erzeugten Perillens konnten trotz der geringen Konzentration ( $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) bei der Isolierung des natürlichen etherischen Öl aus Perilla nicht erreicht werden. Auch der sensorische Eindruck war hier im Gegensatz zum biotechnologisch erzeugten Perillen unterhalb des Schwellenwertes (GC-O).



### 3.4 Biotransformation mit dem Substrat $\gamma$ -Terpinen

p-Menthane, basierend auf dem 1-Methylisopropylcyclohexan Gerüst, gehören zur größten Familie von monocyclischen Monoterpenen. Nur sechs monocyclische Monoterpenkohlenwasserstoffe kommen in der Natur vor: Limonen, Terpinolen,  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen,  $\alpha$ -Phellandren und  $\beta$ -Phellandren (LaFever et al. 1993). In der Natur ist das Vorkommen ihrer oxygenierte Derivate zahlreich. Bevorzugt findet man in natürlichen Quellen p-Menthane, o-Menthane und m-Menthane sind sehr selten. Die Bildungswege sind in einigen Fällen bereits gut verstanden.

Eine lösliche Enzymfraktion von Salbeiblättern (*Salvia officinale*) war in der Lage Nerylpyrophosphat (NPP) zu einigen cyclischen Terpenen wie z.B. Limonen, Terpinolen,  $\alpha$ -Terpineol und 1,8-Cineol (Croteau et al. 1976 a) zu konvertieren. Eine Enzymfraktionierung und Aufreinigung ergab eine 1,8-Cineolsynthase, eine  $\alpha$ -Terpineolsynthase und eine Limonensynthase Aktivität (Croteau et al. 1994 und 1977 a).

Die aromatische Verbindung p-Cymen und ihre hydroxylierten Derivate sind im Pflanzenreich weit verbreitet und bilden eine wichtige Gruppe von p-Mentha-Monoterpenoiden. Alle p-Menthan-Monoterpene leiten sich theoretisch vom

1.  $\alpha$ -Terpenylkation oder vom
2. Terpinen-4-yl-Kation ab.

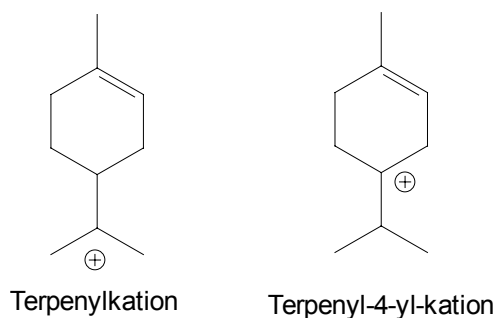


Abb. 3-7 Instabile theoretische Zwischenstufen bei der Biotransformation (verändert nach Ruzicka et al. 1953)

Über die Biotransformation von  $\gamma$ -Terpinen ist in der Literatur nur wenig bekannt. In Pflanzen allerdings bildet  $\gamma$ -Terpinen die Ausgangsverbindung für wichtige sekundäre Pflanzenstoffe wie z.B die Cymene.

### 3.4.1 Biokonversion von $\gamma$ -Terpinen bei Pflanzen

Monoterpenkohlenwasserstoffe sind bei Pflanzen zur Erhöhung der ökologischen Fitness verantwortlich wie z.B. bei

- der Resistenz gegen Mikroorganismen oder Insekten
- der Erhöhung der Attraktivität gegenüber Samenverteilern und
- der Verbesserung des Geruchs zur Anlockung von Bestäubern

Eine nichtenzymatische Autoxidation von  $\gamma$ -Terpinen ist kein ausreichendes Erklärungsmodell für die p-Cymen-Bildung. Vielmehr spielt  $\gamma$ -Terpinen eine Schlüsselrolle bei der Aromatisierung, während p-Cymen die zentrale Ausgangsverbindung der oxygenierten Derivate bildet.

Diese Aromatisierung wurde mittels markiertem  $^3\text{H}$ - $\gamma$ -Terpinen nachgewiesen (Poulouse et al. 1978 b). Das Schlüsselenzym, die  $\gamma$ -Terpinen-Synthase wurde aus Thymianblättern (*Thymus vulgaris*) isoliert. Dieses Enzym ist in der Lage,  $[1-^3\text{H}]$  GPP und  $[1-^3\text{H}]$  NPP mit fast gleicher Effizienz zu  $\gamma$ - $[3-^3\text{H}]$ -Terpinen zu konvertieren. Diese  $\gamma$ -Terpinensynthase hat ein Molekulargewicht von 96 000 Da, besitzt ein pH-Optimum von 6,8 und benötigt  $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktor zur katalytischen Aktivität (Porter 1981, Poulouse et al. 1978 a). Ausgehend von der Tritiummarkierung wurde dieser Biosyntheseweg postuliert (Abb. 3-8).

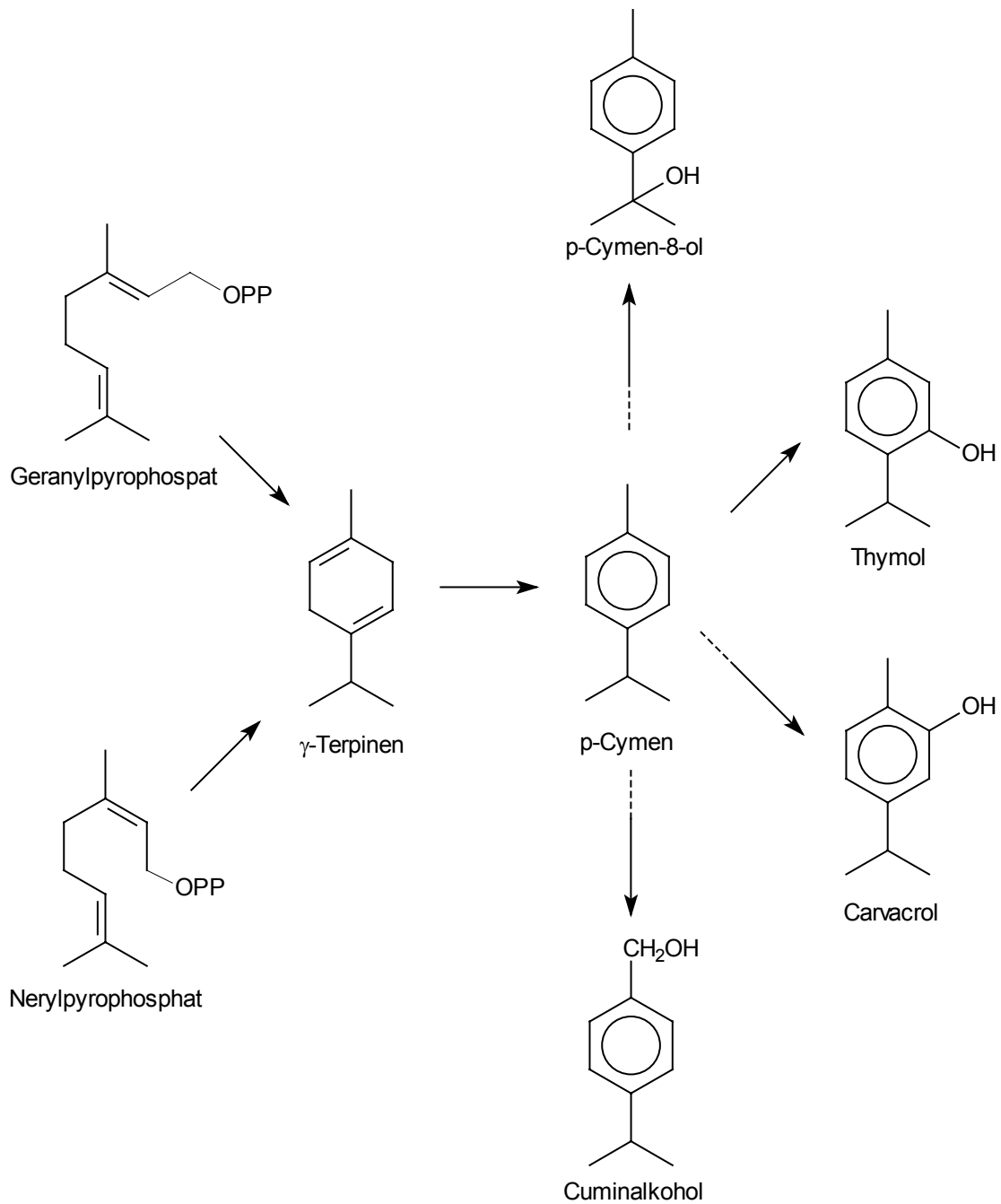


Abb. 3-8 Vorgeschlagener Syntheseweg für die Biosynthese von aromatischen Monoterpenen (gebrochener Pfeil postulierte Stufen, Pfeil *in vitro* und *in vivo*, nach Porter 1981)

### 3.4.2 Biokonversion von Cymen durch Mikroorganismen

Eine Biokonversion von p-Cymen mit Hilfe eines Bodenisolates (*Pseudomonas* PL-Stamm) wurde von Madhyastha et al. 1968 untersucht. Hier erfolgte eine Hydroxylierung an der Position 8 (Abb. 3-9).

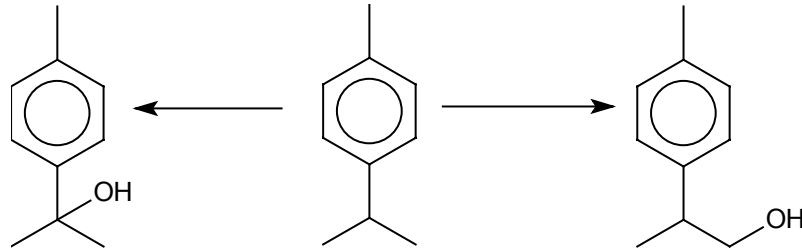


Abb. 3-9 Bildung von 2-p-Tolyl-propan-1-ol aus p-Cymen

### 3.4.3 Biokonversion von $\gamma$ -Terpinen durch Mikroorganismen

Über eine Biotransformation mit  $\gamma$ -Terpinen wurde wegen der geringen sensorischen Relevanz des *Precursors* und der hohen Cytotoxizität bisher nur wenig publiziert. Die sensorische Wahrnehmung des cyclischen Terpens ist wenig eindrucksvoll, es eignet sich für krautige Noten, allerdings überwiegt in höheren Konzentrationen ein an Kunststoff erinnernder Geruch. Im Screening wurden 35 Organismen auf ihre Fähigkeit  $\gamma$ -Terpinen zu transformieren untersucht. Davon zeigten vier Organismen Potential zur Transformation: *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Thelebolus caninus* und *Stemphylium botryosum*. Kieslich et al. (1986) verwiesen auf eine unpublizierte Forschungsarbeit von Stumpf et al. 1983. Überwiegend wurde neben der Hydroxylierung an Position 7, Hydroxylierungen an den Positionen 1 und 2 bevorzugt.

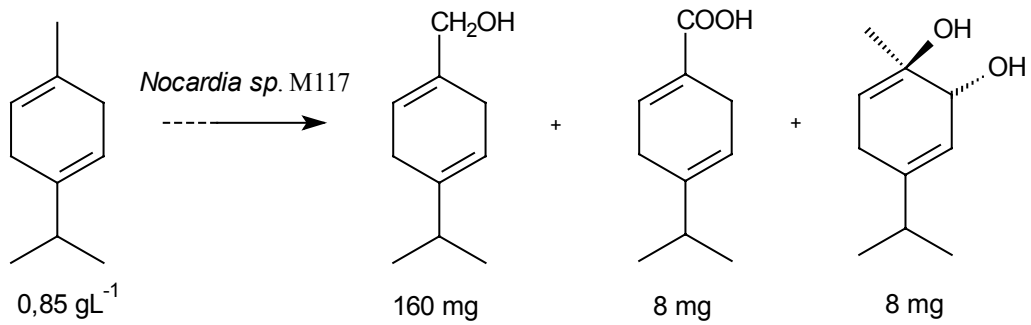


Abb. 3-10 *Nocardia* Stamm (Kieslich et al. 1986, Stumpf et al. 1983, Abraham et al. 1986)

Im Gegensatz zu diesen Daten hydroxylierte *Stemphylium botryosum* (Selbstisolat) bei der Biotransformation von  $\gamma$ -Terpinen die Position 9. Eine Hydroxilierung dieser Position ist in der Aromabiotechnologie selten (Abb. 3-11).

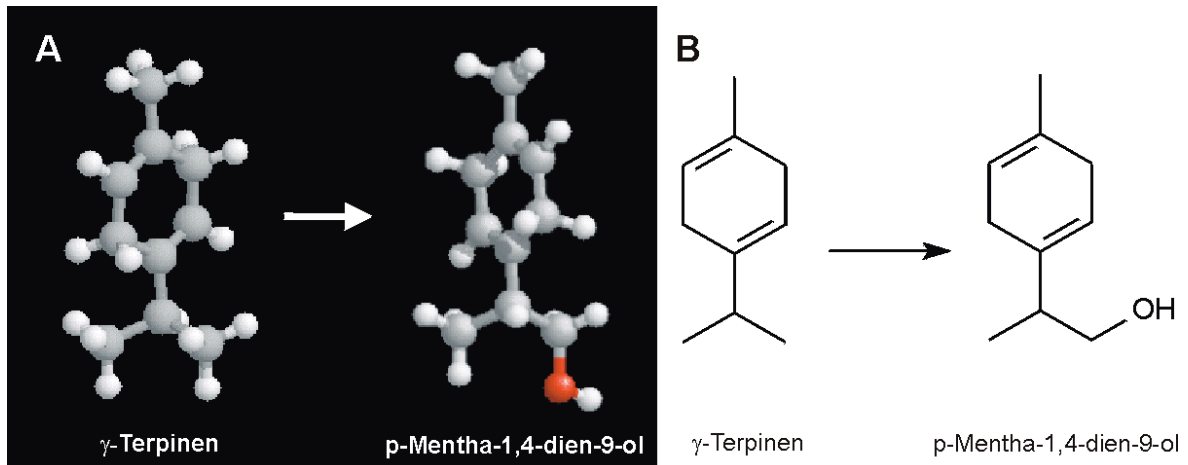


Abb. 3-11 Katalyse von  $\gamma$ -Terpinen zu p-Mentha-1,4-dien-9-ol durch *Stemphylium botryosum* (Eigenisolat)

Das Hauptprodukt und dessen Disproportionierungsprodukt konnten näher charakterisiert werden. Es konnten Molekulargewicht und Kovats-Indizes für polare und apolare Phasen bestimmt werden.

Tab. 3-7: Spezifizierung  $\gamma$ -Terpinen, p-Mentha-1,4-dien-9-ol sowie 2-p-Tolyl-propan-1-ol

	$\gamma$ -Terpinen (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	p-Mentha-1,4-dien-9-ol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	2-p-Tolyl-propan-1-ol (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O)
Log W <b>a</b>	-4,48	-1,99	-1,96
Log P <b>a</b>	4,43	2,548±0,25	2,166±0,200
RI CW	1212	1923	1962
RI	1024	1253	1216
KP [C°] <b>b</b>	182	230,2± 9°C	215,8± 8°C
Dampfdruck [Torr] <b>b</b>	1,08	0,0127 [25,0° C]	0,0851 [25,0° C]

**a** bestimmt durch [www.logp.com](http://www.logp.com)

**b** Sci-Finder Database

### 3.4.4 *Stemphylium botryosum* in der Biotransformation

Seit langem sind derartige phytopathogene Pilze in der Biotransformation von größerer Bedeutung. Man geht davon aus, dass sich durch die stete Coevolution zwischen Organismus und Substrat auch eine Anpassung auf enzymatischer Ebene vollzogen hat.

*Stemphylium botryosum* ist ein Phytopathogen für viele Pflanzen wie z.B. Spargel, Süßkartoffel, Salat, Tomaten und Alfalfa (Basu 1983, Barash et al. 1983, Heidel et al. 1984, Gindrat et al. 1984, Sinah et al. 1988). Ein vom Pilz synthetisiertes Polypeptid ist für Nekrosen und für die Ausprägung der Blattfleckenkrankheit verantwortlich (Focke et al. 1969, Pierre et al. 1965). Dieses aufgereinigte phytotoxische Polypeptid löste bei 24 von 26 Pflanzenfamilien die Blattfleckenkrankheit aus (Heiny et al. 1989).

Es handelt sich um den Erreger der Blattfleckenkrankheit, die bei einer Vielzahl von Pflanzen ausgelöst werden kann und somit ubiquitär vorkommt. Infektionen mit diesem Deuteromycet führten durch eine epidemiologische Ausbreitung zu erheblichen Ernteaufällen in Griechenland (Spargel) und Kalifornien (Alfalfa) (Borges et al. 1976, Broschius et al. 1988, Cowling 1980 und 1981, Heiny et al. 1989). Der Pilz bewirkt Zellläsionen, die bis zur Nekrose führen können. Als weitere Wirte fungieren Nachtschattengewächse wie Tomaten, aber auch Obstgehölze wie Äpfel und

Birnen. Zytologische und physiologische Arbeiten an *Stemphylium botryosum* wurden durch Carrol et al. (1973) und Zhdanova et al. (1985) beschrieben.

Von dem Organismus *Stemphylium botryosum* ist nur wenig in der Literatur bekannt. Zhdanova et al. (1985 und 1990) beschäftigten sich mit der Melaninbiosynthese und konnten so 4 Polyketide als Melaninprecursoren (Scytalon, Flaviolin, Biflaviolin und 2-Hydroxyjuglon) identifizieren. Morphologisch-zytologische Charakterisierungen mittels Immunfluoreszenz wurden durch Carroll (Carroll 1972 und 1973) beschrieben.

Saprophyten wie *Stemphylium botryosum* sind in der Lage, organisches Material als Parasiten oder Semiparasiten mit Hilfe von zellwanddegradierenden Enzymen zu zersetzen. Diese Enzyme sind dafür verantwortlich, dass diese Organismen auf den vielfältigsten Pflanzenmaterialien wachsen können (Coley et al. 1980). So wurde z.B. der Edelfäulepilz *Botrytis cinerea* auf ca. 235 Pflanzenarten identifiziert. *Stemphylium botryosum* wurde auch zur Biosynthese von cellulolytischen Enzymen herangezogen (Tashpulatov et al. 1973). Aufgrund dieser Tatsache ist *Stemphylium botryosum* in der Lage, auf verschieden behandelten lignin- und cellulosehaltigen Substraten wie Papier, Holz, Baumwolle und Flachs zu wachsen (Zagulyaeva 1965). In diesem Zusammenhang wurden celluloseabbauende Enzyme untersucht. Bei Befall reagiert die Pflanze mit der verstärkten Synthese von Endopolygalacturonasen, Endocellulasen und Pektinmethylesterasen in von *Stemphylium botryosum* infizierten Früchten (Geypens et al. 1973). Als weitere Biokonversion ist die Umwandlung von Phaseollin zu Phaseollinisoflavan in der Literatur beschrieben (Heath et al. 1973, Higgins et al. 1974).

*Stemphylium botryosum* ist nach dem momentanen Kenntnisstand in der Aromabiotechnologie unbekannt. Lediglich zwei Literaturhinweise aus den Jahren 1958 und 1974 zitieren Ergebnisse aus Kultivierungsversuchen mit *Stemphylium botryosum*. Es konnte die mikrobiologische Oxidation von Progesteron zu Monohydroxyprogesteron nachgewiesen werden (Nishikawa et al. 1958). Desweiteren wird eine Biokonversion von  $17\alpha$ -Hydroxydesoxycorticosteron zu  $14\alpha,17\alpha$ -Dihydroxydesoxycorticosteron zitiert. Interessanterweise ergeben sich Parallelitäten, hinsichtlich der Fähigkeit zur hydroxylieren von nicht aktivierten Kohlenstoffen, mit den ersten Arbeiten an *Rhizopus arrhizus* und der Oxofunktionalisierung von Progesteron (Abb. 3-16).

---

Biotransformationen mit ähnlichen phytopathogenen Organismen wie z.B. *Glomerella cingulata* und *Botrytis* Spezies eröffnen interessante Möglichkeiten zur Bildung von Terpenoiden (Miyazawa et al. 1995 und 1996, Aleu et al. 2001). Der physiologische Grund für diese Fähigkeit liegt in der Coevolution von Pflanze und Pilz. Auch bei dem Organismus *Stemphylium botryosum* hat eine stetige Anpassung des Pilzes an den Stoffwechsel höhere Pflanzen stattgefunden. Ein Beispiel dafür ist die Produktion des Phytotoxins Stemphol (Abb. 3-12).

Da die Keimung der Sporen *in vitro* erfolgreicher war als *in vivo*, postulierte Bashi (Bashi et al. 1977) einen Hemmstoff, der die Sporenkeimung *in vivo* hemmt. Die Bildung oder die Wirkung dieses Hemmstoffs wird durch Photosyntheseprodukte unterdrückt. Identifiziert wurde diese Verbindung als Stemphol, ein Phytopathogen, das das übermäßige Eigenwachstum des Pilzes hemmt (Marumo et al. 1985, Sakamura et al. 1987, 1988). Damit wird vermieden, dass die Wirtspflanze vom Saprophyt zu sehr geschwächt wird. Dies ist ein charakteristisches Beispiel für die Coevolution von Pflanze und Phytopathogen und verdeutlicht den engen Zusammenhang der Sekundärmetabolite von höheren Pflanzen mit dem Endophyten (Schulz et al. 2002).

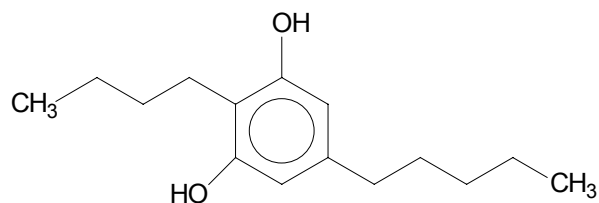


Abb. 3-12 Struktur von Stemphol

In Submerskulturen kommt Stemphol in einer Konzentration von 15,0 bis 98,4 mg kg<sup>-1</sup> vor. Allerdings konnten 95% des Stemphols mit dem Mycel abgetrennt werden (Solfrizzo et al. 1994). Solfrizzo berichtete über den Verlust der Stempholproduktion während der Stammhaltung. Eine Toxizität gegenüber tierischen bzw. Human-Zellen konnte bisher nicht erwiesen werden (Solfrizzo et al 1994).



### 3.5 Einführung einer Oxofunktion an einen nicht aktivierten Kohlenstoff

Methoden zur mikrobiologischen Einführung einer Oxofunktion an einen nicht aktivierten Kohlenstoff in organischen Verbindungen wurden unter anderem von Asakawa et al. 1991 beschrieben.

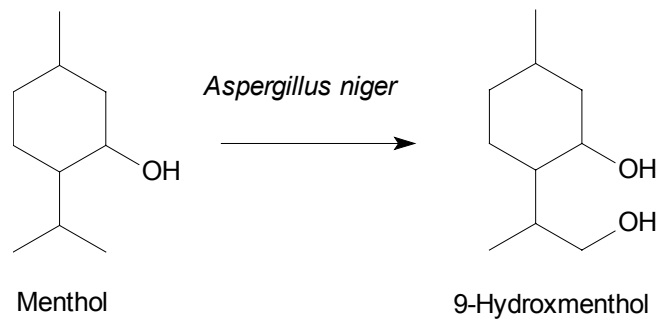


Abb. 3-13 9-Hydroxymenthol als Metabolit von Menthol produziert durch *Aspergillus niger* (Asakawa et al. 1991)

Analog dazu wurden auch Versuche mit dem Substrat Carvotanaceton durchgeführt (Abb. 3-14).

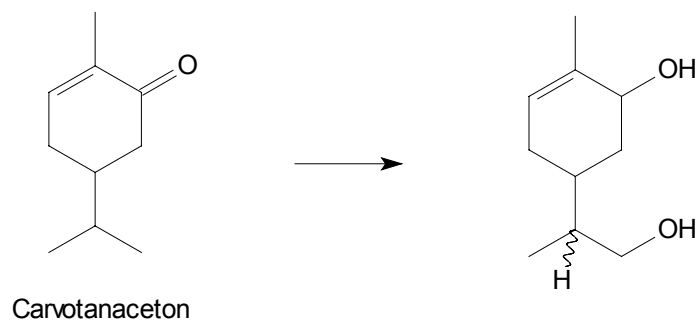


Abb. 3-14 Hydroxylierungsprodukt von Carvotanaceton bei Kultivierung mit *Aspergillus niger* (Asakawa et al. 1991)

Hydroxylierungen an nicht aktivierten C-Atomen werden selten beobachtet. Ein Beispiel ist die Transformationen der bicyclischen Monoterpenalkohole Fenchol und Borneol durch den Deuteromyceten *Diplodia gossypina* ATCC 10936 (Abraham et al. 1988). So ist dieser Organismus in der Lage Fenchol und Borneol spezifisch in 5-*exo* und 6-*exo*-Position zu hydroxylieren. Eine analoge Reaktion wurde mit Fenchon bei *Absidia orchidis* und Campher bei *Pseudomonas putida* CL beschrieben (Bradshaw 1959, Pfruder et al. 1969).

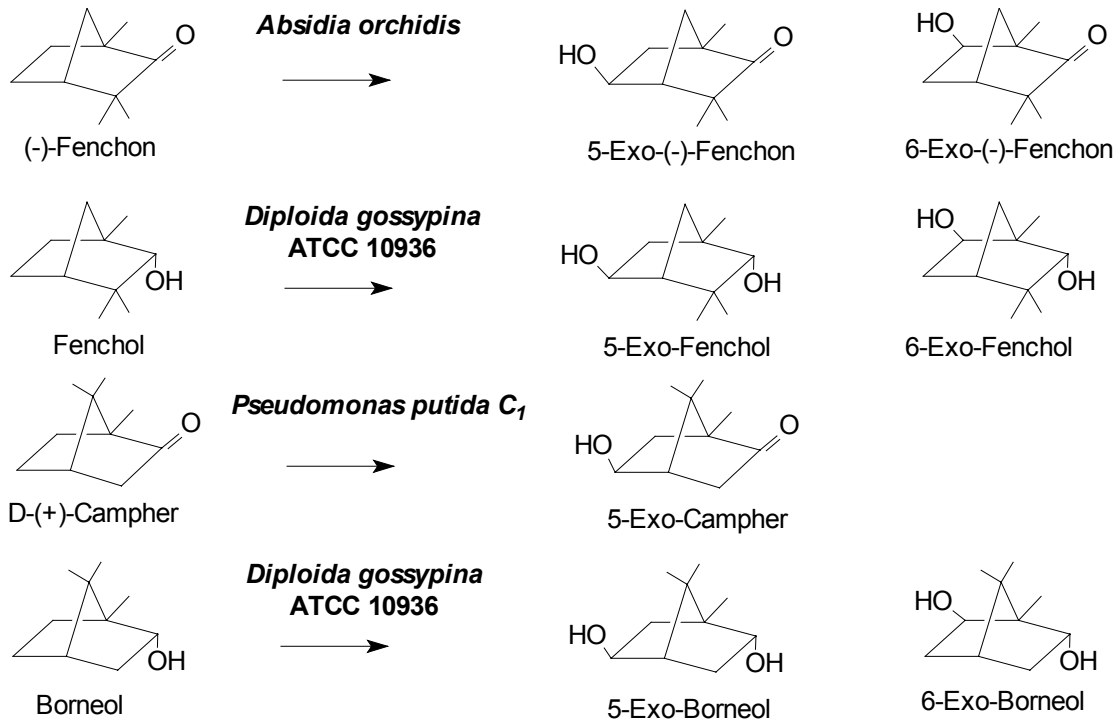


Abb. 3-15 Hydroxylierung von bicyclischen Monoterpenen von *Diploida gossypina* ATCC 10936 (nach Abraham 1988)

So konnten 10 Isomere von Hydroxycampher auf die Transformation mit *Diploida gossypina* zurückgeführt werden. Postuliert wird ein Enzym, das die Elektrophilie eines Wasserstoffabstraktors so moduliert, dass andere Substratpositionen nicht mehr reaktiv genug für einen potentiellen Angriff sind. Anders wäre die effiziente Hydroxylierung der nur gering reaktiven Position nicht möglich (White et al. 1983).

Hydroxylierung von nicht aktivierten Methylgruppen wurden erstmalig 1952 durch die Konversion von Progesteron zu 11- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron bei dem Organismus *Rhizopus arrhizus* beobachtet (Capek et al. 1966 a und b, Peterson et al. 1952, Streith et al. 1985, Lehmann et al. 2001).

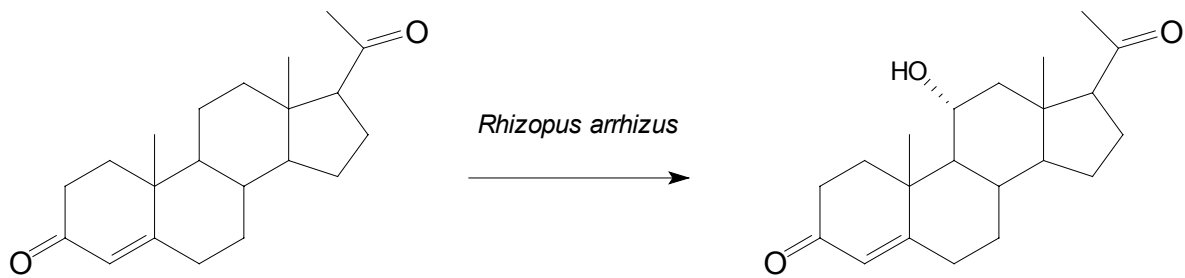


Abb. 3-16 Biohydroxylierung von Progesteron (nach Capek et al. 1966 und Peterson et al. 1952)

So konnten die bereits bekannten Ergebnisse der Hydroxylierung von Steroiden auf bicyclische Monoterpene übertragen werden. Eine Transformation mit reinen monocyclischen Monoterpenkohlenwasserstoffen wurde bisher in der Literatur selten beschrieben (Lehman et al. 2001). Die enzymatische Hydroxylierungsaktivität wird zumeist mit  $P_{450}$ -Enzymen (Monooxygenasen) in Verbindung gebracht. So konnte die Hydroxylierung von Campher mit Cytochrom  $P_{450}$ -Isoenzymen nachgewiesen werden (White et al. 1984). Die ubiquitär vorkommenden Enzyme der Cytochrom  $P_{450}$ -Familie fügen Hydroxylgruppen in organische Verbindungen ein. Dies kann durch Erhöhung der Löslichkeit der verbesserten Verfügbarkeit als C-Quelle bei Mikroorganismen dienen. Bei Säugern findet diese Katalyse bei der Detoxifizierung von Xenobiotika oder der Biogenese von Steroiden statt (White et al. 1986)

Ein weiteres Enzym, das mit einer terminalen Oxidation korreliert wird, ist die Chlorperoxidase (Hu et al. 1998). So katalysierte eine Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* die Oxidation von 2-Alkinen zu Aldehyden in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Diese Oxidation der unfunctionalisierten Alkine zu Aldehyden verläuft über ein Alkoholintermediat (Hu et al. 1998).

Eine weitere terminale Oxidation wurde durch Miller et al. 1995 beschrieben. Hier katalysierte die gleiche Chlorperoxidase die Oxidation von p-Methylanisol zu 4-Methoxybenzylalkohol.

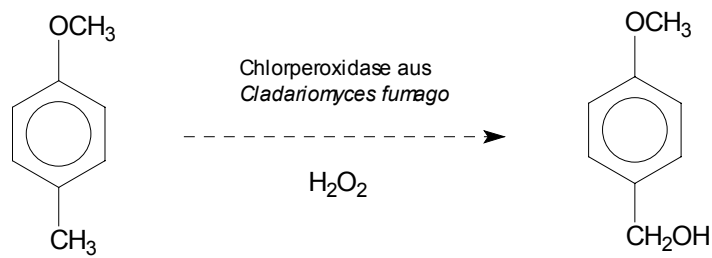


Abb. 3-17 Chlorperoxidase-katalysierte benzyliche Hydroxylierung (Miller et al. 1995)

Studien mit schwerem H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub><sup>18</sup>O zeigten, dass der eingefügte Sauerstoff von p-Methylanisolderivaten aus dem Peroxid stammte.

Chlorperoxidasen, ähnlich wie die P<sub>450</sub> Enzyme, katalysieren benzyliche Hydroxylierungsreaktionen, besitzen allerdings eine geringere Substratspezifität (Miller et al. 1995, McCarthy et al. 1983). Ferner führen diese Enzyme, neben Halogenierungen, peroxidase- und katalaseähnliche Umsetzungen durch (Sundaramoorthy et al. 1995).

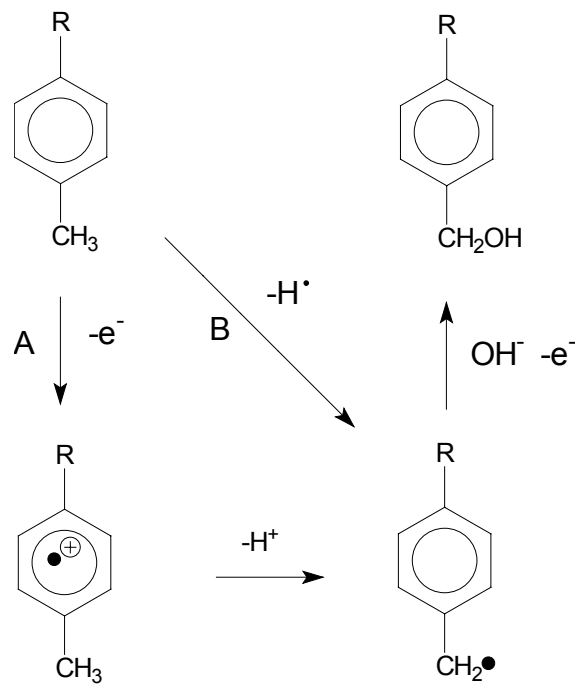


Abb. 3-18 Enzymreaktion mit einer Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago*  
**A** Elektronenabstraktion zum radikalischen Kation, Deprotonierung, Transfer der Hydroxylgruppe **B** direkte Abstraktion des Protons und Transfer der Hydroxylgruppe  
 (nach Miller et al. 1995)

Miller et al. (1995) postulierten einen Mechanismus, bei dem durch eine Elektronenabstraktion ein radikalisches Kation entsteht, das dann anschließend deprotoniert wird. Der Transfer der Hydroxylgruppe erfolgt auf das benzyliche Radikal direkt durch die Chloroperoxidase. Alternativ kann das benzyliche Radikal auch durch formelle Abstraktion eines Wasserstoffatoms entstehen, gefolgt vom Transfer der Hydroxylgruppe.

Inkubation mit schwerem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ ) zeigten auch hier eindeutig, dass die benzyliche Hydroxylierung mit der Addition des Sauerstoffs aus dem Peroxid einhergeht. Ferner konnte durch vergleichende Experimente mit schwerem Wasser ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) die Beteiligung des Sauerstoffs aus dem Wasser ausgeschlossen werden. Diese Reaktion scheint ähnlich wie die der Ligninperoxidasen durch die Kombination eines Kohlenstoffradikals mit molekularem Sauerstoff zu erfolgen (Miller et al. 1995).

### 3.5.1 p-Mentha-1,4-dien-9-ol als neuer Naturstoff

Die Verbindung p-Mentha-1,4-dien-9-ol wurde erstmals von Camps et al. 1968 synthetisiert. Als Naturstoff ist diese Verbindung unbekannt.

Die bei der  $\gamma$ -Terpinen-Transformation positiv gescreenten Organismen *Chaetomium globosum* und *Stemphylium botryosum* sind als Organismen bekannt, die in der Lage sind, Steroide des 11-Desoxypregnan-Typs zu modifizieren. Es erfolgte eine selektive Hydroxylierung in Position 11. Hier wurde 1 g Progesteron von den Organismen in 150 bzw. 320 mg L<sup>-1</sup> 11- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron biokonvertiert (Hasegawa et al. 1958 und 1959, Nishikawa et al. 1958). Der Organismus *Thelebolus caninus* wurde als Biokatalysator für die Transformation von Sclareol beschrieben (Abb. 3-19) (Veddeler 2003).

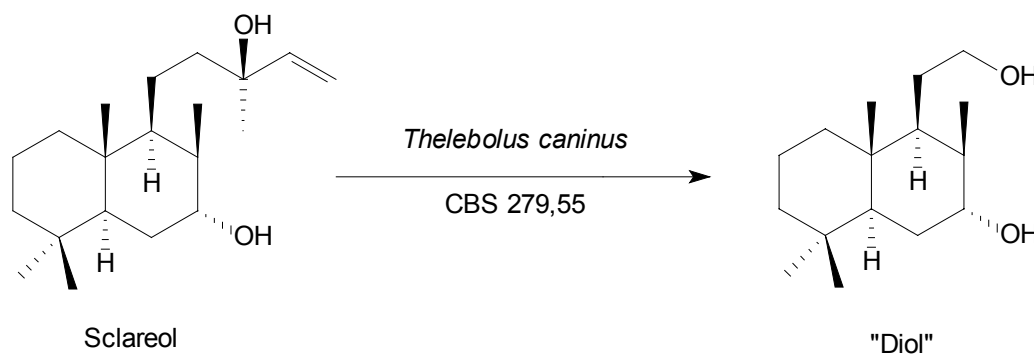


Abb. 3-19 Biotechnologische Gewinnung von Intermediaten zur Synthese von Ambox (Veddeler 2003)

#### 3.5.1.1 Die Disproportionierung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

Bereits während der Aufreinigung von p-Mentha-1,4-dien-9-ol wurde eine vermeintliche Instabilität des Naturstoffs beobachtet. Wurde der Extrakt auch nur kurze Zeit der Raumtemperatur ausgesetzt, war die zuerst reine Verbindung mit dem Aromaten 2-p-Tolyl-propan-1-ol "kontaminiert". In geringen Mengen konnte auch p-Menthen-9-ol gefunden werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Disproportionierung. Die folgende Abbildung zeigt vier potentielle Disproportionierungsprodukte, die aus p-Mentha-1,4-dien-9-ol entstehen können.

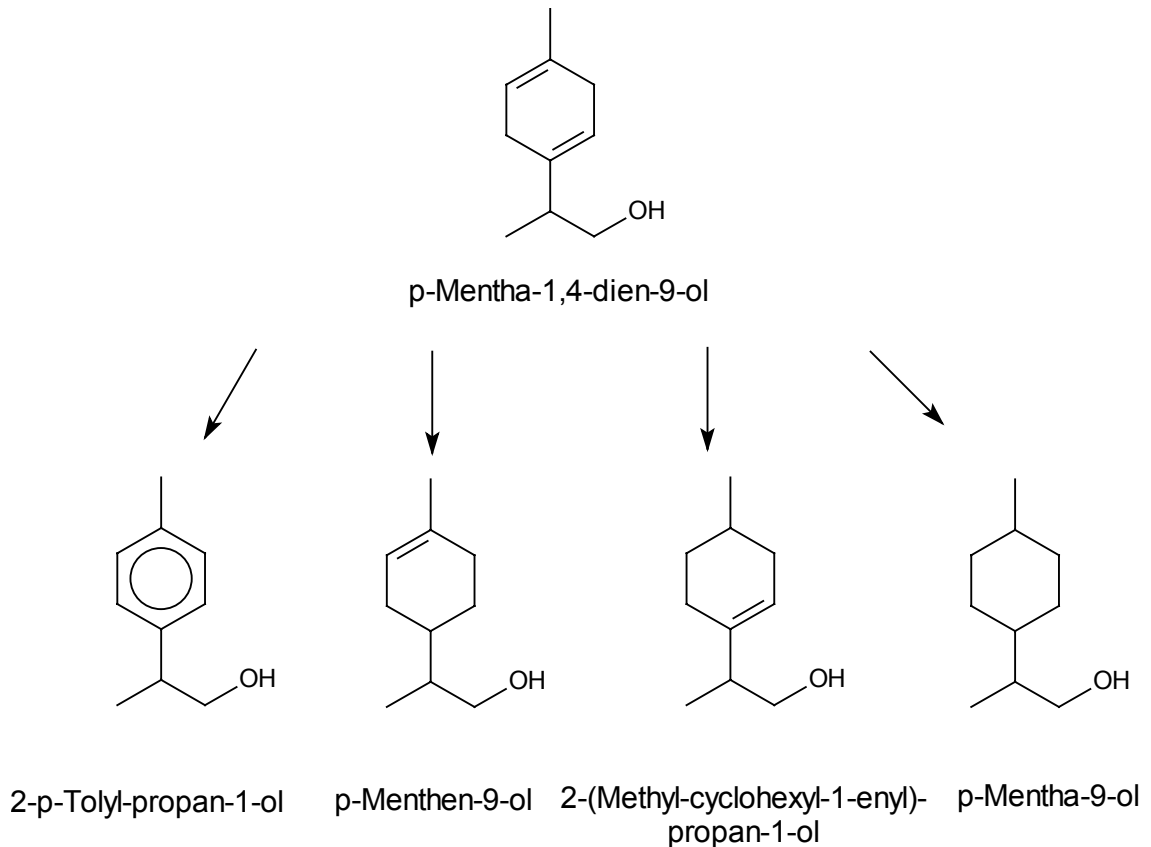


Abb. 3-20 Mögliche Disproportionierungsprodukte von p-Mentha-1,4-dien-9-ol

2-p-Tolyl-propan-1-ol konnte in allen Experimente wiedergefunden werden. Das Reduktionsprodukt p-Menthen-9-ol wurde nur in Spuren wiedergefunden (Abb. 3-20). Eine ähnliche Reaktion wurde bei der Aromatisierung von 8-Hydroxymenthen zu 8-Hydroxycymen beschrieben (Newman 1991). Katalysiert wurde diese Reaktion durch Co, Ni und Fe.

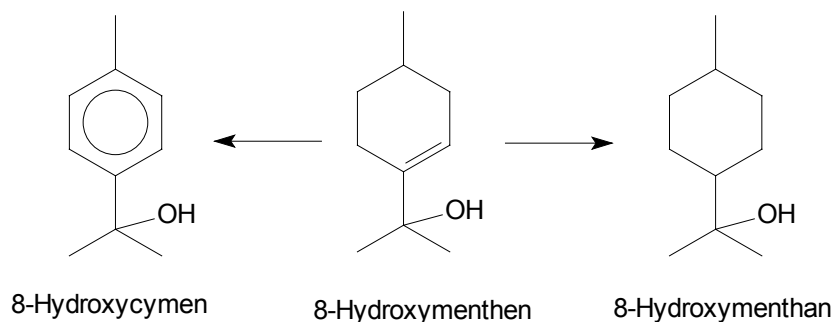


Abb. 3-21 Konversion von 8-Hydroxymenthen in 8-Hydroxycymen und 8-Hydroxmenthan (verändert nach Newmann 1991) unter Metallkatalyse

### 3.5.2 p-Mentha-1,4-dien-9-ol in Lebensmitteln

Um diesen neuen Naturstoff als natürlichen Aromastoff deklarieren zu können, müsste dieser aus wenigstens einem Lebensmittel isoliert werden (pers. Mitteilung

Prof. Berger). Aus diesem Grund wurden zahlreiche Gewürze und kommerzielle etherische Öle, in denen  $\gamma$ -Terpinen und/oder 2-p-Tolyl-propan-1-ol bereits beschrieben wurden, analysiert. Da sich die Qualität der kommerziell erhältlichen etherischen Öle als ungenügend erwies, wurden aus zahlreichen Kräutern und Lebensmitteln etherische Öle isoliert.

### 3.5.2.1 Dill

Die Inhaltsstoffe von Dill sind in der Literatur gut beschrieben (Vera et al. 1998, Hassanzadeh et al. 2000).

Als häufigste Methode wird die Wasserdampfdestillation genannt. Es konnten bis zu 36 Verbindungen identifiziert werden. Jedoch machen  $\alpha$ -Phellandren (56,5%), Dill ether (20,8%), Limonen (10,9%), und Cymen (3,8%) 92% des etherischen Öles aus.

Die Ausgangsverbindung  $\gamma$ -Terpinen sowie die zum biotechnologisch erzeugten p-Mentha-1,4-dien-9-ol strukturverwandte Verbindung trans-Menth-1-en-9-ol konnten bereits identifiziert werden (Vera et al. 1998, Maarse et al. 1985). Aus den Extrakten aus Dill konnten drei strukturverwandte Verbindungen isoliert werden.

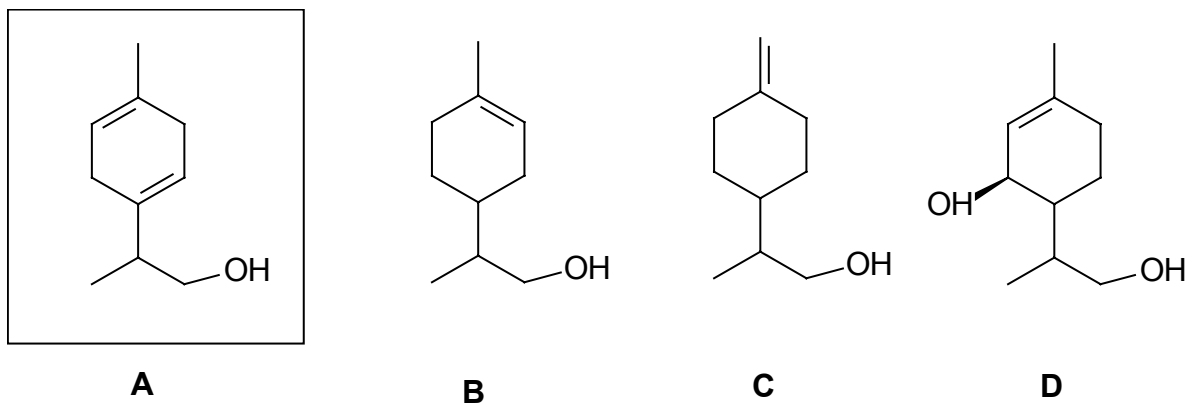


Abb. 3-22 **A** p-Mentha-1,4-dien-9-ol, **B** 2-β-4-Dimethyl-3-cyclohexen-1-ethanol (Schreier et al. 1981, Zaraiskaya et al. 1957), **C** p-Mentha-1(7)-en-9-ol (Reichert et al. 2000), und **D** β-4-Dimethyl-2-hydroxy-3-cyclohexen-1-ethanol (Reichert et al. 1999)

Die Biosynthese einer der Verbindungen, nämlich p-Menth-1-en-9-ol, konnte bei Dillpflanzen charakterisiert werden. Hierzu wurden  $^{13}\text{C}$  markierte Glycoside von Limonen und p-Menth-1-en-9-ol synthetisiert. Die Dillpflanzen waren in der Lage, die dosierten Menthenisomere in die korrespondierenden Dill ether Stereoisomere zu konvertieren (Reichert et al. 2000). Ferner konnte die Synthese von



p-Menth-1-en-9-ol durch die Hydratation von (R)-Limonen als erster Schritt der Biosynthese von Dillether aufgeklärt werden (Reichert et al.1999).

Beim Dilleextrakt konnten die potentiellen Disproportionierungsprodukte von 2-p-Tolyl-propan-1-ol und p-Menthen-9-ol gefunden werden, nicht aber die Verbindung p-Mentha-1,4-dien-9-ol selbst.

Um den Einfluss dieser autoxidativen Prozesse (Metallkatalyse) zu minimieren, wurden Messungen mittels Thermodesorption durchgeführt. Hier konnte eine Verbindung anhand der Retentionszeit mit dem Naturstoff p-Mentha-1,4-dien-9-ol korreliert werden. Eine eindeutige Identifizierung anhand von Massenspektren konnte wegen der Instabilität des Naturstoffes und der Konzentration im Spurenbereich nicht erfolgen.

### 3.5.2.2 Tequila

Da bei den Extrakten aus Dill zwar beide Disproportionierungsprodukte, nicht aber p-Mentha-1,4-dien-9-ol gefunden werden konnte, wurden Matrices untersucht, in denen 2-p-Tolyl-propan-1-ol bereits identifiziert wurde. Es konnten Aromaextrakte aus Tequila in angemessenen Konzentrationen hergestellt werden. Bei der Extraktion von Tequila (*Agava tequilana*) konnte auf die Chlorophyllfällung verzichtet werden.

Incitti et al. 1980 konnten 25 Aromastoffe, zumeist Alkohole, Ester und weitere 6 Verbindungen nachweisen. Bluhm (1983) wies nach, dass sich die Zusammensetzung der Hauptbestandteile mit dem Alterungsprozess veränderten. Die ausführlichste Aromaanalyse führten Benn et al. 1996 durch. Sie konnten über 175 sensorisch interessante Verbindungen mittels Aromaverdünnungsanalyse detektieren. Als Hauptaromastoffe konnten *iso*-Valeraldehyd, *iso*-Amylalkohol,  $\beta$ -Damascenon, 2-Phenylethanol und Vanillin identifiziert werden (Sachihiko et al. 1973). Bei  $\beta$ -Cyclocitral und  $\beta$ -Damascenon handelt es sich wahrscheinlich um Spaltprodukte der Carotinoide (Isoe et al. 1992, Langhoff 2003, Mordi et al. 1993, Näf et al. 1990).

Als Resultat der Fermentation konnten 20 Alkohole, 25 Acetale und Acetaldehyde, 10 Säuren und über 25 Terpenoide identifiziert werden. Es konnten Mono- und Sesquiterpenalkohole, Ester, Ether und ein Aldehyd identifiziert werden, allerdings keine Terpenkohlenwasserstoffe. Eine Rekonstitution des Tequilaaromas in Anlehnung an den natürlichen Extrakt war nicht von Erfolg gekrönt. Dies ließ erkennen, dass die maßgebenden

---

Schlüsselkomponenten chemisch noch nicht vollständig charakterisiert wurden (Benn et al.1996).

Allerdings zeigte sich bei dem Aromastoff p-Mentha-1,4-dien-9-ol aus Tequila ein Massenfragment von 135 m/z. Die sehr geringe Aromakonzentration in dem bereits fermentierten Lebensmittel Tequila und die Instabilität des Naturstoffes machten die eindeutige Identifizierung als natürlichen Aromastoff nicht möglich.

### 3.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten aufgezeigt, in denen, aus anfallenden RSF, die mit geringer Wertschöpfung veräußert werden oder sogar unter Kostenaufwand entsorgt werden müssen, wirtschaftlich interessante Produkte hergestellt werden können.

Durch die Biokatalyse mit den Organismen *Penicillium solitum*, *Stemphylium botryosum* und *Pleurotus ostreatus* wird ein neuer Weg zur Herstellung natürlicher Duft- und Aromastoffe eröffnet, der es erlaubt, die pflanzlichen Ressourcen weitaus effizienter zu nutzen, als dies bisher der Fall ist.

Für eine verfahrenstechnische Realisierung dieser Biotransformationen ist es notwendig, ausgehend von den biologischen und analytischen Basisdaten dieser Arbeit und den Vorgaben des Industrieunternehmens, den Bioprozess im Labormaßstab (1 L bis 3 L) sowie auch später im Technikumsmaßstab (40 L bis 100 L) zu etablieren.

Hauptaugenmerk sollte auf der Auswahl und Anpassung geeigneter *up-* und *downstream* Verfahrenseinheiten (Begasungssystem, *in situ*- Produktabtrennung, Substratdosierung) und *on line*- Monitoringsysteme (Bioaktivitäts-sensor, *on line*-Glucose, Abluftgase) sowie deren Zusammenführung zu einem integrierten Bioprozess liegen.

Ferner sollte begleitend zur Bioprozessentwicklung eine chromatographische oder destillative Feinreinigung der sensorisch interessanten Produkte industriell umsetzbar erprobt werden.

Zum weiteren Verständnis der Biotransformationsreaktion von  $\gamma$ -Terpinen zu p-Mentha-1,4-dien-9-ol durch *Stemphylium botryosum* wären die Enzymlokalisierung, die Isolierung und Charakterisierung, die Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum, auch in Hinblick auf eine potentielle Anwendung in der Biopharmakologie, hilfreich.

Die Deklaration des neuen Naturstoffs p-Mentha-1,4-dien-9-ol als natürlicher Aromastoff ist für die Industrie von großer Wichtigkeit. Eine Kopplung TDS-MS sollte die eindeutige, abschließende Identifizierung des Naturstoffes ermöglichen.

---

Auch andere Organismen wie *Botrytis cinerea*, *Thelebolus caninus* und *Chaetomium globosum* waren in der Lage,  $\gamma$ -Terpinen zu p-Mentha-1,4-dien-9-ol zu transformieren. In weiteren Projekten sollen die Produktbildungskinetiken dieser Organismen charakterisiert und optimiert werden. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang die Aufklärung der produktlimitierenden Intermediate sowie die Optimierung der Cofaktorkonzentration.

---

## 4 MATERIALIEN UND METHODEN

### 4.1 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche Mikroorganismen aus den angegebenen Kultursammlungen bezogen. Darüber hinaus wurden Organismen aus tropischen Früchten und terpenhaltigen Gewürzen isoliert (bezeichnet als Isolat).

#### 4.1.1 Kommerziell erhältliche Mikroorganismen

Die in Tabelle 4-1 angegebenen Kulturen wurden von folgenden Sammlungen bezogen: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, NL.

Tab. 4-1: Untersuchte Mikroorganismen; + Experiment erfolgt O kein Experiment

Organismus	Stamm-Nr.	$\alpha$ -Pinen	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen	Limonen
<i>Armillaria mellea</i>	CBS 100,12	+	O	+	O
<i>Aspergillus niger</i>	DSMZ 821	+	+	+	O
<i>Aspergillus niger</i>	DSMZ 737	+	+	+	O
<i>Botrytis cinerea</i>	DSMZ 877	+	+	+	O
<i>Chatomium globosum</i>	DSMZ 1962	+	+	+	O
<i>Clitocybe illudens</i>	DSMZ 73398	+	+	+	+
<i>Clitocybe lignatilis</i>	CLICB-1-2	+	+	+	O
<i>Cunninghamella echinulata</i>	CEC 1905	+	+	+	O
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS 250,61	O	O	+	+
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS 2359	O	O	O	+
<i>Lepista irina</i>	CBS 458,79	+	O	+	O
<i>Penicillium citrinum</i>	DSMZ 1179	+	+	+	+
<i>Penicillium italicum</i>	DSMZ 2755	O	O	O	+
<i>Penicillium solitum</i>	CBS 424,89	+	O	O	O
<i>Pleurotus eous</i>	DSMZ 5331	O	O	+	O
<i>Pleurotus eryngii</i>	DSMZ 323,49	O	O	+	O
<i>Pleurotus flabellatus</i>	CBS 66585	+	+	+	O

Tab. 4-1 Untersuchte Mikroorganismen; + Experiment erfolgt O kein Experiment (Fortsetzung)

Organismus	Stamm-Nr.	$\alpha$ -Pinen	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen	Limonen
<i>Pleurotus lampas</i>	CBS 323,48	+	+	+	O
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DSMZ 1020	+	O	+	+
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	DSMZ 5339	+	O	+	+
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266	+	+	+	O
<i>Rhodococcus sp.</i>	DSMZ 43287	+	O	O	+
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSMZ 43205	+	O	+	+
<i>Stemphylium botryosum</i>	DSMZ 62928	O	O	+	O
<i>Thelebolus caninus</i>	CBS 710,69	+	+	+	O
<i>Trametes suaveolens</i>	DSMZ 5237	+	+	+	O
<i>Trametes versicolor</i>	EIK 39	+	+	+	O
<i>Wolfiporia cocos</i>	CBS 279,55	+	+	+	O

#### 4.1.2 Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate)

Es wurden weitere Mikroorganismen aus Früchten und Gewürzen (Mandarine, Grapefruit, Ingwer, Walnuss, Pfeffer und Kiwi) isoliert. Hierbei wurden Abstriche aus oberflächlich verkeimten Pflanzenteilen auf Kulturplatten mit SNL-Medium bei 24 °C inkubiert. Entsprechende Stämme wurden durch Ausstrichverfahren vereinzelt und als Reinkultur herangezogen.

Tab. 4-2 Isolierte Mikroorganismen; + Experiment erfolgt O kein Experiment (Fortsetzung)

Organismus	Stamm-Nr.	$\alpha$ -Pinen	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen	Limonen
<i>Isolat aus Acerola</i>	FEA**	+	+	+	O
<i>Isolat aus Citrus 1</i>	LCI	+	O	O	+
<i>Isolat aus Citrus 2</i>	LCI	+	O	O	+
<i>Isolat aus Citrus 3</i>	LCI	+	O	O	+
<i>Isolat aus Citrus 4</i>	LCI	+	O	+	+
<i>Isolat aus Citrus 5</i>	LCI	+	+	+	+
<i>Isolat aus Citrus 6</i>	LCI	+	+	+	+
<i>Isolat aus Grapefrucht</i>	LCI	+	+	+	O
<i>Isolat aus Pfeffer</i>	LCI	+	+	+	O
<i>Isolat aus Ingwer</i>	LCI	+	+	+	O

Tab. 4-2 Isolierte Mikroorganismen; + Experiment erfolgt O kein Experiment (Fortsetzung)

Organismus	Stamm-Nr.	$\alpha$ -Pinen	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Myrcen	Limonen
<i>Isolat aus Kiwi</i>	LCI*	+	+	+	O
<i>Isolat aus Physalis</i>	LCI*	+	+	+	O
<i>Isolat aus Salbei</i>	LCI*	+	+	+	O
<i>Isolat aus Walnuss</i>	LCI*	+	+	+	O
<i>Isolat aus Zitrone</i>	LCI*	+	+	+	+

\* Isoliert am Institut für Lebensmittelchemie, \*\* isoliert an der Universität Campinas (FEA), Brasilien

## 4.2 Chemikalien

Tab. 4-3: Bestandteile der Kulturmedien

Substanz	Reinheit	Lieferant
Agar Agar	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
L-Asparagin-Monohydrat	99%	Merck KGaA
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	> 98%	Fluka
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	99%	J T Baker
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	-	Riedel-de Haën
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
Glycerol	> 98%	Carl Roth GmbH
HCl (37%)	Reinst	Riedel-de Haën
KCl	Reinst	Riedel-de Haën
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	f. d. Molekularbiologie	Merck KGaA
KOH	p.a.	Riedel-de Haën
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Chem. Rein DAB 7	Riedel-de Haën
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	purum p.a.	Fluka
SeO <sub>2</sub>	p.a.	Merck KGaA
Titriplex III	> 99%	Merck KGaA
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	puriss, p.a.	Merck KGaA

Tab. 4-4 Standardsubstanzen und Substrate

Verbindung	Reinheit	Lieferant
Artemisiaketon	purum > 97%	Fluka
(+)-Aromadendren	purum > 97%	Fluka
(-)-Borneol	puriss > 99%	Fluka
Campher	99%	Sigma
Cavacrol	purum > 97%	Fluka
(-)-Carveol	purum $\cong$ 97%	Fluka
Carvon	puriss >99%	H&R
Caryophyllenoxid	puriss >99%	Fluka
1,4-Cineol	puriss $\cong$ 99%	Fluka
Citral	purum $\cong$ 96%	Fluka
Citronellal	Tech. 80-90%	Fluka
Citronellol	95%	Fluka
Cuminaldehyd	techn $\cong$ 90%	Fluka
(+)-Dihydrocarveol	purum $\cong$ 97%	Fluka
Eucalyptol, 1-8-Cineol	purum > 99%	Fluka
(+)-Fenchol	puriss > 97,5%	Fluka
Fenchone	puriss $\cong$ 99,5%	Fluka
Geraniol	purum > 99%	Fluka
Geranylacetat	ca. 98%	Ziegler
Lavendulol	pract. 95%	Fluka
R(+)-Limonen	purum > 98%	Fluka
Linalool	purum $\cong$ 97%	Aldrich
Menthol	99%	Fluka
(-)-Menthon	puriss > 99%	Fluka
$\beta$ -Myrcen	pract. $\cong$ 97%	Fluka
(-)-Myrtenal	purum > 95%	Fluka
(-)-cis-Myrtenol	puriss > 99%	Fluka
Neomenthol	purum > 98,5%	Fluka
(-)-Perillaaldehyd	pract. $\cong$ 90%	Fluka
(+)-Perillaalkohol	puriss	Fluka



Tab. 4-4 Standardsubstanzen und Substrate (Fortsetzung)

Verbindung	Reinheit	Lieferant
2,3-Pinandiol	purum > 98%	Fluka
$\alpha$ -Pinen	purum > 97%	Fluka
$\beta$ -Pinen	purum > 99%	Fluka
(-)- <i>trans</i> -Pinocarveol	purum $\cong$ 98%	Fluka
Piperiton	-	Ziegler
(-)-Pulegon	purum > 99%	Fluka
(+)-Rosenoxid	puriss > 99%	Fluka
Safranal	-	(aus Safran) Sigma
(+)- $\alpha$ -Terpineol	puriss $\cong$ 99%	Fluka
$\gamma$ -Terpinen	purum	Fluka
$\gamma$ -Terpinen	purum	Ziegler
Thujon	-	Fluka
(+)- <i>cis</i> Verbenol	95%	Fluka
(-)-Verbenon	puriss > 99%	Fluka

Tab. 4-5 Sonstige Chemikalien

Substanz	Reinheit	Lieferant
Cremophor®	99%	Sigma
Qualilab Reinigungslösung	-	Merck KGaA
Qualilab Elektrolytlösung	-	Merck KGaA
Natriumhydroxid	98-105%	Merck KGaA
Natriumsulfat	98%	Grüssing
Quarzsand	-	J.T: Baker
Glasperlen (0,25-0,50 mm)	-	Carl Roth GmbH
Kieselgel 60	reinst	Merck KGaA
Kalibrier-Puffer	-	Riedel-de Haën
Natriumchlorid	99,5-100,5%t	Riedel-de Haën

Tab. 4-6 Pflanzenmaterial und etherische Öle

Quelle	Art	Bezugsquelle
Dill	<i>Anethum greveolens</i>	Fachgeschäft
Dillsamenöl (Bulgarien)	<i>Anethum greveolens</i>	CaeLo
Dillspitzen	<i>Anethum greveolens</i>	Einzelhandel
Eukalyptus	<i>Eukalyptus sp.</i>	Blumengroßhandel
Eukalyptusöl	<i>Eukalyptus globulus</i>	Aromaland
Kümmelöl (Polen)	<i>Carum cavi</i>	Aromaland
Lavendel	<i>Lavandula hybrida</i>	Fachgeschäft
Lavendelöl	<i>Lavandula hybrida</i>	Aromaland
Perillaöl	<i>Perilla frutescens</i>	Takasago
Perillapflanze	<i>Perilla frutescens</i>	Raritätenbörse
Rosmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Gärtnerei
Rosmarinöl	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Aromaland
Salbei	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Fachgeschäft
Salbeiöl	<i>Salvia lavandulifolia</i>	Aromaland
Teebaumöl (Australien)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	CaeLo
Tequila	<i>Agave tequilana</i>	Einzelhandel
Thymianöl	<i>Thymus serpyllum</i>	Aromaland

#### 4.2.1 Lösungsmittel

Es sind nur die häufig verwendeten Lösungsmittel genannt. Selten benutzte Lösungsmittel und Chemikalien werden bei der jeweiligen Anwendung spezifiziert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Gebrauch redestilliert und ebenso wie Fassware über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Die Redestillate wurden nach einer Reinheitskontrolle ihrer weiteren Verwendung zugeführt. Diethylether wurde vor Gebrauch frisch destilliert und lichtgeschützt mit KOH (Granulat) stabilisiert.

Tab. 4-7 Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Lieferant	Verwendung
Aceton	redest.	Hoechst	Reinigung
Diethylether	redest.	Kraemer & M	Extraktion, Säulenchromatographie
1,4-Dioxan	stab.	BASF	Chlorophyllfällung
Ethanol, unvergällt	redest.	Roth	Emulsionsbrechung
Methanol	redest.	Bayer	Enzyminhibierung
Pentan	redest.	BASF	Extraktion, Säulenchromatographie

#### 4.2.2 Gase

Die Luft für den Kompressor wurde durch Ansaugen über einen Staubfilter der Raumluft entnommen und nach der Kompression zur Trocknung durch eine 5 x 30 cm Silicagelsäule geleitet.

Tab. 4-8 Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendung
Druckluft	getrocknet	Kompressor	Detektorgas/Hilfsgas
Helium	5.0	Linde	Trägergas (GC/MS)
Stickstoff	5.0	Linde	Spülgas/Kulturbegasung
Wasserstoff	5.0	Linde	Trägergas/Detektorgas

#### 4.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert.

Tab. 4-9 Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
Autoklav	Varioklav 755	H&P
Brutschrank	UM 500	Memmert
Destillationskolonne	Vigreux	LAT
Gefrierschrank	PGT36	Bauknecht
Ice system	ACM 35 Scotsman	Frimont
Labotherm®+Multitherm®	S 27	Nabertherm
Laborbrenner	Gasprofi 2, WDL Tec	Wartewig
Lichtmikroskop	Will H-500	Hunt GmbH
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Schüttler	Infors HAT	Infors
Steril-Werkbank	Laminar-Flow 821/825	Clean-air
Superfreezer	VX350	Juan
Ultraschallbad	Sonorex 510 H	Bandelin
Ultra-Turrax	TP 18/10, 170 W	IKA
Umlaufkühler	FC 600 W	Julabo
Vortexer	Typ Reax I, 2400 U min <sup>-1</sup>	Heidolph
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus

## 4.4 Bioreaktor

Tab. 4-10 Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach

Kulturgefäß:	2,5 L
Sauerstoffelektrode:	Ingold, Nr. 322 756 701
pH-Elektrode:	Mettler Toledo Nr. 10 465-35 K9
Druckluft:	Membrankompressor (Druck 0,6 bar) sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Abluft:	PTFE-Membranfilter (s.o.) als Sterilbarriere
Standardbedingungen:	24 °C, 250 rpm
Belüftung:	Luftrohr (a.D. 8 mm), 0,4 L min <sup>-1</sup> ; 0,1 vvm bei 2,5 L Füllvolumen

## 4.5 Kultivierung von Transformationskulturen

### 4.5.1 Kulturmedien

Die Medienbestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 500 mL (400 mL Füllmenge) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (200 mL Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und 20 min bei 120 °C autoklaviert.

### 4.5.2 Kultivierungsbedingungen

Die Experimentalkultur wurde bei 150 rpm für (ca. 10 d) bei 25 °C inkubiert. SNL-Standardmedium (Sprecher und Hanssen, 1982)

30 g L<sup>-1</sup> Glucose-Monohydrat;

4,5 g L<sup>-1</sup> Asparagin-Monohydrat;

3,0 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt;

1,5 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>;

1,0 mL L<sup>-1</sup> Spurenelementlösung

### Spurenelementlösung

0,08 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O;

0,09 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O;

0,03 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O;

0,005 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O;

0,4 g L<sup>-1</sup> EDTA

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.

### 4.5.3 SNL-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem Medium zusätzlich 20 g L<sup>-1</sup> Agar vor dem Sterilisieren zugegeben.

## 4.6 Kulturführung

### 4.6.1 Stammkultivierung

Aus den von kommerziellen Anbietern gelieferten Stämmen wurden jeweils zwei Stammkulturen auf Agarplatten mit SNL-Agar als Medium angelegt. Hierbei wurde eine Agarplatte mit einem quadratischen Agarstück (ca. 1,0 x 1,0 cm<sup>2</sup>) beimpft und bei 24 °C im Brutschrank kultiviert (Taubert et al. 2000). Nach Bewachsen der Hälfte der Agarplatte wurde die Kultur bei 4°C gelagert. Die Stammkulturen wurden mindestens alle 2 Monate nach dem gleichen Verfahren erneuert.

### 4.6.2 Gefrierkulturen von Ascomyceten

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden die Sporen einer bewachsenen Agarplatte mit 9 mL SNL-Medium mit einem Zusatz von 20% (v/v) Glycerol abgeschlemmt und in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Aufbewahrung der Kulturen erfolgte bei -70 °C in 1 mL Aliquots.

### 4.6.3 Homogenisieren von Kulturen

Die Homogenisierung von Mycel aus Agarplatten oder flüssigem Kulturmedium erfolgte innerhalb des sterilen Kulturmediums mit einem vorab hitzesterilisierten

---

Ultra-Turrax Homogenisator für ca. 10 s bei niedrigster Drehgeschwindigkeit bis kurzzeitig Schaumbildung zu beobachten war.

#### 4.6.4 Vorkulturen

Von der auf Kulturplatten geführten Stammkultur wurden mycelbewachsene Agarstücke mit einem sterilisierten Spatel in einen mit 200 mL SNL-Standardmedium befüllten 500 mL Kolben überführt, homogenisiert und 24 Stunden im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

#### 4.6.5 Experimentalkulturen

Pro 400 mL SNL-Medium wurden 18 mL der Vorkultur nach Homogenisieren unter sterilen Bedingungen in das Transformationsmedium pipettiert. Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 400 mL SNL-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm für 24 Stunden.

#### 4.6.6 Kultivierung mit Monoterpenen

Die Substrate  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Myrcen und  $\gamma$ -Terpinen wurden nach 24 stündiger Anwuchszeit der Experimentalkultur (mit Ausnahme von Organismen der Gattung *Pleurotus*) direkt in den Kulturkolben dosiert. Die Dosierung der Terpene erfolgte bedarfsgerecht. Die Kultivierung fand bei 150 rpm und 24 °C statt.

#### 4.6.7 Kultivierung im Bioreaktor

Im Bioreaktorversuch mit *Penicillium solitum* (Selbstisolat) wurden 1,8 L SNL-Medium mit 200 mL einer homogenisierten Vorkultur inokuliert. Täglich wurde eine 150 mL-Probe entnommen, wobei nach Filtration aus 100 mL durch flüssig/flüssig Extraktion die Produktbildung bestimmt wurde. Der Filtrerrückstand wurde zur Trockenmassenbestimmung eingesetzt. Es erfolgte täglich eine Nachdosierung mit frischem Medium. Die Kultivierungstemperatur betrug 25 °C. Die Belüftung wurde auf 0,1 vvm geregelt. Die Abluft wurde auf 10 °C gekühlt. Die Adsorption der flüchtigen Verbindungen erfolgte auf 5 g Lewatit.

---

## 4.7 Dosierung von Transformationssubstraten

Für die Substratdosierung in Submerskultivierungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, 1000  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Terpensubstrates (Limonen,  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Myrcen,  $\gamma$ -Terpinen) nach einem Kulturalter von 24 Stunden direkt in die Submerskultur gegeben.

### 4.7.1 Blindwerte

Alle Blindwerte wurden analog zum entsprechenden Biotransformationsversuch durchgeführt, wobei zwischen chemischem und biologischem Blindwert unterschieden wurde. Der chemische Blindwert wurde nur mit Medium ohne Kultur durchgeführt, wobei entsprechendes Terpen zeitgleich zur Biotransformationskultur zugesetzt wurde. Der biologische Blindwert wurde ohne Substratdosierung, aber mit vitaler Kultur durchgeführt.

## 4.8 Analytik und Probenahmeverfahren

### 4.8.1 Probenahme bei Transformationsversuchen

Aus den jeweiligen Submerskultivierungen wurden am 1., 3., 5., 7., 9. und 11. Tag nach Umschwenken 9 mL Kulturüberstand entnommen. Dieser wurde mittels SPME analysiert.

### 4.8.2 Probenahme bei Optimierungsversuchen

Die Kultivierungen wurden zu den jeweils angegebenen Transformationstagen gestoppt und 100 mL des Kulturüberstandes dreimal mit jeweils 50 mL Pentan/Ether-Gemisch extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereint, über Nacht über Natriumsulfat getrocknet und destillativ eingengt (Vigreux). Sie wurden gaschromatographisch quantifiziert.

### 4.8.3 Probenahme aus dem Bioreaktor

Aus dem Bioreaktor wurden 150 mL Medium als Probe entnommen und filtriert. Der Rückstand wurde zur Trockenmassebestimmung verwendet. Etwa 100 mL des Überstandes wurden nach Zusatz des inneren Standards Campher

---



(80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dreimal mit je 50 mL Pentan/Diethylether (1:1,2) extrahiert, über Nacht über Natriumsulfat getrocknet und destillativ eingengt (Vigreux).

#### **4.8.4 Untersuchung der Bioreaktor-Abluft**

Die Abluft des Bioreaktors wurde während der Transformation direkt durch eine Glassäule (1 x 12 cm) mit 10 g Lewatit geleitet. Von dem Adsorptionsmittel (Lewatit) wurden am 1., 3., 5., 7. und 9. Kulturtag mit 100 mL Pentan/Diethylether (1:1,2) die flüchtigen Bestandteile desorbiert, der Extrakt in der Vigreux-Destillation aufkonzentriert, über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch untersucht. Die Aktivierung des Lewatits wurde durch eine dreimalige Reinigung mit Methanol, Diethylether und Pentan mit jeweils dem doppelten Volumen des Harzes durchgeführt und das Lewatit im Trockenschrank getrocknet.

### **4.9 Bestimmung von Kulturparametern**

#### **4.9.1 Bestimmung der Zellmasse**

##### Feuchtmasse:

Nach Zentrifugation der Pilzkulturen bei 4000 rpm (2000 g) wurde der Überstand abdekantiert. Adsorbierte Wassertropfen wurden abpipetiert und anschließend die Zellmasse in den Zentrifugenbehältern ausgewogen.

##### Trockenmasse:

Das Sediment des 400 mL Kulturvolumens wurde über ein tariertes Filterpapier abgesaugt, der Filtrerrückstand 24 h bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend ausgewogen.

#### **4.9.2 Glucosegehalt**

##### Photometrische Bestimmung:

Glucose wurde enzymatisch mit dem Glucose UV-Test zur Bestimmung von D-GLUCOSE in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien von Boehringer Mannheim/R-Biopharm nach Herstelleranweisung (Bestimmung von D-GLUCOSE in Fermentationsproben und Zellkulturmedien) durchgeführt. Fermentationsproben wurden bei 340 nm und wegen der Eigenschaft von Limonen, Weichmacher aus

---

Kunststoffen zu lösen, in Quartsküvetten vermessen. Eine Enzyminhibierung der Kulturüberstände erfolgte für 20 min statt 10 min bei 80 °C.

#### Bestimmung mit Teststäbchen:

Die Durchführung erfolgte mittels Diabur-Test<sup>®</sup> 5000 von Roche Diagnostics GmbH nach Herstelleranweisung.

#### **4.9.3 Bestimmung des pH-Wertes**

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde direkt nach den Probenahmen mit einem täglich kalibrierten pH-Meter bestimmt.

### **4.10 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie**

#### **4.10.1 Extraktion von Kulturüberständen**

Die Kulturmedien (100 mL) wurden nach beendeter Transformation mit einem internen Standard versetzt (Campher, Endkonzentration 80 mg L<sup>-1</sup>). Die Abtrennung der Biomasse erfolgte durch Filtration. Der Überstand wurde dreimal je mit 100 mL Pentan/Diethylether-Lösungsmittelgemisch (1:1,2) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an einer Vigreux-Kolonnen bei 42 °C Wasserbadtemperatur eingengt. Um das Konzentrat auf das Volumen zu kalibrieren wurde ein zweiter interner Standard zugegeben (Nonadecan, Endkonzentration 80 mg L<sup>-1</sup>). Der erhaltene Extrakt wurde mittels GC-FID und GC-MS untersucht.

#### **4.10.2 SPME-Extraktion**

Während der Screeningversuche wurde zur Probenaufarbeitung die Methode der Festphasenmicroextraktion (SPME) eingesetzt. Mit NaCl gesättigte, mycelfreie Medienproben (4 mL) wurden mit einem internen Standard (Campher 7,5 mg L<sup>-1</sup>) versetzt und an eine Carbowax®/Divinylbenzen (CW/DVB 65 µm Filmdicke) Faser 40 min bei 150 rpm adsorbiert. Die Faser wurde im Split-Splitless-Injektor eines Gaschromatographen für 3 min bei 230 °C desorbiert (Demirci et al. 2001, Demyttenaere et al. 2001 c). Die Konditionierung der Fasern erfolgte nach Herstellerhinweis.

---

### **4.10.3 Aromaextraktion von Früchten und Gewürzen**

#### Chlorophyll-Präzipitat:

100 g Pflanzenmaterial wurden in einem Waring Blendor mit 500 mL gekühltem Aceton homogenisiert. Das Homogenat wurde über ein Cellulosefasertuch mittels Büchnertrichter unter Benutzung einer Wasserstrahlpumpe filtriert. Zur Einleitung der Fällung wurde 70 mL 1,4-Dioxan zu dem Rohextrakt gegeben. Anschließend wurde unter Rühren tropfenweise 80 mL entionisiertes Wasser zugegeben. Zur Vervollständigung der Fällung wurde die Mischung zwei Stunden bei  $-18\text{ °C}$  aufbewahrt. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile aliquotiert, Aceton wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers abdestilliert, und ein Aliquots anschließend einer kontinuierlichen Extraktion unterzogen.

### **4.10.4 Kontinuierliche Extraktion**

100 g Probenmaterial wurde mit 400 mL kaltem Methanol homogenisiert. Zelluläre Bestandteile wurden mittels Filtration entfernt. Das Filtrat wurde mit NaCl (5%) auf 1000 mL aufgefüllt und einer kontinuierlichen Extraktion unterzogen. Der Extrakt wurde anschließend an der Vigreux-Kolone auf 1 mL eingengt.

### **4.10.5 Soxhlet-Extraktion**

25 g Probenmaterial wurden einer 4-5 stündigen ethanolischen Extraktion unterzogen. Ein weiterer Versuchsansatz erfolgte mit Pentan/Diethylether als Extraktionsmittel.

## **4.11 Chromatographie**

### **4.11.1 Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen**

Die Geruchsqualitäten und -schwellenwerte im Verdünnungsmedium Luft wurden mittels GC-O bestimmt.

Bei der Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion (GC-O) ist die Kapillarsäule am Ende mit einem Y-Glasverbinder versehen, der den Gasstrom über zwei kurze Säulenstücke zu gleichen Teilen in den FID-Detektor und den Sniffport leitet. Jede untersuchte Substanz wurde von mindestens drei

---

Testpersonen bezüglich ihrer Geruchsqualität und ihres Geruchsschwellenwertes beurteilt.

#### 4.11.2 Silylierung für die Gaschromatographie

Zur Silylierung wurden 80 µL der in Pentan/Ether gelösten Probe mit 20 µL BSTFA (bis-(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid) oder BSTFA mit 1% Trimethylchlorsilan versetzt. Die Silylierung fand über Nacht bei Raumtemperatur statt.

### 4.12 Chromatographie

Tab. 4-11 GC-FID

<b>Gaschromatograph:</b>	<b>Siemens Sichromat 1-4</b>
Injektor:	Split-Splitless (Splitverhältnis 1:40), 230°C, Splitöffnung nach 3 min
Trennsäule (linker Ofen):	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektoren:	FID, 230 °C
Trärgas:	H <sub>2</sub> : Vordruck: 2 bar;
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 2 bar; Luft: 2 bar
Datenaufnahme:	Chromatopac C-R3A Integratoren (Shimadzu)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> – 150 °C, 10 °C min <sup>-1</sup> – 230 °C (20 min).

Tab. 4-12 GC-FID mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O)

<b>Gaschromatograph</b>	<b>Satochrom (Sato)</b>
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Vorsäule:	FS-CW deaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	FID, 250 °C; Sniff-Port, 220 °C
Trärgas:	H <sub>2</sub> : Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,3 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min <sup>-1</sup> - 230 °C (10 min)

Tab. 4-13 GC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)

<b>Gaschromatograph</b>	<b>GC 8000 (Fisons)</b>
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	MD 800 (Fisons)
Trägergas:	He, Vordruck: 50 kPa, Fluss 3,1 mL min <sup>-1</sup>
Temperaturen:	Ionenquelle 200 °C, Interface 230 °C, Quadrupol Massenfilter 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	m/z 33-300
Datenaufnahme:	Masslab Version 1.3 (Fisons)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5°C min <sup>-1</sup> - 230 °C (20 min)
Auswertung:	Spektrenbibliothek Wiley, NBS54K (Nist),

Tab. 4-14 Präparative Gaschromatographie

<b>Gaschromatograph:</b>	<b>GC 5890 Series II (Hewlett-Packard) mit MCS (Gerstel)</b>
Injektor:	KAS-3 Kaltaufgabesystem (Gerstel), 40 °C
Autosampler:	HP 7673 (Hewlett-Packard), Injektionsvolumen 5 µL
Fraktionensammler:	PFS (Gerstel)
Säule 1:	BC CW 20M, 3 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Säule 2:	BC CW 20M, 25 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Detektoren:	Vor-/Hauptdetektor: FID, 250 °C
Gase und Strömungen:	Trägergas: H <sub>2</sub> ; Fluss: 5 mL min <sup>-1</sup>
Detektorgase:	H <sub>2</sub> : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Temperaturen:	Transferleitung 200 °C, Verteiler 200 °C, Fallen -10 °C
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5°C min <sup>-1</sup> - 210 °C (10 min)
Datenaufnahme und Steuerung:	Vectra QS/16S (Hewlett-Packard) mit MCS 1.15 Software

### 4.13 Berechnung von Kovats-Indizes

Die Kovats-Indizes wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \cdot \frac{(\log t'_A - \log t'_N)}{(\log t'_{N+n} - \log t'_N)}$$

mit:

N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert

n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans

A = Analyt

t' = relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t<sub>0</sub>

Die Alkanreihe enthielt alle Alkane von C<sub>10</sub> bis C<sub>25</sub>.

### 4.14 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer:	Perkin Elmer Lambda 12
Datenaufnahme:	UV Win Lab (Version 2.0)
Schichtdicke der Küvette:	1 cm

### 4.15 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektrometer:	Bruker WP-400
Lösungsmittel:	CDCl <sub>3</sub>
<sup>1</sup> H-NMR:	400 MHz
<sup>13</sup> C-NMR:	50 MHz
Messverfahren:	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY

## 4.16 Entsorgungshinweise

### Biologisches Material:

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Filtration wurde das Medium in das Laborabwasser und feste Bestandteile in den Laborabfall gegeben.

### Lösungsmittel und Chemikalien:

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch die verwendeten Aufarbeitungsverfahren (Mikroextraktion) sowie durch weitgehende Wiederverwendung destillativ gereinigter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogener Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel.

Ebenso wie andere Sonderabfälle des Labors wurden diese Lösungsmittel der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

---

## 5 LITERATUR

Abraham B., Krings U., Berger R. G.: Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten (Ständerpilze), *GIT Lab.J.*, 4/94, 370-375 (1994)

Abraham W. R., Stumpf B., Kieslich K.: Microbial transformation of terpenoids with 1-p-menthen skeleton, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 24-30 (1986)

Abraham W. R., Arfmann H. A., Stumpf B., Washausen P., Kieslich K.: Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds, *Bioflavour`87*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 399-414 (1988)

Abraham W.- R., Hanssen H.- P., Urbasch I.: Lepistirones, major volatile metabolites from liquid cultures of *Lepista irina* (Basidiomycotina), *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 46c, 169-171 (1991)

Abraham W.- R., Hoffmann H. M., Kieslich K., Reng G., Stumpf B.: Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids, *Ciba Foundation symposium*, 111, 146-160 (1985)

Abraham W.- R., Stumpf B.: Biotransformation of humulene by fungi and enantioselectivity of the strains used, *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 42c, 79-86 (1987)

Adams A., Demyttenaere J. C. R., De Kimpe N.: Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions, *Food Chem.*, 80, 525-534 (2003)

Agrawal R., Deepika N. U., Joseph R.: Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of  $\alpha$ -pinene to verbenol, *Biotechnol. Bioeng.*, 63(2), 249-252 (1999)

Agrawal R., Joseph R.: Bioconversion of  $\alpha$ -pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 335-337 (2000)

Ahles L. A., Fernando Q., Rodig O. R., Quante J. M.: Interaction of copper(II) with the fungal metabolite, *Bioinorganic Chemistry*, 5(4), 361-366 (1976)

Aleu J., Collado I. G.: Biotransformation by *Botrytis* species, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 13, 77-93 (2001)

Alonso W., Croteau R., Purification and characterization of the monoterpene cyclase  $\gamma$ -terpinen synthase from *Thymus vulgaris*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 286(2), 511-517 (1991)

Andrews R. E., Parks L. W., Spence K. D.: Some effects of douglas fir terpenes on certain microorganism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40(2), 301-304 (1980)

Archibald F., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M., Reid I.: Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*, *J. Biotechnol.*, 53, 215-236 (1997)

Ariza M. R., Larsen, Thomas O., Petersen, Bent O., Duus, Jens O., Barrero, Alejandro F.: *Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 50(22), 6361-6365 (2002)

Asakawa Y., Takahashi H., Toyota M., Noma Y.: Biotransformation of monoterpenoids, (-)- and (+)-menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species, *Phytochemistry*, 30(12), 3981-3987 (1991)

Aviv D., Krochmal E., Dantes A., Galun E.: Biotransformation of monoterpenes by *Mentha* cell lines: Conversion of menthone to neomenthol, *Planta Med.*, 42, 236-243 (1981)

---



- Babicka J., Volf J., Lebeda J.: Biochemical manufacture of menthol, 84, 320, Patentno. CS 84320 (1955)
- Bano Z., Shashirekha M. N., Rajarathnam S.: Improvement of the bioconversion and biotransformation efficiencies of the oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) by supplementation of its rice straw substrate with oil seed cakes, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 15(11), 985-989 (1993)
- Banthorpe D. V., Mann J., Poots I.: 1,2-Hydrogen-shifts in the biosynthesis of the thujane skeleton, *Phytochemistry*, 16(5), 547-550 (1977)
- Barash I., Manulis S., Kashman Y., Springer J.P., Chen, M. H. M., Clardy J., Strobel G. A.: Crystallization and x-ray analysis of stemphyloxin 1, a phytotoxin of *Stemphylium botryosum*, *Science*, 220, 1065-1066 (1983)
- Barbirato F., Verdoes J. C., de Bont J. A. M., van der Werf M. J.: The *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases, *FEBS Lett.*, 438, 293-296 (1998)
- Barma D. K., Kundu A., Baati R., Mioskowski C., Falck J. R.: A convenient preparation of 3-substituted furans: Synthesis of perillene and dendrolasin, *Org. Lett.*, 4(8), 1387-1389 (2002)
- Başer K. H. C., Demirci B., Dönmez A. A.: Composition of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britton from Turkey, *Flavour Fragrance J.*, 18(2), 122-123 (2003)
- Bashi E., Rotem J.: The effects of photosynthesis and exogenous glucose on infection of tomato by *Stemphylium botryosum* f.sp. *lycopersici*, *Phytopathologische Zeitschrift*, 88(1), 69-77 (1977)
- Basu P. K.: Survey of eastern Ontario alfalfa fields to determine common fungal diseases and predominant soil-borne species of *Pythium* and *Fusarium*, *Canadian Plant Dis. Surv.*, 63(2), 51-54 (1983)
- Belitz H.- D., Grosch W., Schieberle P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Ausg., Springer, Berlin (2001)
- Benn S. M., Peppard T. L.: Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis, *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 557-566 (1996)
- Berger R. G.: Colours/flavours derived by fermentation, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. R.K.Robinson, C. A. Batt, P.D. Patel, Acad. Press, 729-735, 1999
- Bernardi R., Cardani C., Ghiringhelli D., Sela A.: On the components of secretion of mandibular glands of the ant *Lasius (Dendrolasius) fuliginosus*, *Tetrahedron Lett.*, 40, 3893-3896 (1967)
- Best D. J., Floyd N. C., Magalhaes A., Burfield A., Rhodes P. M.: Initial enzymic steps in the degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Biocatalysis*, 1, 147-159 (1987)
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E.: Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2554-2559 (1996)
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E.: Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2547-2553 (1997)
- Bhattacharyya P. K., Prema B. R., Kulkarni B. D., Pradhan S. K.: Microbial transformation of terpenes: hydroxylation of  $\alpha$ -pinene, *Nature*, 187, 689-690 (1960)
- Birkinshaw J. H., Bracken A., Findlay W. P. K.: Biochemistry of the wood-rotting fungi. 4. Metabolic products of *Trametes suavis* (Linn.) Fr., *Biochem. J.*, 38, 131-132 (1944)
-

- Blaich R., Esser K.: Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi, *Arch. Microbiol.*, 103(3), 271-277 (1975)
- Bluhm L.: Distilled beverages, *Biotechnology Volume 5 Food and Feed Production with Microorganisms*, Reed G. Ed., Verlag Chemie: Weinheim, Germany (1983)
- Bock, G., Benda, I., Schreier, P: Metabolism of linalool by *Botrytis cinerea*, *ACS-Symposium Series, 317 (Biogener. Aromas)*, 243-53 (1986)
- Bohlmann J., Martin D., Oldham N. J., Gershenzon J.: Terpene secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, und functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 375, 261-269 (2000)
- Bohlmann J., Steele C. L., Croteau R.: Monoterpene syntheses from grand fir (*Abies grandis*), *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.*, 272(35), 21784-21792 (1997)
- Borges O. L., Stanford E. H., Webster R. K.: The host-pathogen interaction of alfalfa and *Stemphylium botryosum*, *Phytopathology*, 66, 749-753 (1976)
- Boulanger R., Cruzet: Identification of the aroma components of acerola (*Malphigia glabra* L.): free and bound flavour compounds, *J. Food Chem.*, 74(2), 209-216. (2001)
- Bowen E. R.: Potential by-products from microbial transformation of D-limonene, *Proc. Florida State Horticultural Society*, 88, 304-308 (1975)
- Bradshaw W. H.: Microbial degradation of (+)-camphor, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5507 (1959)
- Breitmeier E.: Terpene, Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone, *Teubner Studienbücher Chemie*, B.G.Teubner Stuttgart, 21 (1999)
- Brenner D. M.: Perilla: Botany, uses and genetic resources, 322-328, J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York (1993)
- Broschious S. C., Kirby H. W.: Economic evaluation of fungicides for control of *Alfalfa* foliar diseases, *Phytopathology*, 78(7), 934-939 (1988)
- Buckingham J.: Dictionary of natural products on CD-ROM, Version 6.1, Chapman & Hall, London, (1998)
- Burbott A. J., Loomis W. D.: Evidence for metabolic turnover of monoterpenes in peppermint. *Plant Physiol.*, 44(2), 173-179, (1969)
- Busmann D., Berger R. G.: Conversion of myrcene by submerged cultures basidiomycetes, *J. Biotechnol.*, 37, 39-43 (1994) a
- Busmann D., Berger R. G.: Oxyfunctionalization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene by selected basidiomycetes, *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 49c, 545-552 (1994) b
- Byers J. A.: Chemical ecology of bark beetles, *Experientia*, 45, 271-283 (1989)
- Byers J. A.: Male-specific conversion of the host plant compound, myrcene, to the pheromone,(+)-ipsdienol, in the bark beetle, *Dendroctonus brevicomis*, *J. Chem.Ecol.*, 8(2), 363-371 (1982)
- Camps F., Colly J., Pascual J.: Alcoholes terpenicos monociclicos IX. p-menta-1,4-dien-7-ol and p-menta-1,4-dien-9-ol, *Anales De Quimica*, 1089-1094 (1968)
- Capek A., Hanc O., Tadra M. Tuma J.: Microbial transformation of steroids XXVI, Preparation of cortisone from cortexolone, *Seska Slov. Farm.*, 5(4), 198-199, (1966) a
-

- Capek. A., Hanc O., Tadra M., Tuma J.: Microbial transformations of steroids. XXV. Effect of substituents on the direction of the transformation of steroids by *Beauveria bassiana*, *Folia Microbiol.* (Prague), 11(2), 159-162, (1966) b
- Carroll F. E., Carroll G. C.: Senescence and death of the conidiogenous cell in *Stemphylium botryosum* Wallroth, *Arch. Microbiol.*, 94, 109-124 (1973)
- Carroll F. E.: A fine-structural study of conidium initiation in *Stemphylium botryosum* Wallroth, *J Cell Sci.*, 2, 33-47 (1972)
- Chang H. C., Oriol P.: Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Food Sci.*, 59, 660-686 (1994)
- Charlwood B. D., Banthorpe D. V.: The biosynthesis of monoterpenes, *Prog. Phytochem.*, 5, 65-125 (1978)
- Cho N.-S., Nam J.- H., Park J.-M., Koo C.-D., Lee S.-S., Pashenova N., Ohga S., Leonowicz A.: Transformation of chlorophenols by white-rot fungi and their laccase, *Holzforschung*, 55(6), 579-584. (2001)
- Clark B. C., Chamblee T. S.: Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors, Charalambous G. (ed) *Off-flavors in foods and bevarages*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 229 (1992)
- Clark R. G., Nursten E. N.: Volatile flavour components of walnut (*Juglans regia* L.), *J. Sci. Food Agric.* 27, 902-908, (1976)
- Clark R. G., Nursten H. E.: The sensory analysis and identification of volatile from walnut (*Juglans regia* L.) Headspace, *J. Sci. Food Agric.*, 28, 69-77, (1977)
- Colby S. M., Alonso W. R., Katahira E. J., McGarvey D. J., Croteau R.: 4S-limonene synthase from oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). C-DNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase, *J. Biol. Chem.*, 268, 23016-23024 (1993)
- Coley-Smith J. R., Verkhoeff K., Jarvis W. R.: The biology of *Bortrytis*, Academic Press, London, 153-175 (1980)
- Couladis M., Özcan M., Tzakou O., Akgül A.: Comparative essential oil composition of various parts of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L) growing wild in Turkey, *J.Sci. Food Agric.*, 83(2), 136-138 (2003)
- Cowling W. A.: Environmental, genetic, and physiological factors influencing disease severity in *Stemphylium* leavespot of alfalfa in California, Ph.D. dissertation, 211pp (1980)
- Cowling W. A., Gilchrist D. G., Graham J. H.: Biotypes of *Stemphylium botryosum* on alfalfa in North America, *Phytopathology*, 71, 679-684 (1981)
- Croteau R., Alonso W. R., Koepp A. E., Johnson M. A.: Biosynthesis of monoterpenes: Partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 309(1), 184-192, (1994)
- Croteau R., Karp F.: Biosynthesis of monoterpenes: Partial purification and characterization of 1,8-cineole synthetase from *Salvia officinalis*, *Arch Biochem Biophys.*, 179(1), 257-265. (1977) a
- Croteau R., Karp F.: Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol, *Arch. Biochem. Biophys.*, 184(1), 77-86, (1977) b
- Croteau R., Karp F.: Enzymatic synthesis of camphor from neryl pyrophosphate by a soluble preparation from sage (*Salvia officinalis*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72(2), 440-447, (1976) a
-

- Croteau R., Karp F.: Biosynthesis of monoterpenes: enzymatic conversion of neryl-pyrophosphate to 1,8-cineole, alpha-terpineol, and cyclic monoterpene hydrocarbons by a cell-free preparation from sage (*Salvia officinalis*), *Arch. Biochem. Biophys.*, 176(2), 734-746, (1976) b
- Davies N. W.: Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases, *J. Chromatogr.*, 503, 1-24 (1990)
- De Pooter H. L., Coolsaet B. A., Dirinck P. J. Schamp N. M.: GLC of the headspace after concentration on Tenax GC and of the essential oil of apples, fresh celery, fresh lovage, honeysuckle and ginger powder, *Proc. Int. Symp. Essential Oils*, 15th (1984), 67-77, (1985)
- Demirci F., Kirimer N., Demirci B., Noma Y., Baser K. H. C.: Screening of biotransformation products of carvone enantiomers by headspace-SPME/GC-MS, *Z. Naturforsch. C: Biosci.*, 56c, 58-64 (2001)
- Demyttenaere J. C. R., Adams A., Vanoverschelde J., De Kimpe N.: Biotransformation of (S)-(+)-Linalool by *Aspergillus niger*: An investigation of the culture conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5895-5901 (2001) a
- Demyttenaere J. C. R., De Kimpe N.: Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, 265-270 (2001) b
- Demyttenaere J. C. R., De Pooter H. L.: Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*, *Flavour Fragrance J.*, 13, 173-176 (1998)
- Demyttenaere J. C. R., De Pooter H. L.: Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*, *Phytochemistry*, 41(4), 1079-1082 (1996)
- Demyttenaere J. C. R., De Pooter H. L.: Biotransformation of geraniol by fungal spores, *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 60(4a), 1961-1967 (1995)
- Demyttenaere J. C. R., del Carmen H. M., De Kimpe N.: Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.*, *Phytochemistry*, 55, 363-373 (2000)
- Demyttenaere J. C. R., Van Belleghem K., De Kimpe N.: Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening, *Phytochemistry*, 57, 199-208 (2001) c
- Demyttenaere J. C. R.: Biotransformation of terpenoids by microorganisms, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 25, 125-178 (2001) d
- Dercova K., Tandlich R., Brezna B.: Application of terpenes as possible inducers of biodegradation of PCBs, *Fresenius Environ. Bull.*, 12(3), 286-290. (2003)
- Devon T. K., Scott A. I.: Terpenes, *Handbook of naturally occurring compounds*, Vol.2, Academic Press, New York, 3 (1972)
- Dhavalikar R. S., Bhattacharyya P. K.: Microbiological transformations of terpenes, VIII, Fermentation of limonene in a soil pseudomonad, *Indian J. Biochem.*, 3, 144-157 (1966) a
- Dhavalikar R. S., Rangachari P. N., Bhattacharyya P. K.: Microbiological transformations of terpenes, IX, Pathways of degradation of limonene in a soil pseudomonad, *Indian J. Biochem.*, 158-164 (1966) b
- Doelger W. P., Prescott.: S. C Citric acid fermentation, *J. Ind. Eng. Chem.*, 26, 1142-1149. (1934)
- Draczynska L. B.: Oxidation of selected p-menthane derivatives by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands, *J. Basic Microbiol.*, 27, 191-196 (1987)
-

- Drawert F., Barton H.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*, *J. Agric. Food Chem.*, 20, 765-766 (1978)
- Drawert F., Berger R. G., Neuhaeuser K.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 4. Characterization of the major principles of the odor of *Pleurotus euosmus*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18(2), 124-127 (1983) a
- Drawert F., Berger R. G.: Biogenesis of aroma compounds in plants and fruits. XIX. Comparison of aroma biosynthesis in segment, callus, and suspension cultures of Citrus species, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 7(5), 143-147 (1982)
- Drawert F., Berger R. G.: The use of microorganisms and plant cell cultures for the production and biosynthesis of aroma substances, *European brewery convention, Symposium on Biotechnology*, 122-143 (1983) b
- Duetz W. A., Bouwmeester H., van Beilen J. B., Witholt B.: Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeast, and plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 269-277 (2003)
- Duetz W. A., Fjällman A. H. M., Ren S., Jourdat C., Witholt B.: Biotransformation of D-limonene to (+)-trans-carveol by toluene grown cells of *Rhodococcus opacus* PWD4, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), 2829-2832 (2001)
- Duke J. A., Handbook of medicinal herbs, CRC Press, Boca Raton, FL (1985)
- Dunphy P. J., Allcock C.: Isolation and properties of a monoterpene reductase from rose petals, *Phytochemistry*, 11(6), 1887-1891 (1972)
- Dusbabek F., Bukva V.: *Modern Acarology*, Bd. 1, 43-52, 52-58, Hague, SPB Academic Publishing, 1991
- Dusbabek F., Zahradnickova H., Simek P.: Chemical stability of assembly pheromone of argasid ticks (*Ixodoidea: Argasidae*). *Folia Parasitol. (Prague)*, 45(1), 62-66 (1998)
- Dwivedi B. K., Kinsella J. E.: Continuous production of blue-type cheese flavor by submerged fermentation of *Penicillium roquefortii*, *J. Food Sci.*, 39, 620-622 (1974)
- Eaton R. W.: p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate, *J. Bacteriol.*, 179(10), 3171-3180 (1997)
- Eaton, Richard W: p-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA carrying the cmt operon, *J. Bacteriol.*, 178(5), 1351-1362 (1996)
- Einsele A., Finn R. K., Samhaber W.: Microbiological and biochemical process technology. introduction, *Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik*, Verlagsgesellschaft Chemie, Weinheim (1985)
- EMBL Nukleotid Sequence Database <http://ebi.ac.uk/embl/index.html>
- Feger W., Brandauer H., Ziegler H.: Analytical investigation of Murcott (honey) tangerine peel oil, *J. Essent. Oil Res.*, 15(3), 143-147 (2003)
- Fessner W.-D., Jones J. B.: Biocatalysis and biotransformation from discovery to application, *Curr. Chem. Biol.*, 5, 103-105 (2001)
- Fichan I., Larroche C., Gros J. B.: Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids, *J. Chem. Eng. Data*, 44, 56-62 (1999)
- Fischbach R. J., Zimmer W., Schnitzler J.- P.: Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.), *Eur. J. Biochem.*, 268, 5633-5638 (2001)
-

- Focke I, Focke R.: The effect of common leaf spot (*Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc.) and leaf spot (*Stemphylium botryosum* Wallr., *Phoma medicaginis* Malbr. et Roum.) on the CO<sub>2</sub> assimilation by the leaves of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Zentralbl.Bakteriol.*, 123(7), 766-70 (1969)
- Fric P.: New aspect of varieties composition of hops in Czech Republic, *Kvasny Prumysl*, 42(11), 344-345 (1996)
- Frisvad J. C., Filtenborg O.: Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1301-1310 (1983)
- Frisvad J. C., Filtenborg O.: Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production, *Mycologia*, 81(6), 837-861 (1989)
- Frisvad J. C.: Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 568-579 (1981)
- Fröhlich O., Shibamoto T.: Stability of pulegone and thujone in ethanolic solution, *J. Agric. Food Chem.*, 38(11), 2057-2060 (1990)
- Gaylarde C. C., Bento F. M., Kelley J.: Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control, *Rev. Microbiol.*, 30(1), 1-10 (1999)
- Gershenzon J., Croteau R.: Terpenoids, Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, Vol.1: The Chemical Participants, 2. Auflage, San Diego (Academic Press) (1991)
- Geypens M., Desai B. G., Van Assche C.: Investigation of the enzymatic activities in culture filtrates of *Stemphylium botryosum* Wallroth and in extracts of *Stemphylium* infected and healthy tissues of apple and pear, *Mededelingen van de Facilteit Landbouwwetenschappen*, 38(3), 1435-1443 (1973)
- Gibbon G. H., Millis N. F., Pirt S. J.: Degradation of  $\alpha$ -pinene by bacteria, *Ferment. Technol. Today, Proc. Int. Ferment. Symp.*, 4<sup>th</sup>, 609-12. (1972)
- Gindrat D., Varadi C., Neury G.: Asperge: Une nouvelle maladie du feuillage, provoquée par un *Stemphylium*, *Rev. Suisse Vitic Arboric Hortic*, 16, 81-85 (1984)
- Griffiths E. T., Bociek S. M., Harries P. C., Jeffcoat R., Sissons D. J., Trudgill P. W.: Bacterial metabolism of  $\alpha$ -pinen pathway from  $\alpha$ -pinen oxid to acyclic metabolites in *Nocardia* strain p18.3., *J. Bacteriol.*, 169(11), 4972-4979 (1987) b
- Griffiths E. T., Harries P. C., Jeffcoat R., Trudgill P. W.: Purification and properties of  $\alpha$ -pinen oxid lyase from *Nocardia* sp. strain P18.3., *J. Bacteriol.*, 169, 4980-4983 (1987) a
- Guenther E.: The essential oils, 3, D. Van Nostrand, New York (1949)
- Hanson J., Marten T., Nyfeler R.: Studies in terpenoid biosynthesis, Part XV, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 8, 876-880 (1976)
- Hanson R. L., Matson J. A., Brzozowski D. B., LaPorte T. L., Springer D. M., Patel R. N.: Hydroxylation of mutilin by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella echinulata*, *Org. Process Res. Dev.*, 6(4), 482-487 (2002)
- Harborn J. B.: Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids, Oxford Clarendon Press, 399-426 (1991)
- Hartmans S., van der Werf M. J., de Bont J. A. M.: Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenin dinucleotide-dependent styrene monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1347 (1990)
- Hasegawa T., Takahashi K., Sakano I., Nishikawa M., Hagiwara H., Noguchi S.: Oxidation of steroids, Patent JP 34000426, *Oxidation of steroids* (1959)
-

- Hasegawa T., Takahashi K., Sakano I., Nishikawa M., Hagiwara, H., Noguchi S.: Oxidation of steroids., Patent JP 33007372, (1958,1960)
- Hassanzadeh, M. K., Rahimizadeh, M., Vahedie, L: Constituents of the essential oils of aerial parts of dill (*Anethum graveolens* L.) herb, *Orient. J. Chem.*, 16(1), 29-32. (2000)
- Haudenschild C., Schalk M., Karp F., Croteau R.: Functional expression of regiospecific cytochrome P<sub>450</sub> limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 379, 127-136 (2000)
- Haugland R. A., Varma M., Wymer L. J., Vesper S. J.: Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species, *Syst. Appl. Microbiol.*, 27(2), 198-210 (2003)
- Hayward S., Muncey R. J., James A. E., Halsall C. J., Hewitt C. N.: Monoterpene emissions from soil in a sitka spruce forest, *Atmos. Environ.*, 35(24), 4081-4087, (2001)
- Heath M. C., Higgins V. J.: *In vitro* and *In vivo* conversion of phaseollin and pisatin by an alfalfa pathogen *Stemphylium botryosum*, *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 107-120 (1973)
- Heidel W., Schulze R.: First results of field and laboratory studies on the causal agent of black leg of sugar beet in flooded areas in the north of the German Democratic Republic, *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR*, 38, 33-37 (1984)
- Heiny D. K., Gilchrist D. G.: Isolation and partial characterization of polypeptides associated with phytotoxin in cultures of the cool-temperature biotype of *Stemphylium botryosum* pathogenic on alfalfa, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 34, 483-505 (1989)
- 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. Environ. Microbiol.*, 60, 4440-4444 (1994)
- Hernandez B. S., Koh S.-C., Chial M., Focht D. D.: Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil, *Biodegradation*, 8(3), 153-158 (1997)
- Higgins V. J., Stoessl A., Heath M. C.: Conversion of phaseollin to phaseollinisoflavan by *Stemphylium botryosum*, *Phytopathology*, 64(1), 105-107 (1974)
- Hill E. C., Hill G. C.: Microbiological problems in distillate fuels, *Trans. Inst. Marine Eng.*, 104, 119-130 (1993)
- Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H.: Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathways in plants, and by the mevalonate pathway in fungi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(7), 1448-1458 (2000)
- Hu S., Hager L. P.: Unusual propargylic oxidations catalyzed by chloroperoxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253, 544-546 (1998)
- Hu S., Yang L., Pan J., Xu Z.: Comparative study on the components of essential oils from 12 *Artemisia* species as medicinal plants, *Zhongcaoyao*, 16(2), 80-82, (1985)
- Hübner G., Volkl W., Francke W., Dettner K.: Mandibular gland secretions in alloxystine wasps (*Hymenoptera*, *Cynipoidea*, *Charipidae*): Do ecological or phylogenetical constraints influence occurrence or composition? *Biochem. Syst. Ecol.*, 30(6), 505-523 (2002)
- Hungund B. L., Bhattacharyya P. K., Rangacchari P. N.: Terminal oxidation pattern of a soil *Pseudomonas* (PL strain), *Arch. Microbiol.*, 71, 258-262 (1970)
- Ibáñez E., Oca A., de Murga G., López-Sebastián S., Tabera J., Reglero G.: Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1400-1404 (1999)
-

Ikedo R. M., Stanley W. L., Vannier S. H., Sadi H., Splitter E. M.: Monoterpene hydrocarbon composition of some essential oils, *J. Food Sci.*, 27, 455-458 (1962)

Incitti S., Tommasini A., Pascucci E.: Determination of minor volatile constituents of spirits. 1. Tequila, *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.*, 9(1), 43-50 (1980)

Ishida T., Asakawa Y., Okano M., Aratani T.: Biotransformation of terpenoids in mammal.I. Biotransformation of 3-carene and related compounds in rabbits, *Tetrahedron Lett.*, 28, 2437-2440 (1977)

Ishida T., Asakawa Y., Takemoto T., Aratani T.: Terpenoids biotransformation in mammals III: Biotransformation of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, pinane, 3-carene, carane, myrcene, and  $\rho$ -cymene in rabbits, *J. Pharmaceutical Sci.*, 70(4), 406-415 (1981)

Isoe S., Katsumura S., Sakan T.: Synthesis of damascenone and  $\beta$ -damascone and the possible mechanism of their formation from carotenoids, *Helv. Chim. Acta*, 56(5), 1514-16 (1973)

Ito M., Toyoda M., Honda G.: Chemical composition of the essential oil of *Perilla frutescens*, *Nat. Med. (Tokyo)*, 53(1), 32-36 (1999) a

Ito M., Toyoda M., Honda G.: Essential oil composition of hybrids and amphidiploids of japanese wild *Perilla*, *Nat. Med. (Tokyo)*, 53(3), 118-122 (1999) b

Ito M., Toyoda M., Nakano Y., Kiuchi F., Honda G.: Chemical composition of essential oils from *Perilla setoyensis*, a new species of wild *Perilla* in Japan, *J. Essent. Oil Res.*, 11(6), 669-672 (1999) c

Iurescia S., Marconi A. M., Tofani D., Gambacorta A., Paternò A., Devirgiliis C., van der Werf M.J., Zennaro E.: Identification and sequencing of  $\beta$ -myrcene catabolism genes of *Pseudomonas sp.* M1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(7), 2871-2876 (1999)

Jennings W., Shibamoto T., Qualitativ analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Academic Press (1980)

Joglekar S. S., Dhavlikar R. S.: Microbial transformation of terpenoids. I. Identification of metabolites produced by a pseudomonad from citronellal and citral, *App. Microbiol.*, 18(6), 1084-1087 (1969)

Kahraman S., Yesilada O.: Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi, *Folia Microbiol.* (Prague), 44(6), 673-676 (1999)

Kannan K., Oblisami G.: Enzymology of ligno-cellulose degradation by *Pleurotus sajor-caju* during growth on paper-mill sludge, *Biol. Wastes*, 33, 1-8 (1990)

Karp F., Mihaliak C. A., Harris J .L., Croteau R.: Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and *Perilla* (*Perilla frutescens*) leaves, *Arch. Biochem. Biophys.*, 276, 219-226 (1990)

Kaspera R.: Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse, Dissertation, Universität Hannover (2004)

Khadzhieva, P., Sandra, P., Stoyanova-Ivanova, B., Verzele, M: Open tubular gas chromatography-mass spectral (electron impact and chemical ionization) analysis of the hydrocarbon fraction of bulgarian rose oil, *IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod.*, 11th, 2 464-468, (1978)

Kieslich K., Abraham W. R., Stumpf B., Thede B., Washausen P.: Transformations of terpenoids, *Progress in Essential Oil Research*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 366-394 (1986)

---



- King A., Dickinson J. R.: Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and larger yeast, *FEMS Yeast Research*, 3(1), 53-62, (2003)
- King A., Dickinson J. R.: Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*, 16, 499-506 (2000)
- 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, Schreier P. (ed) *Bioflavour'87*, Walter de Gruyter, Berlin, 287 (1988)
- Kofujita H., Asada Y., Kuwahara M.: Alkyl-aryl cleavage of phenolic  $\beta$ -O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*, *Mokuzai Gakkaishi*, 37, 555-561 (1991)
- Koga H., Yamaguchi E., Matsunaga K., Aramaki H., Horiuchi T.: Cloning and nucleotide sequences of NADH-putidaredoxin reductase gene (camA) and putidaredoxin gene (camB) involved in cytochrome P-450cam hydroxylase of *Pseudomonas putida*, *J. Biochem.*, 106(5), 831-836 (1989)
- Kokkalou E.: The Constituents of the essential oil from *Lavandula stoechas* growing wild in Greece, *Planta Med.*, 58-59 (1988)
- Krasnobajew V.: Terpenoids, Kieslich K (ed.) *Biotechnology*, Vol.6a, Verlag Chemie, Weinheim, 97 (1984)
- Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y.: Antifungal activity of components of essential oils, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 945-952 (1981)
- LaFever R. E., Croteau R.: Hydride shifts in the biosynthesis of the p-menthane monoterpenes  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene, and  $\beta$ -phellandrene, *Arch. Biochem. Biophysics.*, 301(2), 361-366, (1993)
- Langhoff S.: Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen, Dissertation Universität Hannover 2002
- Larsen T. O., Gareis M., Frisvad J. C.: Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common *Penicillia* on cheese agar, *J. Agric. and Food Chem.*, 50, 6148-6152 (2002)
- Lau P. C., Bergeron H., Labbé D., Brousseau R., Gibson D. T.: Sequence and expression of the todGIH genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1, *Gene*, 146(1), 7-13 (1994)
- Lau P. C., Wang Y., Patel A., Labbé D., Bergeron H., Brousseau R., Konishi Y., Rawlings M.: A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 94, 1453-1458 (1997)
- Lee S.-K., Lee S. B.: Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 270-275 (2001)
- Lehmann L. R., Stewart J. D.: Filamentous fungi: Potentially useful catalysts for the bihydroxylations of non-activated carbon centers, *Curr. Org. Chem.*, 5, 439-470 (2001)
- Lichtenthaler H. K., Schwender J., Disch A., Rohmer M.: Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway, *FEBS Lett.*, 400, 271-274 (1997)
- Liu J.-H., Steigel A., Reininger E., Bauer R.: Two new prenylated 3-benzoxepin derivatives as cyclooxygenase inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*, *J. Nat. Prod.*, 63, 403-405 (2000)
- Longhurst C., Baker R., Howse P. E.: Chemical crypsis in predatory ants, *Experientia*, 35, 870-872 (1979)
-

- Lund F., Skouboe P.: Identification of *Penicillium caseifulvum* and *P. commune* isolates related to specific cheese and rye bread factories using RAPD fingerprinting, *J. Food Mycol.*, 1(3), 131-139 (1998)
- Maarse H., Visscher C. A.: Volatile compounds in food, *Quantitative Data*, Vol. 4. (1985)
- Machuca A., Ferraz A.: Hydrolytic and oxidativ enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium, *Enzyme Microb. Technol.*, 29(6-7), 386-391 (2001)
- Madhyastha K. M., Bhattacharyya P. K.: Microbiological transformations of terpenes. XII. Fermentation of p-cymene by a soil pseudomonad (PL-strain), *Indian J. Biochem.*, 5(3), 102-111 (1968)
- Mars A. E., Gorissen J. P. L., van den Beld I., Eggink G.: Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 101-107 (2001)
- Martin D., Bohlmann J., Gershenzon J., Francke W., Seybold S. J.: A novel sex-specific and inducible monoterpene synthase activity associated with a pine bark beetle, the pine engraver, *Ips pini*, *Naturwissenschaften*, 90(4), 173-179 (2003)
- Marumo S., Hattori H., Katayama M.: Stemphol from *Pleospora herbarum* as a self-inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1521-1522 (1985)
- Masaphy S., Levanon D., Henis Y., Ventakateswarlu K., Kelly S.L.: Microsomal and cytosolic cytochrome P<sub>450</sub> mediated benzo [a] pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*, *Biotechnol. Lett.*, 17, 969-974 (1995)
- Matthews R. F., Braddock R. J.: Recovery and application of essential oil from oranges, *Food Technol.*, 41(1), 57-61 (1987)
- McCarthy M.-B., White R. E.: Functional differences between peroxidase compound I and the cytochrom P<sub>-450</sub> reactive oxygen intermediate, *J. Biol. Chem.*, 258 (15), 9153-9158 (1983)
- Mikami Y.: Microbial conversion of terpenoids, *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.*, 6, 271-320 (1988)
- Miller V. P., Tschirret-Guth R. A., de Montellano P. R. O.: Chloroperoxidase-catalyzed benzylic hydroxylation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 319(2), 333-340 (1995)
- Misra L. N., Husain A.: The essential oil of *Perilla ocimoides*: A rich source of rosefuran, *Planta Med.*, 53, 379-390 (1987)
- Miyazawa M., Nankai H., Kameoka H.: Biotransformation of acyclic terpenoids, (±)-*cis*-nerolidol and nerylacetone, by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*, *Phytochemistry*, 40(4), 1133-1137 (1995)
- Miyazawa M., Nankai H., Kameoka H.: Biotransformations of acyclic terpenoids, (±)-*trans*-nerolidol and geranylacetone by *Glomerella cingulata*, *J. Agri. Food Chem.*, 44, 1543-1547 (1996)
- Mockute D., Bernotiene G.: Five chemotypes of the essential oils of *Thymus pulegioides* L. growing wild, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, 6(3), 139-147 (2003)
- Moore R. N., Golumbic C., Fisher G. S.: Autoxidation of α-pinene, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 1173-1176 (1956) a
- Moore, R. N., Fisher, G. S.: Effect of strained rings on ultraviolet absorption spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4362-4 (1956) b
-

- Moore, R. N., Golumbic, C., Fisher, G. S.: Autoxidation of  $\alpha$ -pinene, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 1173-1176. (1956) a
- Mordi R. C.: Carotenoids: Functions and degradation, *Chem. Ind.*, 79-83 (1993)
- Muncnerova D., Augustin J.: Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review, *Bioresour. Technol.*, 48 (2), 97-106 (1994)
- Murdock D. I., Allen W. E.: Germicidal effect of orange peel oil and d-limonene in water and orange juice. 1. Fungicidal properties against yeast. *Food Technol.*, 14(9), 441-445 (1960)
- Näf R., Velluz A., Thommen W.: Isolation of a glucosidic precursor of damascenone from *Lycium halimifolium* Mil., *Tetrahedron Lett.*, 31(45), 6521-6522 (1990)
- Nair M. S. R., Anchel M.: Metabolic products of *Clitocybe illudens*. X. (+)-torreyol, *Lloydia*, 36, 106 (1973)
- Nair M. S. R., Takeshita M., McMorris T. C., Anchel M.: Metabolites of *Clitocybe illudens*. IV. Illudalic acid, a sesquiterpenoid, and illudinine, a sesquiterpenoid alkaloid, *J. Org. Chem.*, 34, 240-243 (1969)
- Narushima H., Omori T., Minoda Y.: Microbial transformation of  $\alpha$ -pinene, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 174-178 (1982)
- Nelson J. H.: Production of blue cheese flavor via submerged fermentation by *Penicillium roquefortii*, *J. Agric. Food Chem.*, 18, 567-569 (1970)
- Newman C. P.: Cymenol preparation by direct dehydrogenation, Patent 0565159A1, *Eur. Pat. Appl.* (1991)
- Nigam M. C., Nigam I. C., Levi L.: Essential oil and their constituents XXII. Detection of new trace components in oil of ginger, *Can. J. Chem.* 42, 2610-2615, (1964)
- Nishikawa M., Hagiwara H.: Steroids.VII. Microbiological oxidation of progesterone and  $17\alpha$ -hydroxycorticosterone by *Stemphylium botryosum*, *Yakugaku Zasshi*, 78, 1256-1258 (1958)
- Ohara K., Ujihara T., Endo T., Sato F., Yazaki K.: Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA, *J. Exp. Bot.*, 54(393), 2635-2642 (2003)
- Ohloff G.: Riechstoffe und Geruchssinn, Die molekulare Welt der Düfte, Springer Verlag, (1994)
- Onken J., Berger R. G.: Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*, *J. Biotechnol.*, 69(2), 163-168 (1999)
- Pan J. G., Xu Z. L., Zhao Z. Z., Tang X. J.: Chemical studies on essential oil from *Artemisia* species, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, (764) 17(12), 741-744 (1992)
- Pass G. J., McLean S., Stupans I., Davies N. W.: Microsomal metabolism and enzyme kinetics of the terpene p-cymene in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*) and rat, *Xenobiotica*, 32(5), 383-397 (2002)
- Pedersen L. H., Skouboe P., Boysen M., Soule J., Rossen L.: Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction, *Int. J. Food Microbiol.*, 35(2), 169-177, (1997)
- Pérez L. M., Pauly G., Carde J.-P., Berlingheri L., Gleizes M.: Biosynthesis of limonene by isolated chromoplasts from *Citrus sinensis* fruits, *Plant. Physiol. Biochem.*, 28, 221-229 (1990)
- Peterson D. H., Murray H.C.: Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1871-1872 (1952)
-

- Pfruder B., Tamm Ch.: Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis*, 2. Teil: Hydroxylierung von Fenchon und Isofenchon. *Helv. Chim. Acta*, 52, 1643 (1969)
- Phoenix P., Keane A., Patel A., Bergeron H., Ghoshal S., Lau P. C. K.: Characterization of a new solvent-responsive gene locus in *Pseudomonas putida* F1 and its functionalization as a versatile biosensor, *Environ. Microbiol.*, 5(12), 1309-1327 (2003)
- Pianzola M. J., Moscatelli M., Vero S.: Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay, *Plant Dis.*, 88, 23-28 (2004)
- Pieribattesti J. C., Smadja J., Mondon, J. M.: Composition of the essential oil of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) from Reunion, *Flavour Fragrance J.*, 18, 697-706 (1988)
- Pierre R. E., Millar R. L.: Histology of pathogen-suscept relationship of *Stemphylium botryosum* and alfalfa, *Phytopathology*, 55, 909-914 (1965)
- Pinheiro D. M.: Biotransformacao de terpenoids em compostos de aroma, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Dissertation, Unicamp Campinas, Brasil, (2004)
- Pitt J. I., Spotts R. A., Holmes R. J., Cruickshank R. H.: *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit, *Phytopathology*, 81(10), 1108-1112 (1991)
- Pitt J. I.: A laboratory guide to common *Penicillium* Species, 2<sup>nd</sup> ed. *CSIRO Division of Food Processing*, North Ryde, New South Wales, Australia (1988)
- Pitt J. I.: Toxigenic fungi: Which are important?, *Med. Mycol.*, 38(1), 17-22 (2000)
- Porter J. W., Spurgeon S.L.: Biosynthesis of isoprenoid compounds, Wiley, New York (1981)
- Poulose A. J., Croteau R.:  $\gamma$ -terpinene synthetase: A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 191(1), 400-411, (1978) a
- Poulose A. J., Croteau R.: Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 187(2), 307-314, (1978) b
- Rabe S.: In mouth flavour release from liquids simulation and validation matrix effects and mathematical modeling, Dissertation, Universität Hannover, 2003
- Reddy G. V., Kothari I. L., Mishra A., Patel C. R.: Biotransformation of banana waste into protein by *Pleurothus sajor-caju*, *Indian J. Exp. Biol.*, 38(8), 845-848 (2000)
- Reichert S., Fischer D., Asche S., Mosandl A.: Stable isotope labeling in biosynthetic studies of dill ether, using enantioselective multidimensional gas chromatography, online coupled with isotope ratio mass spectrometry, *Flavour Fragrance J.*, 15(5), 303-308 (2000)
- Reichert S., Mosandl A.: Stereoisomeric flavor compounds LXXXII dill ether and its stereoisomers: Synthesis and enantioselective analysis, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 22(11), 631-634 (1999)
- Rhoades D. F.: Evolution of plant chemical defense against herbivores, *Herbivores their interactions with secondary plant metabolites*, Academic Press, New York, 3-54 (1979)
- Rhyu H. Y.: Gas chromatographic characterization of sages of various geographic origins, *J. Food Science*, 44, 758-762 (1979)
- Rodriguez P. A., Eddy C.L.: Use of a two-dimensional gas chromatograph the organoleptic evaluation of an orange extract, *J. Chromatog. Sci.*, 24, 18-21 (1986)
- Rohdich F., Hecht S., Gartner K., Adam P., Kriege C., Amslinger S., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W.: Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH
-

(LytB) protein, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99, 1158-1163 (2002)

Ropp J. D., Gunsalus I. C., Sligar S. G.: Cloning and expression of a member of a new cytochrome P<sub>450</sub> family: Cytochrome P<sub>450</sub>lin (CYP111) from *Pseudomonas incognita*, *J. Bacteriol.*, 175(18), 6028-6037 (1993)

Roth L., Kormann K.: *Duftpflanzen Pflanzendüfte*, Ecomed vgg., Landsberg, (1996)

Rundberget T., Wilkins A.: Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 964, 189-197 (2002)

Ruzicka L., Eschenmoser A., Heusser H: The isoprene rule and biogenesis of terpenic compounds, *Experientia*, 9, 357 (1953)

Sakamura S., Ichihara A., Yoshihara T.: Toxins of phytopathogenic microorganisms. Structural diversity and physiological activity, *ACS Symposium Series (Bio. Act. Nat. Prod.: Potential Use Agric.)*, 380, 57-64 (1988)

Sakamura S.: Toxins of phytopathogenic microorganisms. Structural diversity and physiological activity, *Proceedings – Plant Growth Regulation Society of America*, 14, 186-191 (1987)

Samson R. A., Pitt J. I.: Phylogeny and species concepts in the *Penicillium aurantiogriseum* complex as inferred from partial beta-tubulin gene DNA sequences, integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Taylor and Francis Books Ltd, 189-198 (2000)

Schäfer S., Kaspera R., Krings U., Schrader J., Sell D., Berger R. G.: Sensorgestützte Biokonversion zur Gewinnung natürlicher terpenoider Aromastoffe, *Lebensmittelchemie*, 57 (1), 15 (2003)

Schmid C., Steinbrecher R., Ziegler H.: Partition coefficient of plant cuticles for monoterpenes, *Trees*, 6, 32-36 (1992)

Schrader J., Berger R. G.: Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds, *Biotechnology*, Ed. Rehm. Wiley-VHC, 10, 373-422 (2001)

Schreier P., Drawert F., Heindze I.: Quantitative composition of natural and technologically modified plants aroma. IX. Freeze concentration of an extrakt from fresh dill, *Z. Lebensm. Unters. Forschung A*, 172(4), 257-263 (1981)

Schulz B., Boyle C., Draeger S., Roemmert A.: Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites, *Mycol. Res.*, 106(9), 996-1004 (2002)

Scott P. M., Kennedy B. P., Harwig J., Chen Y. K.: Formation of diketopiperazines by *Penicillium italicum* isolated from oranges, *Appl. Microbiol.*, 28(5), 892-894. (1974)

Seifert K. A., Louise-Seize G.: Phylogeny and species concepts in the *Penicillium aurantiogriseum* complex as inferred from partial beta-tubulin gene DNA sequence, integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, *Taylor and Francis Books Ltd.UK*, 189-198 (2000)

Sejbold S. J., Bohlmann J., Raffa K. F.: Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis, *Can. Entomol.*, 132, 705-715 (2000)

Shukla O. P., Bhattacharyya P. K.: Microbiological transformation of terpenes: Part XI- Pathway of degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinen in a soil pseudomonad (PL strain), *Indian J. Biochem.*, 5(3), 92-101 (1968)

---

Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B.: Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *J. Biol. Chem.*, 669 (11), 8022-8028 (1994)

Singh G., Kapoor I. P. S., Kaur J., Singh O. P., Vernwal S. K., Yadav R. S. S., Rao G. P., Sharma S. R., Leclercq P. A., Klinkby N.: Biotransformation of *Citrus sinensis* peel oil and commercial limonene by various fungi and *Musa paradisiaca* stem enzyme extract, *J. Med. Aromat. Plant Sci.*, 24(1), 23-27 (2002)

Sinha R. K. P., Prasad Y., Mahamod M.: *Stemphylium botryosum* Wagr. On *Vicia faba*: A new host record from India, *Indian J. Plant Pathol.*, 6, 147 (1988)

Sivrikaya H., Bacak L., Saracbaşı A., Toroğlu I., Eroğlu H.: Trace elements in *Pleurotus sajor-caju* cultivated on chemithermomechanical pulp for bio-bleaching, *Food Chem.*, 79, 173-176 (2002)

Skouboe P., Frisvad J. C., Taylor J. W., Lauritsen D., Boysen M., Rossen L.: Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the IST region of terverticillase *Penicillium* species, *Den Mycolog. cal. Research.*, 103(7), 873-881 (1999)

Solfrizzo M., Strange R. N., Sabia C., Visconti A.: Production of a toxin stemphol by *Stemphylium* species, *Nat. Toxins*, 2, 14-18 (1994)

Speelmans G., Bijlsma A., Eggink, G: Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 50(5), 538-544 (1998)

Sprecher E., Hanssen H.- P.: Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen – Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen, *Forum Mikrobiologie*, 8, 17-21 (1985)

Streith J., Prinzenbach H., Schill G.: *Organic Synthesis an Interdisciplinary Challenge*, Blackwell Scientific Publications: Oxford, 215-226 (1985)

Stumpf B., Abraham W. R., Kieslich K., unpublished results (1983)

Sundaramoorthy M., Terner J., Poulos T.: The crystal structure of chloroperoxidase: A heme peroxidase-cytrchrome P<sub>450</sub> functional hybrid, *Structure*, 3(12), 1367-1377 (1995)

Takeoka G. R., Guenther M., Flath R. A., Wurz R. E., Jennings S. W.: Volatile constituent of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.), *J. Agric. Food Chem.*, 34(3), 576-578 (1986) a

Takeoka G. R., Guenther M., Smith S. L., Jennings S. W.: Changes in aroma concentration during storage, Bioengener. Aromas , *ACS Symposium*, 317 Biogener. Aromas, 65-74 (1986) b

Tashpulatov Z., Teslinova N. A., Imamova T.: Choice of optimal medium for growth of fungi and biosynthesis of active cellulolytic enzymes, *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*, 17(1) 47-49 (1973)

Taubert J., Krings U., Berger R. G.: A comparative study on the disintegration of filamentous fungi, *J. Microbiol. Methods*, 42, 225-232 (2000)

Teunissen M. J., De Bont J. A. M.: Will terpenes be of any significance in future biotechnology?, *Bioflavour`95*, Editions INRA, Dijon, 329-337 (1995)

Thappa R. K., Agarwal S. G., Kapahi B. K., Srivastava T.N.: Chemosystematics of the Himalayan *Elsholtzia*, *J. Essent. Oil Res.*, 11, 97-103 (1999)

Torp M., Skaar I.: Fungi in waste food for feed-occurrence and potential mycotoxin production, preliminary results, *Husdyrsforsøksmøtet*, Aas, Norway, 272-275 (1998)

Toskueva E. P., Araviiskii R. A , Efimova T. P. Cytophysiology of *Penicillium solitum*: A producer of lipase, *Antibiot. Khimioter.*, 33(9), 647-650. (1988) a

- Toskueva E. P.: Localization and dynamics of Lipase accumulation in hyphae of *Penicillium solitum*., *Antibiot. Khimioter.*, 33 (7), 499-502. (1988) b
- Trapp S. C., Croteau R. B.: Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications, *Genetics*, 158, 811-832 (2001)
- Trillini B., Ricci A., Pelegrino R.: Secretion constituents of leaf glandular trichomes of *Salvia officinalis* L., *J. Essent. Oil Res.*, 11(5), 565-569 (1999)
- Trudgill P. W.: Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes, *Biochemistry of Microbial Degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 33-61 (1994)
- Trudgill P. W.: Terpenoid metabolism by *Pseudomonas*, Sokatch J.R. (ed) *The Bacteria, a treatise on structure and function*, vol. X, Academic Press, Orlando, 483 (1986)
- Turlings T. C. J.: Lengwiler U.B., Bernasconi M.L., Wechsler D.: Timing of induced volatile emissions in maize seedlings, *Planta*, 207, 146-152 (1998)
- Turner G., Gershenzon J., Nielson E. E., Froehlich J. E., Croteau R.: Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells, *Plant Physiol.*, 120(3), 879-886 (1999)
- Unger B. P., Gunsalus I. C., Sligar S. G.: Nucleotide sequence of the *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam gene and its expression in *Escherichia coli*, *J. Biological Chem.*, 261(3), 1158-1163. (1986)
- Uribe S., Pena A.: Toxicity of alleopathic monoterpene suspensions on yeast, dependence on droplet size, *J. Chem. Ecol.*, 16, 1399-1408 (1990)
- Valenzuela-Zapata A. G.: The tequila industry in Jalisco, Mexico, *Desert Plants*, 7(2), 65-70 (1985)
- Van der Vlugt-Bergmans, Cecile J. B., Van der Werf, M. J: Genetic and biochemical characterization of a novel monoterpene  $\epsilon$ -lactone hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14., *App. Environ. Microbiol.*, 67(2), 733-741 (2001)
- Van der Werf M. J., Bont A. M.: Metabolism of carveol and dihydrocarveol in *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *Microbiology*, 146, 1129-1141 (2000)
- Van der Werf M. J., de Bont J. A. M., Leak D.J.: Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 55, 147-177 (1997)
- Van der Werf M. J., Van der Ven C., Barbirato F., Eppink Michel H. M., De Bont J. A. M., Van Berkel W. J. H.: Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL 14. A novel nicotinoprotein belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily, *J. Biol. Chem.*, 274, 26296-26304 (1999)
- Van Dyk M. S., Van Rensburg E., Moleki N.: Hydroxylation of (+)-limonene, (-)- $\alpha$ -pinene and (-)- $\beta$ -pinene by a *Hormonema* sp., *Biotechnol. Lett.*, 20, 431-436 (1998)
- Van Keulen F., Correia C. N., da Fonseca M. M. R.: Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*, *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 5(1-4), 295-299 (1998)
- Van Rensburg E., Moleleki N., Van der Walt J. P., Botes P. J., VanDyk M.S.: Biotransformation of (+) limonene and (-) piperitone by yeasts and yeast-like fungi, *Biotechnol. Lett.*, 19, 779-782 (1997)
- Varela E., Guillen F., Martinez A. T., Martinez M. J.: Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: Purification and characterization of the recombinant enzyme, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1546(1), 107-113 (2001)
-

Veddeler B.: Biotransformation Terpenoider Substrate mit Mikroorganismen, Dissertation Universität Hannover, 2003

Vera R. R., Chane-Ming J., Fraisse D. J.: Chemical composition of the essential oil of sage (*Salvia officinale* L.) from Reunion Island, *J. Essential Oil Res.*, 11(4), 399-402 (1999)

Vera R. R., Chane-Ming J.: Chemical Composition of essential oil of dill (*Anethum graveolens* L.) growing in Reunion Island, *J. Essent. Oil Res.*, 10(5), 539-542 (1998)

Voishvillo N. E., Akhrem A. A., Titov Y. A.: Transformation of terpenes by microorganism, *Appl. Biochem. Micro.*, 6, 409-418, (1970)

Vyas B. R. M., Bakowski S., Sasek V., Matucha M.: Degradation of anthracene by selected white rot fungi, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 14, 65-70 (1994)

Weber F. J., Isken S., de Bont J. A. M.: *cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene, *Microbiology*, 140(8), 2013-2017 (1994)

Weber L., Doerre M., Repp H. D., Stottmeister U., Haufe G.: Microbial oxidation of  $\alpha$ -pinene with *Acetobacter methanolicus*, *Zeitschrift für Chemie*, 28(3), 98-99 (1988)

White R. E., McCarthy M. B.: Active site mechanics of liver microsomal cytochrome P<sub>450</sub>, *Arch. Biochem. Biophys.*, 46(1), 19-32. (1986)

White R. E., McCarthy M.-B., Egeberg K. D., Sligar S. G.: Regioselectivity in the cytochromes P<sub>450</sub>: Control by protein constraints and by chemical reactivities, *Arch. Biochem. Biophys.*, 228(2), 483-502 (1984)

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA, 315-322 (1990)

Winterhalter P.: Oxygenated C<sub>13</sub>-norisoprenoids. Important flavor precursors, *ACS Symposium Series*, 490 (Flavor Precursors), 98-115 (1992)

Wojtas-Wasilewska M., Trojanowski J., Luterek J.: Biotransformation of sodium lignosulfonates of different molecular weights by the fungus *Pleurotus ostreatus*, *Acta Microbiol. Pol.*, 29(4), 353-364 (1980)

Wolken W. A. M., Tramper J., Van der Werf M. J.: Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*, *Biotechnol. Bioeng.*, 80(6), 685-690 (2002)

Wood B. J. B.: Microbial fermentation of lower terpenoids, *Process Biochem.*, 1969(2), 50-52 (1969)

Wright S. J., Caunt P., Carter D., Baker P. B.: Microbial oxidation of  $\alpha$ -pinene by *Serratia marcescens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 224-227 (1986)

Yamada N, Ito M., Honda G.: Linalool synthase from *Perilla frutescens*, cloning and functional expression, (2001) unpublished

Yuba A., Honda G., Koezuka Y., Tabata M.: Genetic analysis of essential oil variants in *Perilla frutescens*, *Biochem. Genet.*, 33, 341-348 (1995)

Yuba A., Yazaki K., Tabata M., Honda G., Croteau R.: cDNA cloning, characterization and functional expression of 4S-(+)-limonene synthase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 332, 280-287 (1996)

Zagulyaeva Z. A.: Influence of acidity on fungi growth on paper, *Stareni Bum.*, 75-81 (1965)



Zaraiskaya E. N., Borisyuk Y. G., Khar'kov T.: Essential oil of the seeds of dill (*Anethum graveolens*), *Biol. Khim.*, 1,14095, 190-193 (1957)

Zhdanova N. N., Borisyuk L. G., Artzatbanov V. Y.: Occurrence of the K type of life strategy in some melanin-containing fungi under experimental conditions, *Folia Microbiol. (Prague)*, 35, 423-430 (1990)

Zhdanova N. N., Stepanichenko N. N., Vasilevskaya A. I., Navrezova N. S., Tyshenko A. A., Mukhamedzhanov S. Z., Aslanov K. A.: Nature of melanin pigments of fungi from the genus *Cladosporium* Link ex Fries and *Stemphylium* Wallroth, *Mikrobiologicheskii Zhurnal*, 47(6), 43-50 (1985)

Ziegler E., Ziegler H.: *Flavourings*, Wiley-VCH, Weinheim (1998)



















Zorn H., Berger R. G.: Flavours and fragrances from plants, *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*, 323-346 (2002)

Zorn H., Neuser F., Berger R. G.: Degradation of  $\alpha$ -pinene oxide and [2H7]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761, *J. Biotechnol.*, 107(3), 255-263 (2004)


















---



Tab. 6.1. Transformation von  $\alpha$ -Pinen mit ausgewählten Kulturen (Gehalte in mg L<sup>-1</sup>) Fortsetzung

	Verbenol	Verbenon	Myrtenol	Myrtenal	Pinocarvon	Pinocarveol	Sobrerol	Piperiton	p-Menta-1,5-dien-8-ol	Fenchol	Fenchon	$\alpha$ -Terpineol	p-Cymen-8-ol	iso-Pinocamphon	Pinandiol	3-Pinanon	p-Mentha-2,8-dien-1-ol
																	
<i>Cunninghamella echinulata</i> CEC 1905	<0,1	0,8	0,4	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat aus Ingwer (LCI)	33,1	12,3	7,0	-	-	12,1	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-
Isolat aus Salbei	20,1	3,9	2,0	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat aus Walnuss	11,5	10,9	3,2	-	-	3,2	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lepista irina</i> CBS 458,79	-	12,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium solitum</i> CBS 424,89	0,3	21,9	4,0	-	-	2,4	-	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium solitum</i> Selbstisolat	15,7	2,7	5,3	-	-	9,5	-	-	-	0,3	-	12,0	-	3,5	-	-	-
<i>Pleurotus flabellatus</i> CBS 665,85	-	8,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus lampas</i> CBS 323,49	1,3	3,6	-	-	0,3	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> DSMZ 1020	-	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thelebolus caninus</i> CBS 710,69	11,9	2,6	0,7	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Wolfiporia cocos</i> CBS 279,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	-	-	-	-

Tab. 6-2 Transformation von  $\beta$ -Pinen mit ausgewählten Kulturen (Gehalte in mg L<sup>-1</sup>)

	Epoxylinolol	Perillen	Artemisiaketon	Artemisiaalkohol	iso-Thujol	Furan, Tetrahydro-2,2-Dimethyl-5-(1-Methylpropyl)	Linalool	Geraniol	Myrcenol	Perillaalkohol	p-Mentha-1(7),8(10)-en-9-ol	p-Mentha-8-(10)-en-7-ol	Fenchol	iso-Pulegol	Amitinol	Borneol
																
chemischer Blindwert	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RI	1893	1389	1515	1590	1955	1375	1486	1715	-	1825	1766	1532	1532	1704	1550	1599
RI St.	-	-	-	-	-	-	1492	1720	-	1838	-	-	1522	-	-	1608
<i>Aspergillus niger</i> DSMZ 737	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> DSMZ 877	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,8	0,7	-	-	-	-
Isolat aus Pfeffer	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat aus Salbei	10,1	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat aus Walnuss	8,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lepista irina</i> CBS 458,79	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> DSMZ 1197	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,80	-
<i>Penicillium solitum</i> Selbstisolat	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-





---

# Lebenslauf

Bianca Brauer

geboren am 15. Mai 1975 in Oberhausen

## Ausbildung und Studium

Seit 01/01	Dissertation Promotion im Bereich Biotechnologie der Aromen Assistentin am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover
04/99-09/00	Diplomarbeit, Abschluss Molekularbiologie, Assistentin am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik
1994	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität-Bochum
1985-1994	Heinrich Böll Gesamtschule in Oberhausen, Allgemeine Hochschulreife

## Berufliche Erfahrung

10/02	Gastdozentin an der Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Depto. de Ciencia de Alimentos
05/99	Ruhr-Universität-Bochum, Tutorentätigkeit
09/98	Auslandspraktikum : Bati Akdeniz Ormancilik, Antalya, Türkei Umweltinstitut/Ministerium für Forstwirtschaft
06/98	Bayer AG, Leverkusen, Umweltschutz/ Mikrobiologie, Werkstudententätigkeit
10/89	Ruhr-Universität-Bochum, Tutorentätigkeit
05/98	Ruhr-Universität Bochum, Studentenbetreuung im Rahmen eines Praktikums am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie
02/98	Bayer AG, Leverkusen, Umweltschutz/Mikrobiologie
10/97	Ruhr-Universität-Bochum, Tutorentätigkeit
03/97	Silesia Gerhard Hanke GmbH und Co. KG, Neuss, Forschung, Analytik, Biotechnologie
10/96	Milchhof Essen, Chemisch/ Mikrobiologisches Laboratorium Lebensmittelkontrolle
03/96	Ruhrverband Essen, Chemisch/ Biologisches Laboratorium
09/95	Celanese (Hoechst AG), Werk Ruhrchemie, Produktkontrolle
03/95	Celanese (Hoechst AG), Werk Ruhrchemie, Analytisches Labor

Hannover, 29.06.04

---