

Terpenbiotransformation durch Enzyme aus Basidio- und Ascomyceten

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

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemiker

Björn Hardebusch

geboren am 22. Dezember 1976 in Meschede

2006

Referent:	Prof. Dr. Dr. R. G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. Holger Zorn
Tag der Promotion:	01.12.2006
Datum der Veröffentlichung:	Dezember 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2003 bis Juni 2006 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt 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.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Zorn und Herrn Dr. Ulrich Krings für die stete Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und Tipps während und am Ende dieser Forschungsarbeit.

Desweiteren gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, insbesondere meinem Laborkollegen Herrn Henning Bouws.

Herrn Mario Maróstica Jr. danke ich für die gute Zusammenarbeit während seines Forschungsaufenthaltes bei den Arbeiten an der Farnesenbiotransformation.

Frau Elena Knispel-Ballhardt danke ich für die Unterstützung bei den Arbeiten mit *Marasmius scorodonius*.

Herrn Dr. Dieter Albert danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen und die Hilfe bei der Spektreninterpretation.

Frau Inge Reupke danke ich für die Herstellung der Lyophilisate.

Letztendlich danke ich Katharina für die moralische Unterstützung, ihre Liebe und Zuwendung während der Anfertigung dieser Arbeit.

für meine Eltern

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biotransformation terpenoider Substrate mit ausgewählten Basidio- und Ascomyceten in unterschiedlichen Transformationsansätzen untersucht.

Das Monoterpen α -Pinen wurde hierbei zu den aromaaktiven Verbindungen Verbenol und Verbenon oxidiert. Aus fünf vorselektionierten Pilzen stellte sich *Pleurotus sapidus* als der effektivste heraus. In drei verschiedenen Transformationssystemen (Submerskultur, konzentrierte Biofeuchtmasse („Hochzelldichte“) und Lyophilisate) wurden mit diesem Basidiomyzeten die höchsten Produktausbeuten erzielt. Bei Verwendung der Lyophilisate wurden Konzentrationen von 155 mg L^{-1} an (*E*)-Verbenol sowie 60 mg L^{-1} Verbenon erreicht. Die Transformation fand dabei im Vergleich zur Submerskultur und den konzentriertem Pilzmyzel in wesentlich kürzerer Zeit mit Ausbeuten von 1,5 mol% Verbenol bzw. 0,6 mol% Verbenon statt. *Pleurotus eryngii* konnte Verbenol zu Verbenon mit einer Umsatzrate von 75 mol% oxidieren. Die Transformation fand hierbei sowohl in Submerskultur als auch mit Lyophilisaten statt. Die Lyophilisate zeigten hier die besseren Ergebnisse. Durch die Kombination aus Lyophilisaten von *P. sapidus* und *P. eryngii* wurde die Biotransformation von α -Pinen auf 183 mg L^{-1} Verbenol gesteigert und mit 126 mg L^{-1} deutlich zum Verbenon hin verschoben werden.

Bei der Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen konnten aromaaktive Verbindungen, wie 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen mit Gehalten von bis zu 60 mg L^{-1} erhalten werden. Ein von der Mangoschale isolierter und als *Aspergillus niger* identifizierter Pilz zeigte mit konzentrierten Zellmassen zudem die Bildung von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, einem neuen Naturstoff mit fruchtig, aprikosenartigem Geruch mit Ausbeuten bis zu 25 mg L^{-1} . Weitere vermutliche Strukturisomere dieser Verbindung wurden anhand der identischen Massenspektren identifiziert. Lyophilisierte Kulturen zeigten ebenfalls eine Bildung von 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen. Allerdings wurden hier nur Ausbeuten von 30 mg L^{-1} erreicht und *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol in keinem der untersuchten Ansätze detektiert.

Die Spaltung von ausgewählten Carotinoiden durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* führte zur Bildung einer Vielzahl aromaaktiver Verbindungen oder deren Vorstufen. So konnten β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral und 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon aus der Spaltung von β,β -Carotin detektiert werden. Aus der Spaltung von Lutein, Zeaxanthin, Neoxanthin und Violaxanthin gingen 3-Hydroxy- α -ionon, 3-Hydroxy- β -ionon, 3-Hydroxy- β -cyclocitral und 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid hervor. Die Ausbeute an flüchtigen Verbindungen aus der Spaltung von β,β -Carotin betrug bis zu 20 mol%. Es konnten auch nicht-flüchtige Verbindungen, wie β -Apo-10'-carotinal, β -Apo-12'-carotinal und β -Apo-14'-carotinal detektiert werden, daneben noch β -Carotin-5,6-epoxid. Die Apocarotinal β -Apo-8'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal wurden ebenfalls durch die Peroxidase gespalten und aromaaktive Verbindungen identifiziert, was auf einen weiteren Abbau potentieller primärer Spaltprodukte hindeutet. Die Spaltung fand ohne Zusatz von H_2O_2 statt. Durch die Zugabe konnte die Enzymaktivität und damit der Abbau der Carotinoide aber deutlich gesteigert werden.

Schlagwörter: Biotransformation, Terpene, Pilze, Lyophilisate, *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, *Marasmius scorodonius*, Carotinoidspaltung

Abstract / Summary

Biotransformation of terpenoids with selected basidio- and ascomycetes using different transformation assays was carried out.

α -Pinene was oxidized to the flavour active components verbenol and verbenone. Out of five preselected fungi the transformation with *Pleurotus sapidus* was the most effective. In three different transformation systems (submerged culture, high density cultivation and lyophilisates) the highest product yields were achieved using this fungus. Product yields of up to 155 mg L⁻¹ (*E*)-verbenol and 60 mg L⁻¹ verbenone were achieved by using lyophilised mycelium. Compared with submerged and concentrated culture the transformation was much faster and yielded up to 1,5 mol% verbenol and 0,6 mol% verbenone. *Pleurotus eryngii* converted verbenol to verbenone with a conversion rate of 75 mol%. Submerged cultures and lyophilisates of this fungus performed this oxidation and lyophilisates showed the best results. The sequential combination of lyophilisates from *P. sapidus* and *P. eryngii* improved the biotransformation of α -pinene to 183 mg L⁻¹ verbenol and 126 mg L⁻¹ verbenone compared to *P. sapidus* alone.

The biotransformation of the sesquiterpene farnesene yielded flavour active compounds, such as 7-(*E*)-hydroxyfarnesene in a concentration of up to 60 mg L⁻¹. Concentrated cell mass from *Aspergillus niger*, isolated from mango peel, produced *p*-menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, a new natural compound with a fruity, apricot-like flavour with product yields up to 25 mg L⁻¹. At least five structural isomers of this compound were identified by comparing the mass spectra. With lyophilised cultures 7-(*E*)-hydroxyfarnesene was also formed in yields of up to 30 mg L⁻¹. The cleavage of selected carotenoids with crude peroxidases of *Marasmius scorodoni* lead to several flavour active compounds or their precursors. β -Ionone, dihydroactinidiolide, β -cyclocitral and 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone were detected from the cleavage of β,β -carotene. Cleavage of lutein, zeaxanthin, neoxanthin and violaxanthin resulted in 3-hydroxy- α -ionone, 3-hydroxy- β -ionone, 3-hydroxy- β -cyclocitral and 3-hydroxy- β -ionone-5,6-epoxide. The yield of volatile flavour compounds from the cleavage of β,β -carotene reached up to 20 mol%.

Non-volatile compounds, such as β -apo-10'-carotenal, β -apo-12'-carotenal and β -apo-14'-carotenal, and β -carotene-5,6-epoxide were also identified. The apo-carotenals β -apo-8'-carotenal and β -apo-12'-carotenal were also cleaved by the peroxidases and flavour active volatile compounds were identified. This shows further degradation of primary cleavage products of β,β -carotene. Cleavage did not require the addition of H₂O₂. Adding hydrogenperoxide, however, resulted in higher enzyme activity and therefore faster carotenoid degradation.

Keywords: biotransformation, terpenes, fungi, lyophilisates, *p*-menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, *Marasmius scorodoni*, carotenoid cleavage

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Fraatz M, Hardebusch B, Krings U, Berger RG, Zorn H (2006) Oxyfunktionalisierung von α -Pinen. Lebensmittelchemie 60(3):63-64

Krings U, Hardebusch B, Albert D, Berger RG, Maróstica M Jr, Pastore GM (2006) Odour active alcohols from the fungal transformation of α -farnesene. J Agric Food Chem 54(24):9079-9084

Linke D, Zorn H, Gerken B, Hardebusch B, Parlar H, Berger RG (2005) Isolierung aktiver Enzyme mittels präparativer Zerschäumung. Lebensmittelchemie 59(1):16

Krings U, Hardebusch B, Hapetta D, Berger RG, Marostica Jr MR, Patore GM
Citrus oils: Renewable sources of attractive bioaromas. SLCA, November 4 to 11, 2005, Campinas, Brazil

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Zielsetzung	4
2 ERGEBNISSE	6
2.1 Biotransformation des Monoterpens α-Pinen	6
2.1.1 Auswahl der Mikroorganismen.....	6
2.1.2 Produktion der Biomasse und Gewinnung des lyophilisierten Pilzmyzels.....	6
2.1.3 Zielprodukte der Biotransformation	7
2.1.4 Autoxidation von α -Pinen	8
2.1.5 Identifizierung von Transformationsprodukten.....	8
2.1.6 Transformation in Submerskultur	10
2.1.7 Transformation mit konzentrierter Biofeuchtmasse	11
2.1.8 Umsetzung mit lyophilisiertem Pilzmyzel	13
2.1.9 Vergleich der Effizienz der Transformationsansätze am Beispiel von <i>Pleurotus sapidus</i>	15
2.1.10 Oxidation von (Z)-Verbenol mit <i>Pleurotus eryngii</i>	17
2.1.11 Umsetzung von α -Pinen mit Lyophilisaten von <i>P. sapidus</i> und <i>P. eryngii</i>	20
2.1.12 Teilzusammenfassung	21
2.2 Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen	22
2.2.1 Eingesetzte Mikroorganismen.....	22
2.2.2 Identifizierung der Transformationsprodukte des Farnesens	23
2.2.2.1 Vergleich der Transformationsprodukte mit Referenzsubstanzen	23
2.2.2.2 Sensorische Analyse der Transformationsprodukte.....	23
2.2.2.3 Identifizierung der Oxidationsprodukte	24
2.2.2.4 Silylierungen	30
2.2.2.5 Untersuchungen zur Stereochemie	30

2.2.2.6 Stabilität der Transformationsprodukte.....	32
2.2.3 Biotransformation mit konzentriertem Pilzmyzel.....	33
2.2.4 Biotransformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel.....	37
2.2.5 Teilzusammenfassung	38
2.3 Spaltung von Carotinoiden mit Peroxidasen aus <i>Marasmius scorodoni</i>.....	39
2.3.1 Die Spaltung ausgewählter Substrate.....	39
2.3.1.1 Extraktion der Xanthophylle aus Spinat.....	41
2.3.1.2 Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin mittels semi-präparativer HPLC	41
2.3.1.3 Produktidentifizierung und Quantifizierung.....	42
2.3.2 Produktion von Peroxidasen durch Lignininduktion im Bioreaktor.....	43
2.3.3 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten in wässriger Lösung	43
2.3.4 Umsetzung von Carotinoiden mit konzentriertem Enzymüberstand.....	44
2.3.4.1 Quantifizierung des enzymatischen Abbaus	45
2.3.4.2 Identifizierung der flüchtigen Spaltprodukte mittels GC-FID und GC-MS	46
2.3.4.3 Isolierung von DHA und Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses	50
2.3.4.4 Analytik der nicht-flüchtigen Spaltprodukte mittels HPLC-DAD	52
2.3.4.5 Identifizierung der nicht-flüchtigen Spaltprodukte mittels HPLC-MS.....	54
2.3.5 Enzymisolierung.....	58
2.3.6 Aktivitätssteigerung der Peroxidasen durch Zugabe von H ₂ O ₂	60
2.3.7 Vergleich der Umsetzung von β,β -Carotin mit Tween80 und Triton X-100	61
2.3.8 Umsetzung von β,β -Carotin mit gereinigten Peroxidasen aus <i>Marasmius scorodoni</i>	62
2.3.9 Teilzusammenfassung	63
3 DISKUSSION	64
3.1 Terpene und Norisoprenoide als Aromastoffe und Aromaprecusoren.....	64
3.1.1 Bedeutung und Vorkommen von Terpenoiden und Norisoprenoiden.....	64
3.1.2 Terpenbiosynthese aus Isopreneinheiten	65
3.1.3 Physiologische Bedeutung.....	67
3.1.4 Terpenbiotransformationen	68
3.1.4.1 Vorteile der biotechnologischen Produktion von Aromastoffen.....	68
3.1.4.2 Geeignete Enzymsysteme und wichtige Reaktionen	69

3.1.5 Problematik bei der Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen.....	73
3.1.5.1 Empfindlichkeit der eingesetzten Substrate	73
3.1.5.2 Geringe Wasserlöslichkeit der Terpene	74
3.1.5.3 Toxizität von Terpenen und Terpenoiden.....	75
3.1.5.4 Kulturführung und Haltbarkeit der Biokatalysatoren.....	75
3.2 Biotransformation des Monoterpens α-Pinen	76
3.2.1 Transformationsleistung ausgewählter Mikroorganismen	76
3.2.2 Transformationsmöglichkeiten durch Mikroorganismen	77
3.2.3 Erhöhung der Produktausbeute durch Zellkonzentrate und Lyophilisate	80
3.2.3.1 Transformation mit erhöhter Biofeuchtmasse.....	80
3.2.3.2 Gefriergetrocknete Kulturen.....	81
3.2.4 Oxidation von (Z)-Verbenol durch <i>Pleurotus eryngii</i>	83
3.3 Biotransformation von Farnesen.....	85
3.3.1 Mikrobielle Transformationen von Farnesen.....	85
3.3.2 Biotransformation durch <i>Aspergillus niger</i> (Isolat von Mango)	87
3.3.3 <i>p</i> -Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol - ein neuer Naturstoff	90
3.4 Spaltung von Carotinoiden durch Peroxidasen aus <i>Marasmius scorodoni</i>.....	92
3.4.1 Auswahl der zur Spaltung eingesetzten Substrate	92
3.4.2 Aufgaben und Funktion von Peroxidasen in höheren Pilzen	93
3.4.3 Selektiv carotinoidspaltende Enzyme	95
3.4.3.1 Selektiv carotinoidspaltende Monooxygenasen	95
3.4.3.2 Selektiv carotinoidspaltende Dioxygenasen.....	97
3.4.3.2 Apocarotinoid-spaltende Enzyme.....	101
3.4.3.3 Carotinoidspaltung durch Peroxidasen aus <i>Marasmius scorodoni</i>	102
3.4.4 Apocarotinale als Vorstufen von Aromastoffen.....	105
4 AUSBLICK.....	107
5. MATERIAL UND METHODEN	109
5.1 Verwendete Mikroorganismen	109
5.1.1 Kommerziell erhältliche Mikroorganismen	109

5.1.2 Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate).....	110
5.2 Chemikalien	111
5.2.1 Bestandteile der Kulturmedien	111
5.2.2 Standardsubstanzen und Substrate.....	112
5.2.3 Sonstige Chemikalien	113
5.2.4 Lösungsmittel	114
5.2.5 Gase.....	115
5.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel	115
5.3.1 Verwendete Geräte und Hilfsmittel	115
5.3.2 Bioreaktor	116
5.4 Kultivierung von Transformationskulturen	117
5.4.1 Kulturmedien	117
5.4.1.1 SNL-H-Standardnährmedium (nach Sprecher und Hanssen, 1982).....	117
5.4.1.2 SNL-H-Agar	117
5.4.1.3 SNL-H-Agar mit β,β -Carotin.....	118
5.4.2 Kulturführung.....	118
5.4.2.1 Stammkultivierung	118
5.4.2.2 Homogenisieren von Kulturen	118
5.4.2.3 Vorkulturen.....	118
5.4.2.4 Hauptkulturen	118
5.4.2.5 Glucosearme Kulturführung.....	119
5.4.2.6 Kulturführung im Bioreaktor	119
5.4.3 Herstellung von Lyophilisaten	119
5.4.4 Herstellung der konzentrierten Kulturen (Farnesendosierung).....	120
5.5 Dosierung von Transformationssubstraten	121
5.5.1 Dosierung von α -Pinen	121
5.5.1.1 Submerskultur.....	121
5.5.1.2 Konzentrierte Kulturen	121
5.5.1.3 Lyophilisate	121
5.5.1.4 Kontrollwerte	121

5.5.2 Dosierung von (Z) - Verbenol (<i>Pleurotus eryngii</i>)	122
5.5.2.1 Submerskultur.....	122
5.5.2.2 Transformation mit Kulturüberstand und Myzel.....	122
5.5.2.3 Transformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel.....	122
5.5.3 Dosierung von Farnesen.....	122
5.5.3.1 Konzentrierte Kulturen	122
5.5.3.2 Lyophilisate (Mikroansätze).....	122
5.6. Bestimmung von Kulturparametern	123
5.6.1 Feuchtmasse.....	123
5.6.2 Trockenmasse nach Gefriertrocknung.....	123
5.6.3 Glucosegehalt	123
5.6.4 Bestimmung des pH-Wertes	123
5.6.5 Prüfung auf Wasserstoffperoxid.....	123
5.6.6 Prüfung auf Kontamination.....	123
5.7 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie.....	124
5.7.1 Extraktion von Kulturüberständen	124
5.7.2 Extraktion der Biofeuchtmasse	124
5.7.3 Extraktion von Lyophilisaten	124
5.7.4 Extraktion des gesamten experimentellen Ansatzes (Farnesen)	124
5.7.5 Mikroextraktion	124
5.8 Chromatographie.....	125
5.8.1 Bestimmung von Geruchsaktivitäten und Geruchsschwellen.....	125
5.8.2 Silylierung für die Gaschromatographie.....	125
5.8.3 Probenaufreinigung an Kieselgel	126
5.8.4 Kapillargaschromatographie	126
5.8.4.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID).....	126
5.8.4.2 HRGC mit Split-Splitless-Injektion und FID für silylierte Proben und Carotinoidabbau..	127
5.8.4.3 HRGC mit On-Column-Injektion zur chiralen Trennung	127
5.8.4.4 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktometrischer Detektion (GC-O)	128
5.8.4.5 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)	128
5.8.4.6 Präparative Gaschromatographie.....	129

5.8.4.7 Berechnung der Kovats - Indizes	130
5.8.4.8 Berechnung des Enantiomerenüberschusses ee.....	130
5.8.5 Hochleistungsflüssigchromatographie	131
5.8.5.1 HPLC-DAD.....	131
5.8.5.2 Semipräparative HPLC	131
5.8.5.3 HPLC-MS (Kopplung mit Massenspektrometer)	132
5.9 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	133
5.9.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)	133
5.9.2 Gelfiltrationschromatographie (GFC).....	133
5.10 UV/VIS-Spektroskopie.....	134
5.11 NMR-Spektroskopie	134
5.12 Enzymreinigung.....	135
5.12.1 Aktivitätsbestimmung	135
5.12.1.1 Herstellung einer wässrigen β,β -Carotinlösung	135
5.12.1.2 Herstellung von Natriumacetat-Puffer	135
5.12.1.3 Enzymtest.....	135
5.12.2 Konzentrierung von Kulturüberstand aus <i>Marasmius scorodonius</i> mittels VivaFlow 200	136
5.12.3 Proteinbestimmung nach Lowry.....	136
5.12.4 Enzymreinigung mittels IEX (Scheibner, 2006, mod.)	137
5.12.5 Enzymreinigung mittels GFC (Scheibner, 2006, mod.).....	137
5.12.6 Bestimmung der Enzymkinetik für MSP2.....	137
5.12.7 Überprüfung der Reinigung mittels SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970).....	138
5.12.7.1 Lösungen für die SDS-PAGE	138
5.12.7.2 Silberfärbung	140
5.13 Isolierung von Carotinoiden.....	141
5.13.1 Extraktionen	141
5.13.1.1 Spinat.....	141
5.13.1.2 Gewinnung von Lutein aus <i>Tagetes sp.</i> (Oleoresin)	141
5.13.2 Isolierung von Carotinoiden mittels semipräparativer HPLC	142
5.13.2.1 Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin	142

5.13.3 Identifizierung und Quantifizierung der eingesetzten Carotinoide	142
5.13.3.1 UV/VIS-Spektrometrie	142
5.14 Umsetzung der Carotinoide	143
5.14.1 Herstellung der Carotinidlösungen.....	143
5.14.2 Umsetzung mit konzentriertem Kulturüberstand vom <i>Marasmius scorodonius</i>	143
5.14.3 Umsetzung der aufgereinigten Enzymfraktionen MSP1 und MSP2	144
5.14.4 Umsetzung von β,β -Carotin mit Triton X 100 anstelle von Tween 80.....	144
5.14.5 Produktisolierung mittels C_{18} -Festphasen-Mikroextraktion	144
5.14.6 Bestimmung von wässrigen Extinktionskoeffizienten	144
5.14.7 Quantifizierung des Abbaus mittels UV-VIS-Spektroskopie	145
5.14.8 Quantifizierung des Abbaus mittels HPLC.....	145
5.14.9 Probenreinigung zur Identifizierung nicht-flüchtiger Produkte mittels HPLC-MS	145
5.15 Entsorgungshinweise	146
6 ANHANG.....	147
6.1 Massenspektren aus der Biotransformation von Farnesen mit <i>A. niger</i>	147
6.2 UV/Vis-Absorptionsspektren der Spaltprodukte des β,β -Carotins	148
7 LITERATURVERZEICHNIS	152

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1** Norisoprenoide aus der Spaltung von β,β -Carotin
- Abb. 1-2** Fließschema zur Biotransformation von α -Pinen
- Abb. 2-1** Zielprodukte der Biotransformation von α -Pinen
- Abb. 2-2** Identifizierte Transformationsprodukte aus der Biotransformation von α -Pinen
- Abb. 2-3** Biotransformation von α -Pinen in Submerskultur
- Abb. 2-4** Biotransformation von α -Pinen mit konzentrierter Biomasse
- Abb. 2-5** Blindwerte ohne Pilzmyzel für Submerskultur und konzentrierte Biomassen in SNL-H-Medium nach 48 Stunden
- Abb. 2-6** Umsetzung von α -Pinen mit lyophilisiertem Pilzmyzel
- Abb. 2-7** Reagenzienblindwerte Lyophilisate
- Abb. 2-8** GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von α -Pinen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*
- Abb. 2-9** Umsetzung von (Z)-Verbenol mit *Pleurotus eryngii* in Submerskultur
- Abb. 2-10** Umsetzung mit (Z)-Verbenol mit Pilzmyzel und Kulturüberstand
- Abb. 2-11** Oxidation von (Z)-Verbenol mit Lyophilisaten von *P. eryngii*
- Abb. 2-12** Kombinierte Biotransformation von α -Pinen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* und *P. eryngii*
- Abb. 2-13** GC-MS-Chromatogramm der oxyfunktionalisierten Produkte
- Abb. 2-14** Isolierung des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]** mittels präparativer Gaschromatographie
- Abb. 2-15** Struktur von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]**
- Abb. 2-16** ^{13}C -NMR-Spektrum von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol
- Abb. 2-17** ^1H -NMR-Spektrum von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol
- Abb. 2-18** Massenspektrum *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol
- Abb. 2-19** Bildung des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol aus Farnesen durch *A. niger*
- Abb. 2-20** Silylierte Probe des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol und [1a, b]
- Abb. 2-21** Trennung der Enantiomeren von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, sowie von 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen

- Abb. 2-22** Bildung des 6-Methyl-5-hepten-2-on aus 7-Hydroxyfarnesen und dem entsprechenden Hydroperoxid
- Abb. 2-23** Massenspektrum von 6-Methyl-5-hepten-2-on
- Abb. 2-24** Biotransformation mit konzentrierten Kulturen
- Abb. 2-25** Konzentration der Transformationsprodukte von *Aspergillus niger*
- Abb. 2-26** Produktbildung im chemischen Blindwert
- Abb. 2-27** Hauptkomponenten des zur Biotransformation eingesetzten Farnesenisomeregemisches
- Abb. 2-28** Vergleich der Transformationsprodukte von (*E*)- β -Farnesen mit Biokonzentraten von *A. niger* (A) und im chemischen Blindwert (B)
- Abb. 2-29** Biotransformation von Farnesen mit ausgewählten Lyophilisaten
- Abb. 2-30** Für den enzymatischen Abbau eingesetzte Substrate
- Abb. 2-31** Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin aus Spinatextrakt
- Abb. 2-32** *Marasmius scorodoni*
- Abb. 2-33** Kinetik des Abbaus von β,β -Carotin durch *Marasmius scorodoni* mit konzentriertem Kulturüberstand
- Abb. 2-34** GC-MS- Chromatogramm (CW 20) der flüchtigen Spaltprodukte des β,β -Carotin-Abbaus.
- Abb. 2-35** Flüchtige Abbauprodukte der enzymatischen Spaltung durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodoni*
- Abb. 2-36** GC-MS-Chromatogramm und Massenspektrum des aus der enzymatischen Spaltung von β,β -Carotin isolierten Dihydroactinidiolids
- Abb. 2-37** Spaltung von β,β -Carotin in Position 9,10 (9', 10')
- Abb. 2-38** HPLC-DAD-Chromatogramm ($\lambda=450$ nm) des β,β -Carotin-Abbaus durch *Marasmius scorodoni*.
- Abb. 2-39** Dünnschichtchromatographische Untersuchung des enzymatischen Abbaus von β,β -Carotin.
- Abb. 2-40** HPLC-MS-Chromatogramm (450 nm) mit nicht-flüchtigen Spaltprodukten des enzymatischen β,β -Carotin-Abbaus
- Abb. 2-41** Massenspektrum von β -Carotin-5,6-epoxid
- Abb. 2-42** Massenspektrum der Verbindung 5
- Abb. 2-43** Massenspektrum des β -Apo-10'-carotinals (24.39 min, Verbindung 3)
- Abb. 2-44** Massenspektrum des β -Apo-12'-carotinals (23.54 min, Verbindung 2)
- Abb. 2-45** Massenspektrum des β -Apo-14'-carotinals (21.32 min, Verbindung 1)

- Abb. 2-46** Isolierung der Zielenzyme MSP1 und MSP2 mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung
- Abb. 2-47** UV-/VIS-Spektrum von MSP2
- Abb. 2-48** Lineweaver-Burk-Diagramm zur Enzymkinetik von MSP2
- Abb. 2-49** Einfluss von H₂O₂ auf den Abbau von β,β -Carotin unter Verwendung von desaktiviertem Kulturüberstand
- Abb. 2-50** Vergleich der GC-FID-Chromatogramme mit a) konzentrierten Kulturüberständen und b) gereinigter Enzymfraktion MSP2
- Abb. 3-1** Biosynthese der Mono- und Sesquiterpene über den Mevalonat-Weg
- Abb. 3-2** Biosynthese des in der Biotransformation eingesetzten α -Pinen aus Geranyldiphosphat
- Abb. 3-3** Durch allylische Oxidation entstandenen Transformationsprodukte der Biotransformation von α -Pinen und Limonen
- Abb. 3-4** Hydroxylierung über das Zweikomponentensystem P450-Monooxygenase / Reduktase
- Abb. 3-5** Haupttransformationsprodukte von α -Pinen mit *Pleurotus sapidus* und deren postulierte Bildungswege
- Abb. 3-6** Abbau von α -Pinen durch *Nocardia* spp.
- Abb. 3-7** Biotransformation von 4-Hydroxyzimtsäure zu 4-Hydroxybenzoesäure durch *P. variotti*
- Abb. 3-8** Postulierter Mechanismus für die extrazelluläre Produktion von H₂O₂ durch *P. eryngii* in Anwesenheit von aromatischen Alkoholen und Aldehyden
- Abb. 3-9** Mikrobielle Oxidation von sulfoniertem β -Farnesen zu 12-Hydroxyfarnesensulfon
- Abb. 3-10** Potentieller Mechanismus der Bildung von 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen und *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol über nicht identifizierte Hydroperoxide
- Abb. 3-11** Struktur von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]** im Vergleich zu *p*-Mentha-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol („Humbertiol“) **[2]**
- Abb. 3-12** Struktur des 3-[(*E*)-1-Propenyl]- α -terpineols (P1, P2)
- Abb. 3-13** Postulierte Bildung des 3-[(*E*)-1-Propenyl]- α -terpineols ausgehend von Pseudoionon
- Abb. 3-14** Reaktionsmechanismus von Peroxidasen

- Abb. 3-15** Postulierter Reaktionsmechanismus der zentralen Spaltung von β -Carotin durch die β -Carotin-15,15'-Monoxygenase
- Abb. 3-16** Selektive Spaltung von Zeaxanthin durch *CsZCD* aus Safran
- Abb. 3-17** Selektive Spaltung von 9 (Z)-Violaxanthin und Neoxanthin durch *NCED*
- Abb. 3-18** Selektive Spaltung von Lycopin durch die Lycopin-5,6(5',6')-Dioxygenase aus *Bixia orellana* zum Bixin-Dialdehyd als Vorstufe von Bixin
- Abb. 3-19** Spaltung von β -Apo-10'-carotinal durch *AtCCD8*
- Abb. 3-20** Möglicher Bildungsweg von β -Ionon aus der oxidativen Spaltung von β,β -Carotin
- Abb. 3-21** Postulierter Biosyntheseweg des 3,6-Epoxids und 5,8-Epoxids sowie des Loliolids aus 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid in Tabak
- Abb. 3-22** Mögliche Bildung der Isomeren des Megastigma-4,6,8-ons aus 3-Hydroxy- α -ionon in Tabak
- Abb. 6-1** Massenspektrum der Verbindung **[1a]**
- Abb. 6-2** Massenspektrum der Verbindung **[1b]**
- Abb. 6-3** Massenspektrum von 3-(Z)-7-Hydroxyfarnesen
- Abb. 6-4** UV-Vis-Spektrum des β -Apo-14'-carotinal in Acetonitril
- Abb. 6-5** UV-Vis-Spektrum des β -Apo-12'-carotinal in Acetonitril
- Abb. 6-6** UV-Vis-Spektrum des β -Apo-10'-carotinal in Acetonitril
- Abb. 6-7** UV-Vis-Spektrum der unbekanntes Verbindung 4
- Abb. 6-8** UV-Vis-Spektrum des postulierten β -Carotin-5,8-epoxids
- Abb. 6-9** UV-Vis-Spektrum des β -Carotin-5,6-epoxids
- Abb. 6-10** UV-Vis-Spektrum von β -Carotin-5,6-epoxid (dicke schwarze Linie) im Vergleich zu β,β -Carotin
- Abb. 6-11** UV-Vis-Spektrum der unbekanntes Verbindung 7

Tabellenverzeichnis

- Tab. 2-1** Ausbeuten an Biofeuchtmasse (BFM) und Lyophilisat der eingesetzten Kulturen
- Tab. 2-2** α -Pinen-Transformationsprodukte
- Tab. 2-3** Transformationsleistung von *Pleurotus sapidus*
- Tab. 2-4** Für die Farnesenbiotransformation eingesetzte Mikroorganismen
- Tab. 2-5** Kovats-Indices und Hauptfragmentierung der Farnesolisomere und Sinensale
- Tab. 2-6** Sensorische Untersuchung der Transformationsprodukte des Farnesens
- Tab. 2-7** $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol und Vergleich mit den theoretisch berechneten Daten
- Tab. 2-8** Berechnung des Enantiomerenverhältnisses von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, sowie 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen
- Tab. 2-9** Spektralphotometrische Überprüfung der isolierten Substrate und der zur Verfügung gestellten Referenzsubstanzen, sowie die entsprechenden Molekülmassen
- Tab. 2-10** Wässrige Extinktionskoeffizienten einiger eingesetzter Substrate
- Tab. 2-11** Abbauraten der eingesetzten Substrate
- Tab. 2-12** Kovats-Indices der identifizierten flüchtigen Spaltprodukte
- Tab. 2-13** Identifizierte Abbauprodukte der enzymatischen Spaltung der verwendeten Substrate
- Tab. 2-14** Flüchtige Spaltprodukte aus dem Abbau der Apocarotinoide
- Tab. 2-15** Nicht-flüchtige Verbindungen aus der Spaltung der eingesetzten Carotinoide
- Tab. 2-16** Aktivität, Proteingehalt und spezifische Aktivität der isolierten Enzymfraktionen
- Tab. 2-17** Steigerung der Enzymaktivität durch Zugabe von H_2O_2
- Tab. 3-1** Für die mikrobielle Terpenttransformation verantwortlichen Enzymsysteme mit ihren Reaktionen
- Tab. 3-2** Log P-Werte und Wasserlöslichkeit (bei 25 °C) einiger terpenoider Substrate, berechnet nach
- Tab. 5-1** Eingesetzte kommerzielle Mikroorganismen
- Tab. 5-2** Isolierte Mikroorganismen

Tab. 5-3	Bestandteile der Kulturmedien
Tab. 5-4	Standardsubstanzen und Substrate
Tab. 5-5	Sonstige Chemikalien
Tab. 5-6	Verwendete Lösungsmittel
Tab. 5-7	Verwendete Gase
Tab. 5-8	Verwendete Geräte und Hilfsmittel
Tab. 5-9	Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach
Tab. 5-10	GC-FID (on-column)
Tab. 5-11	GC-FID (split-splitless)
Tab. 5-12	GC mit chiraler Trennsäule
Tab. 5-13	GC mit olfaktometrischer Detektion
Tab. 5-14	GC-MS mit polarer Säule
Tab. 5-15	GC-MS mit unpolarer Säule
Tab. 5-17	Präparative Gaschromatographie
Tab. 5-18	HPLC-DAD
Tab. 5-19	Semipräparative HPLC
Tab. 5-20	HPLC-MS-Kopplung
Tab. 5-21	Enzymaufreinigung mittels IEX
Tab. 5-22	Enzymaufreinigung mittels GFC
Tab. 5-23	Zusammensetzung der 12%igen SDS-Gele
Tab. 5-24	Lösungsmittel, Wellenlängen und molare Extinktionskoeffizienten für die spektralphotometrische Quantifizierung der Carotinoide

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BIS	Bisacrylamid
<i>br</i>	brought (NMR)
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CoA	CoenzymA
COSY	zweidimensionale ¹ H, ¹ H-NMR
CW	Carbowax
d	Dublett
DAD	Diodenarraydetektor
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
DHA	Dihydroactinidiolid
dq	Dublett vom Quartett (NMR)
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstossionisation
et al.	und Mitarbeiter
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ¹ H, ¹³ C-NMR, 2D”
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGC	„High Resolution Gas Chromatography“
ID	Innendurchmesser
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPP	Isopentenylphosphat
IS	Interner Standard
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
KI	Kovats Index
m	Multiplett

<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
$M^{+\bullet}$	Molekülradikalkation
MOPS	4-[Morpholino]butansulfonsäure
mU	„milli Units“
NADPH	Nicotinamid-adenosyldinucleotidphosphat, reduzierte Form
$NAD(P)^+$	Nicotinamid-adenosyldinucleotid(phosphat), oxidierte Form
NMR	Kernresonanzspektroskopie
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ROESY	„Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy“
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Singulett (NMR)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNL-H	Standardnährlösung mit Hefeextrakt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
v/v	Volumen pro Volumen

1 Einleitung

Aromastoffe spielen in der Geschichte der Menschheit eine wichtige Rolle. Dies zeigen zahlreiche überlieferte Berichte. So wurden beispielsweise für Rauchopfer Harze, Hölzer, Rindenteile und aromatische Pflanzenteile verbrannt. Weihrauch und Myrrhe wurden schon von den Babyloniern vor über 5000 Jahren verwendet. Bereits im Mittelalter erfolgte durch die Erfindung der Wasserdampfdestillation und die Herstellung hochgradigen Alkohols durch die Araber die Gewinnung etherischer Öle und Essenzen als Ausgangsmaterial für Parfums. Die Gewinnung der Aromastoffe hat sich dabei über die Jahrhunderte prinzipiell nicht verändert. Das gesammelte Pflanzenmaterial wird zerkleinert und die wertgebenden Inhaltsstoffe destillativ extrahiert. Da der Anteil an Aromastoffen in Pflanzen aber sehr gering ist, sind große Mengen für die Gewinnung erforderlich (Ohloff, 1990). Dies macht die Gewinnung natürlicher Aromastoffe zu einem aufwendigen und teuren Verfahren, was sich in hohen Preisen widerspiegelt. Die Extraktion von einem Kilogramm Himbeerketon, dem Schlüsselaromastoff der Himbeere, aus der Frucht würde beispielsweise mehrere Millionen Euro kosten, wenn man nur den Preis des Rohmaterials rechnet. Eine alternative Gewinnung des Glykosids aus der Birkenrinde würde immer noch zu einem Preis von 10000 \$ pro kg führen (Berger und Zorn, 2004).

Ein Großteil der industriell hergestellten Lebensmittel wird heute zur Gewährleistung einer gleich bleibenden Qualität und zum Ausgleich von Rohstoffschwankungen aromatisiert. Die daraus resultierende hohe Nachfrage kann alleine durch Extraktion von natürlichen Aromastoffen nicht mehr gedeckt werden. Der Bedarf ließe sich durch chemische Synthese decken, was jedoch gerade im Lebensmittelbereich vom Verbraucher nicht akzeptiert wird. Daher beträgt der Verzehr von „natürlich“ aromatisierten Lebensmitteln in Deutschland etwa 70% (www.aromenhaus.de).

Die biotechnologische Aromastoffproduktion durch Mikroorganismen, wie z.B. Asco- und Basidiomyceten stellt eine mögliche Alternative zur Extraktion aus pflanzlichen Materialien dar. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass der Begriff „natürliches Aroma“ gemäß Aromenverordnung (2006) durch biotechnologische Produktion erhalten bleibt. Ein weiterer Vorteil ist zudem eine selektivere und schonendere Umsetzung der eingesetzten Substrate im Gegensatz zu chemischen Synthesen.

Terpenkohlenwasserstoffe sind als nahezu ubiquitär vorkommende sekundäre Pflanzenstoffe mit ihrem Bauprinzip aus Isopreneinheiten bekannt. Die oxyfunktionalisierten Verbindungen stellen sowohl bekannte Duft- und Riechstoffe,

als auch pharmakologisch wirksame Naturstoffe dar. Zahlreiche Mono- und Sesquiterpenoide sind als Phytohormone und Signalstoffe bei der Kommunikation im Insektenreich charakterisiert worden (Breitmeier, 2005). Mittlerweile sind mehr als 22.000 unterschiedliche Terpenoide bekannt, was sie zur größten Gruppe der Naturstoffe macht (Carvalho et al., 2006).

Aromastoffe, die sich aus terpenoiden Verbindungen ableiten lassen, sind durch ihre niedrigen Geruchsschwellen als *character impact compounds* Bestandteil vieler etherischer Öle und Pflanzenextrakte. Die Geruchsschwelle von α -Sinensal, dem Schlüsselaroma aus Orangen ist mit $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ sehr gering. Auch die aus der Spaltung von Carotinoiden entstehenden aromaaktiven C_{13} -Norisoprenoide z.B. β -Ionon und β -Damascenon zeichnen sich durch äußerst niedrige Geruchsschwellen von $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$, bzw. $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ (in Wasser) aus (Ohloff, 1994).

Eine Vielzahl an Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen oder Pilze ist zur Biotransformation terpenoider Substrate in der Lage. Dabei verfügen gerade Basidiomyceten aufgrund ihres natürlichen Wachstums auf Holz über ein umfangreiches Enzymsystem wie z.B. Laccasen und Peroxidasen und sind damit für die Oxidation terpenoider Substrate geeignet (Berger und Schrader, 2001).

Für den Einsatz zur Biotransformation bieten sich eine Vielzahl von nicht oxyfunktionalisierten Ausgangsverbindungen aus Abfallströmen industrieller Prozesse an. Das Monoterpen α -Pinen fällt bei der Kiefernrohharzproduktion durch Wasserdampfdestillation in Mengen von jährlich etwa 160000 t an, von denen ein Großteil als preiswerte Lösungsmittel in die Lack- und Farbenindustrie geht. Die Verbindung stellt damit ein geeignetes Substrat für die Produktion terpenoider Aromastoffe, wie z.B. Verbenol und Verbenon dar, dessen Preis bei bis zu 3000 € kg^{-1} liegt (Mitteilung aus Industriekreisen).

Die in der Natur weit verbreiteten Tetraterpene, vor allem die Carotine und Xanthophylle werden in der Natur in Mengen von 100 Millionen Tonnen pro Jahr synthetisiert (Britton et al., 1998). Sie kommen in großen Mengen im Pflanzenreich als Blattfarbstoffe vor, spielen aber auch im Tierreich eine wichtige Rolle, vor allem als Vorstufe von Vitamin A. Zudem werden einigen Carotinoiden antioxidative Eigenschaften zugesprochen (v. D. Berg et al., 2000).

Carotinoide stellen ein großes Potential zur Gewinnung hochpotenter Aromastoffe dar. Die Spaltung der Carotinoidstruktur in Position 9,10-Position führt zu den sehr geruchsintensiven C₁₃-Norisoprenoiden, wie z. B. α - und β -Ionon. Aber auch andere norisoprenoide Verbindungen, wie Dihydroactinidiolid und β -Cyclocitral sind durch die oxidative Spaltung zugänglich (**Abb. 1-1**).

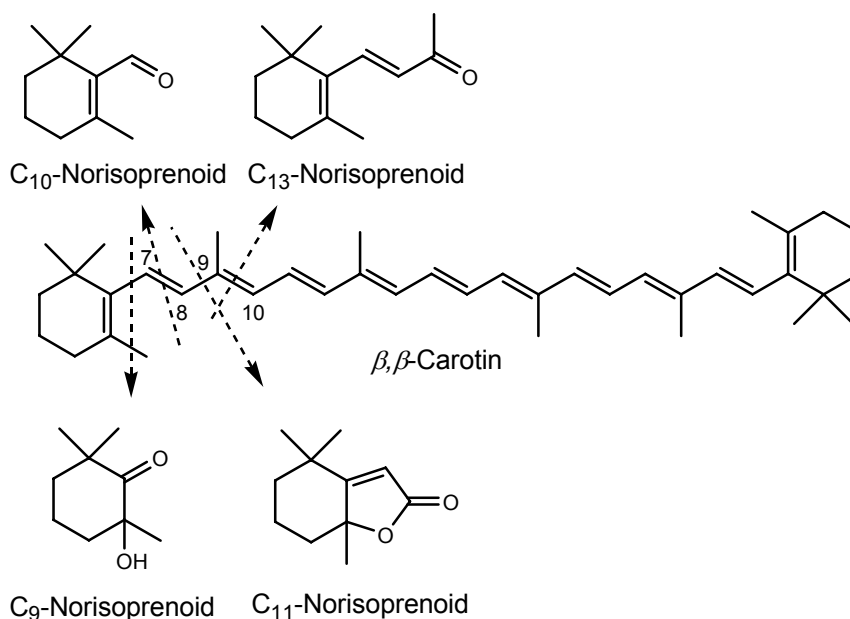


Abb. 1-1 Norisoprenoide aus der Spaltung von β,β -Carotin

Aus der oxidativen Spaltung von Carotinoiden lassen sich auch Vorläufer von Aromastoffen ableiten. Ein Beispiel ist die Biosynthese von β -Damascenon aus Neoxanthin aus dem primären Spaltprodukt Grashüpferketon.

Für die Biotransformation von Terpenen werden momentan immer noch hauptsächlich Biokatalysatoren aus Bakterien und Pilzen verwendet. Diese machen nahezu zwei Drittel aller Veröffentlichungen der letzten zehn Jahre aus. Der Anteil isolierter Enzyme beträgt dagegen nur etwa 7% (Carvalho et al., 2006). Es ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Anteil in Zukunft deutlich ansteigen wird.

1.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der mikrobiellen Umsetzung von Mono-, Sesqui-, und Tetraterpenen und ist in die folgenden Schwerpunkte unterteilt:

Die Biotransformation des Monoterpens α -Pinen wurde mit ausgewählten oxidasestarken Mikroorganismen in unterschiedlichen Transformationsansätzen durchgeführt und verglichen. Hierbei wurde die Submerskultur klassisch, mit einem Ansatz mit zwanzigfach erhöhter Biomasse sowie mit lyophilisiertem Pilzmyzel durchgeführt (**Abb. 1-2**).

Die Zielverbindungen der Biotransformation waren die geruchsintensiven, durch allylische Oxidation des α -Pinsens entstandenen Terpene, Verbenol und Verbenon.

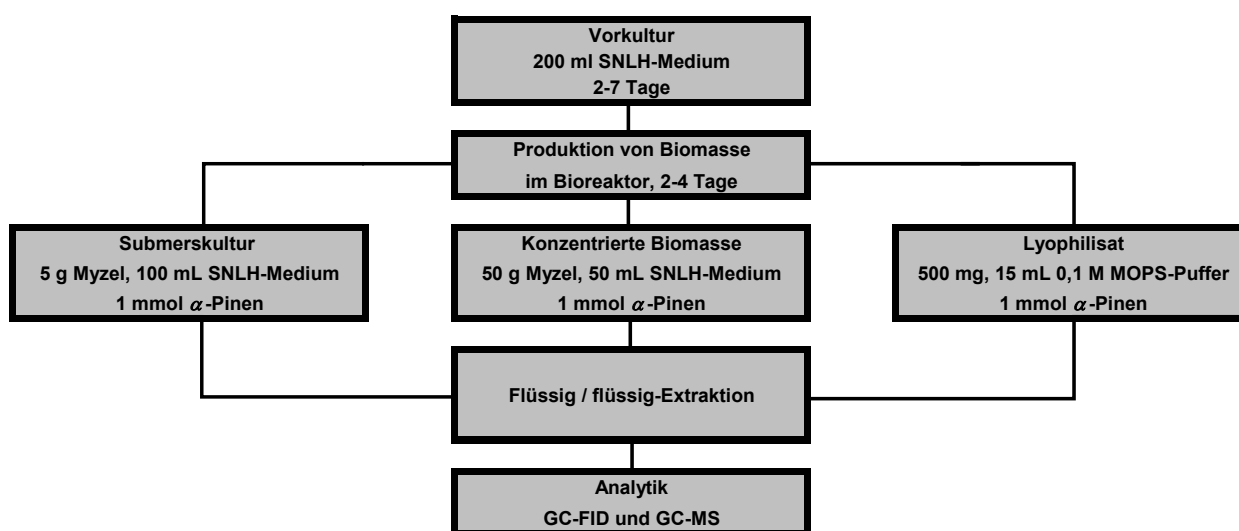


Abb. 1-2 Fließschema zur Biotransformation von α -Pinen

Für die Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen zu aromaaktiven oxidierten Terpenoiden wurde konzentrierte Biomasse und Lyophilisate verwendet.

Hierbei sollten aufbauend auf den Arbeiten von Kaspera (2004) weitere Organismen auf ihre Transformationsfähigkeit untersucht und neue geruchsaktive Verbindungen identifiziert werden.

Die Spaltung ausgewählter Carotine und Xanthophylle wurde mit Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* durchgeführt. Bereits frühere Arbeiten von Langhoff (2002) und Veddeler (2004) zeigten einen Abbau ausgewählter Carotinoide mit einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*. Hier wurden vor allen Dingen flüchtige norisoprenoide Spaltprodukte identifiziert. Allerdings zeigten sich hier nur Ausbeuten von ca. 20 mol% an identifizierten flüchtigen Verbindungen. An nicht-flüchtigen Verbindungen wurde nur β -Apo-10'-carotinal in Spuren detektiert.

Mit den Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* sollten ebenfalls gebildete, flüchtige Spaltprodukte identifiziert werden. Zudem waren auch nicht-flüchtige Verbindungen von Interesse, um die Bilanzierung des Carotinoidabbaus zu vervollständigen. Potentielle primäre Spaltprodukte des β,β -Carotin-Abbaus, wie z.B. β -Apo-8-carotinal wurden ebenfalls umgesetzt, um deren weitere Spaltung zu zeigen.

2 Ergebnisse

2.1 Biotransformation des Monoterpens α -Pinen

2.1.1 Auswahl der Mikroorganismen

Für die Biotransformation wurden Basidio- und Ascomyceten ausgewählt, die in vorherigen Arbeiten ein hohes Transformationspotential gezeigt hatten.

Wichtig für die Auswahl war zudem die Erfüllung mindestens eines der folgenden Kriterien:

- Stamm für die Degradation von Terpenen bekannt,
- Stamm zur Transformation von Terpenen fähig,
- Stamm aus einem terpenreichen Habitat isoliert,
- Stamm besitzt aufgrund seiner lignolytischen Aktivität ein breites Spektrum an oxidierenden Exoenzymen

Die Untersuchungen zur Terpenbiotransformation wurden am Beispiel von drei Ascomyceten (*Penicillium solitum*, *Stemphylium botryosum*, Brauer 2004, *Chaetomium globosum*, Kaspera 2004) und zwei Basidiomyceten (*Pleurotus sapidus*, Onken 1999, *Pleurotus eryngii*, Langhoff 2002, Veddeler 2004) untersucht. Dabei wurde neben der klassischen Submerskultur auch eine Kulturführung mit erhöhter Biomasse („Biokonzentrat“, „Hochzelldichte“) und ein Transformationsansatz mit lyophilisiertem Pilzmyzel durchgeführt.

2.1.2 Produktion der Biomasse und Gewinnung des lyophilisierten Pilzmyzels

Für die experimentellen Arbeiten wurden große Mengen an Biomasse benötigt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte die Produktion der Biomasse in einem 2 L-Bioreaktor. Ausgehend von einer 200 mL-Vorkultur wurde die Produktion der Biomasse je nach Organismus für 3 - 4 Tage durchgeführt. Die gewonnene Zellmasse wurde direkt auf die entsprechenden Transformationsansätze verteilt. Der verbleibende Rest wurde für die Lyophilisierung des Pilzmyzels eingesetzt. Die Daten der jeweiligen Organismen sind in **Tab. 2-1** dargestellt.

Tab. 2-1 Ausbeuten an Biofeuchtmasse (BFM) und Lyophilisat der eingesetzten Kulturen aus einem 2-L-Reaktoransatz

Organismus	Kulturdauer [d]	Biofeuchtmasse [g]	Lyophilisat [g / 50 g BFM]
<i>P. solitum</i>	3	566	2,5
<i>S. botryosum</i>	3	244	2,5
<i>C. globosum</i>	4	406	2,9
<i>P. sapidus</i>	4	517	2,3
<i>P. eryngii</i>	4	374	2,1

2.1.3 Zielprodukte der Biotransformation

Aus der Biotransformation von α -Pinen ist eine Vielzahl an geruchlich interessanten oxyfunktionalisierten Verbindungen zugänglich (Berger und Schrader, 2001). Hauptzielprodukte waren Verbenol und Verbenon, die durch allylische Oxidation des α -Pinsens entstehen. Beide zeichnen sich durch eine minzige, mentholische Note aus (**Abb. 2-1**).

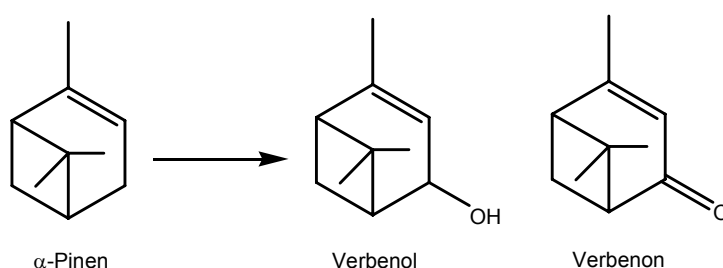


Abb. 2-1 Angestrebte Zielprodukte der Biotransformation von α -Pinen

Die allylische Oxidation kann zu weiteren Transformationsprodukten, wie zum Beispiel Myrtenol und Myrtenal führen. Auf diese, sowie weitere oxidierte Verbindungen wurden die Transformationsansätze ebenfalls untersucht (**Abb. 2-2**).

2.1.4 Autoxidation von α -Pinen

Das bicyclische ungesättigte α -Pinen ist gegenüber Wärme und Luftsauerstoff empfindlich. Darüber hinaus können Bestandteile des Mediums wie Spurenelemente autoxidative Prozesse fördern (Bhattacharyya et al., 1960, Moore et al., 1956). Das Transformationsprodukt Verbenol ist als Autoxidationsprodukt in wässrigen Medien bekannt.

Um die durch Autoxidation entstehenden Produkte zu identifizieren, wurden für die jeweiligen Kulturführungen entsprechende Kontrollwerte im gleichen Medium ohne Pilzmyzel bzw. Lyophilisat mitgeführt und unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet und analysiert. Die entsprechenden Daten sind in den jeweiligen Kapiteln der untersuchten Ansätze dargestellt.

2.1.5 Identifizierung von Transformationsprodukten

Die Identifizierung der oxyfunktionalisierten flüchtigen Verbindungen erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion gaschromatographisch mittels GC-FID über einen Vergleich mit Referenzsubstanzen und Kovats-Indices. Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard BHT. Gleichzeitig wurden die Verbindungen mittels GC-MS untersucht und die Massenspektren mit vorhandenen Spektrenbibliotheken verglichen. (*E*)-Verbenol wurde mittels NMR-Spektroskopie identifiziert (Rinne, 2007) (**Tab. 2-2**).

Tab. 2-2 α -Pinen-Transformationsprodukte (KI = Kovats-Index, Std = Standardsubstanz, MS = Referenz-Massenspektrum; Lit.: [a] Lee et al., 2005; [b] Schieberle und Grosch, 1989 [1] NMR: Rinne)

Substanz	Identifizierung	KI (CW 20 M)	KI Std. (CW 20 M)	KI Lit. (CW 20 M)
(<i>E</i>)-Verbenol	MS, KI, NMR ^[1]	1649	n.v.	1675 ^[a]
Verbenon	MS, KI, Std.	1659	1662	1695 ^[a]
(<i>E</i>)-Pinocarveol	MS, KI, Std.	1627	1617	1648 ^[a]
Myrtenol	MS, KI, Std.	1770	1760	1789 ^[a]
Myrtenal	MS, KI, Std.	1585	1581	1596 ^[b]
(<i>E</i>)-Carveol	MS, KI, Std.	1846	1850	1833 ^[a]
(<i>Z</i>)-Verbenol	MS, KI, Std.	1637	1639	1660 ^[a]

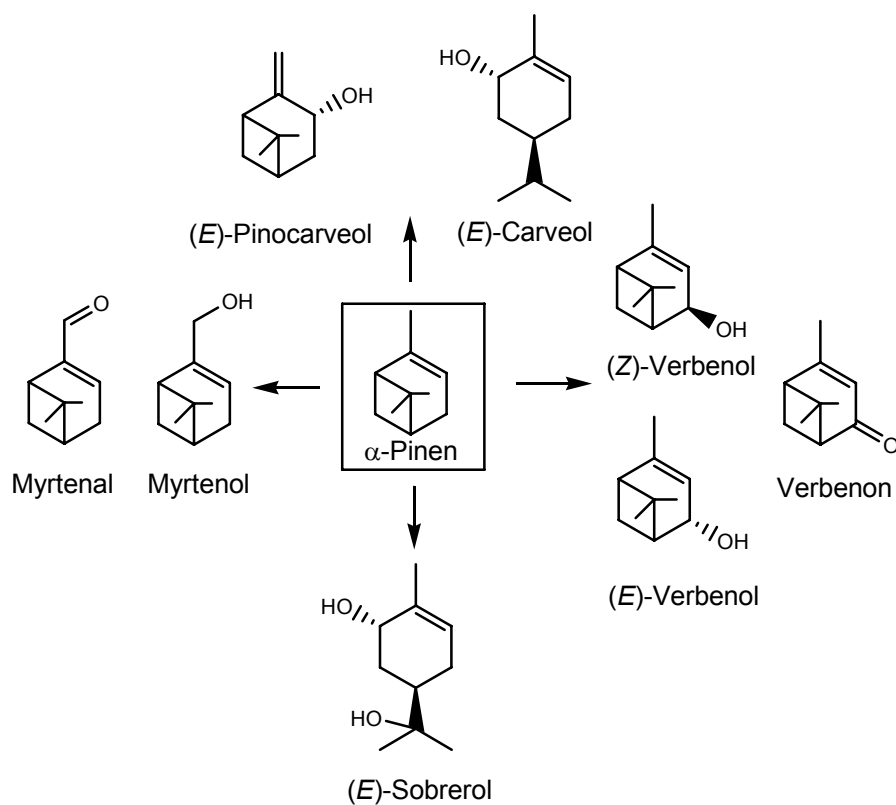


Abb. 2-2 Identifizierte Transformationsprodukte aus der Biotransformation von α -Pinen

2.1.6 Transformation in Submerskultur

Die Durchführung der Submerskultur erfolgte nach 5.5.1.1. Es wurde 1 mmol α -Pinen pro 100 mL-Ansatz hinzugegeben und die Kultur nach 48 Stunden Transformationsdauer nach 5.7.1 / 5.7.2 aufgearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID. Haupttransformationsprodukte waren (*E*)-Verbenol und Verbenon. Die größten Ausbeuten wurden mit 20 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol bzw. 3 mg L⁻¹ Verbenon mit *Pleurotus sapidus* erreicht. *Pleurotus eryngii* bildete 15 mg L⁻¹ an Verbenon, jedoch nur sehr geringe Mengen (<0,5 mg L⁻¹) an (*E*)-Verbenol. *Chaetomium globosum* zeigte eine Bildung von 13 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol und 4 mg L⁻¹ Verbenon. Die anderen Organismen transformierten α -Pinen zu (*E*)-Verbenol und Verbenon mit Gehalten von 10-12 mg L⁻¹ bzw. 1-3 mg L⁻¹. Andere identifizierte Verbindungen, wie z.B. Myrtenol, (*E*)-Carveol und (*E*)-Pinocarveol wurden im Bereich von maximal 2 mg L⁻¹ detektiert (**Abb. 2-3**).

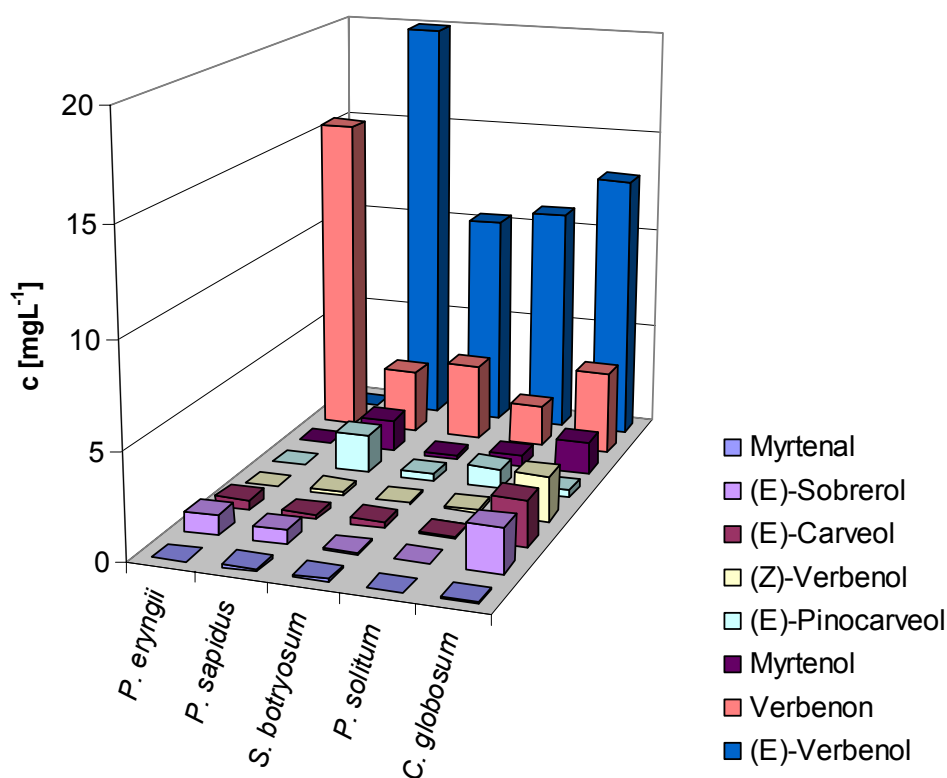


Abb. 2-3 Biotransformation von α -Pinen in Submerskultur nach 48-stündiger Umsetzung

2.1.7 Transformation mit konzentrierter Biofeuchtmasse

Die Biotransformation wurde nach 5.5.1.2 mit 50 g Pilzmyzel und 50 mL SNL-H-Medium und der Zugabe von 1 mmol α -Pinen analog zur Submerskultur durchgeführt. Nach 48-stündiger Transformationsdauer wurden die Ansätze nach 5.7.1 / 5.7.2 extrahiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID. Die Haupttransformationsprodukte waren auch hier (*E*)-Verbenol und Verbenon. Die größten Ausbeuten wurden mit *Pleurotus sapidus* mit 78,6 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol bzw. 19,6 mg L⁻¹ Verbenon erreicht, während *Pleurotus eryngii* 11,4 mg L⁻¹ Verbenon, jedoch nur geringe Mengen (*E*)-Verbenol (<1 mg L⁻¹) bildete. Die anderen untersuchten Mikroorganismen bildeten 13-31 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol und 4-9 mg L⁻¹ Verbenon. Alle anderen identifizierten Transformationsprodukte erreichten Konzentrationen von maximal 5 mg L⁻¹ (**Abb. 2-4**).

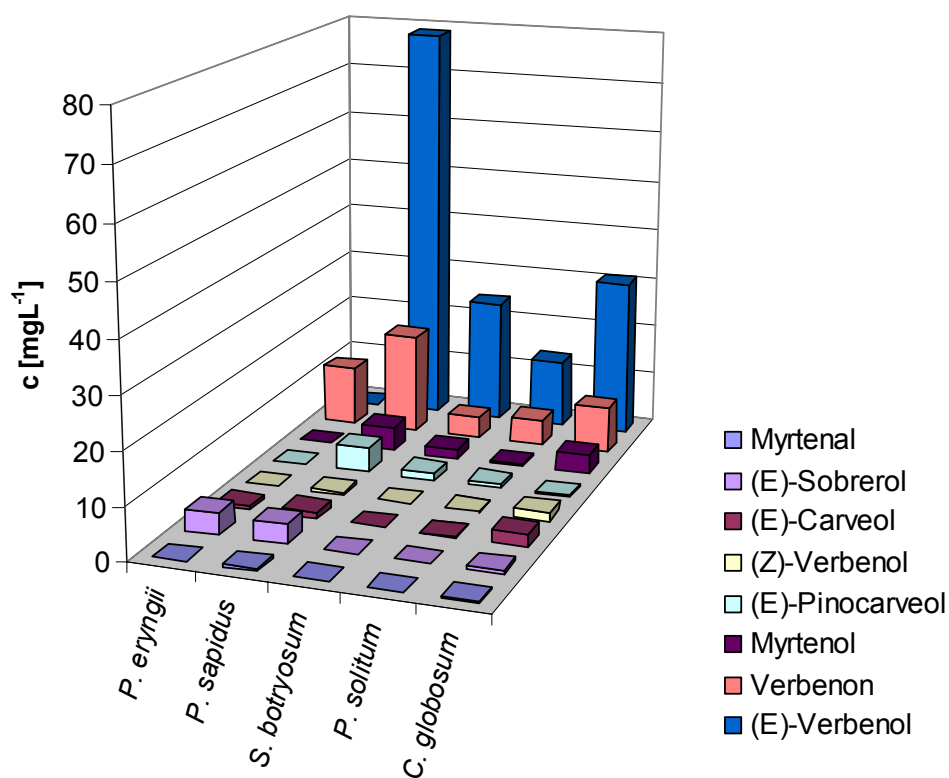


Abb. 2-4 Biotransformation von α -Pinen mit konzentrierter Biomasse nach 48-stündiger Umsetzung

Bei der Umsetzung in Submerskultur und den Ansätzen mit konzentrierter Biomasse wurde für die jeweiligen Organismen ein Blindwert mit SNL-H-Medium ohne Myzel mitgeführt und analog zu den Transformationskulturen aufgearbeitet. (*E*)-Verbenol wurde als Hauptprodukt in Mengen von 4,5 - 6 mg L⁻¹, daneben Verbenon zu 1 - 1,5 mg L⁻¹ quantifiziert. Die Konzentrationen der übrigen Transformationsprodukte wie Myrtenol, (*E*)-Carveol und (*E*)-Pinocarveol lagen alle unter 1 mg L⁻¹. Die Kontrollwerte lagen somit alle deutlich unter den Werten der Transformation mit den ausgewählten Mikroorganismen (**Abb. 2-5**).

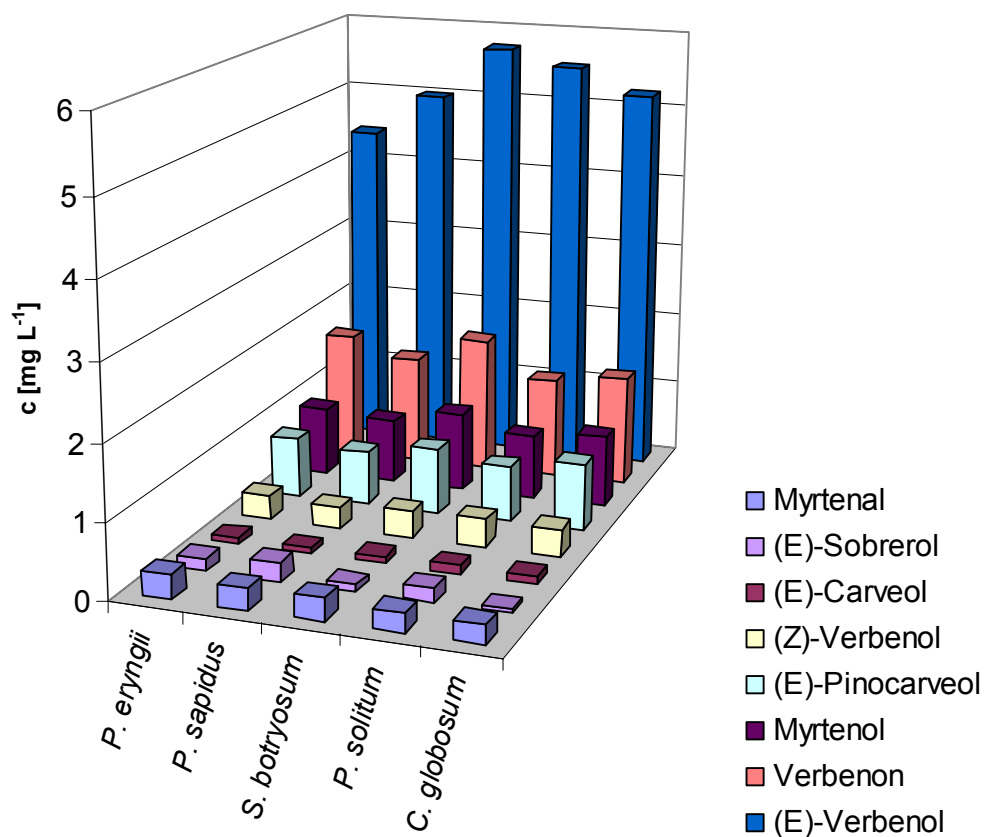


Abb. 2-5 Blindwerte ohne Pilzmyzel für Submerskultur und konzentrierte Biomassen in SNL-H-Medium nach 48 Stunden

2.1.8 Umsetzung mit lyophilisiertem Pilzmyzel

Die Umsetzung mit gefriergetrocknetem Pilzmyzel der untersuchten Mikroorganismen erfolgte nach 5.5.1.3. Die Transformationszeit wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Kaspera (2004) auf 20 Stunden reduziert. 1 mmol α -Pinen wurde zu 15 mL 0,1 M MOPS-Puffer (pH 7) gegeben. Die Analytik erfolgte nach extraktiver Aufarbeitung (5.7.1 und 5.7.2) mittels GC-FID. Mit dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* wurden Ausbeuten von 155 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol, 62 mg L⁻¹ Verbenon sowie 35 mg L⁻¹ (*E*)-Sobrerol und 15 mg L⁻¹ (*E*)-Pinocarveol erzielt. Die Konzentration an (*E*)-Verbenol betrug bei den anderen untersuchten Organismen 50 - 55 mg L⁻¹, bei *Chaetomium globosum* wurden lediglich Konzentrationen von 30 mg L⁻¹ erreicht. Die Ausbeute an Verbenon betrug 6 - 10 mg L⁻¹. Alle anderen identifizierten Transformationsprodukte lagen im Konzentrationsbereich von 0,7 - 8 mg L⁻¹ (**Abb. 2-6**).

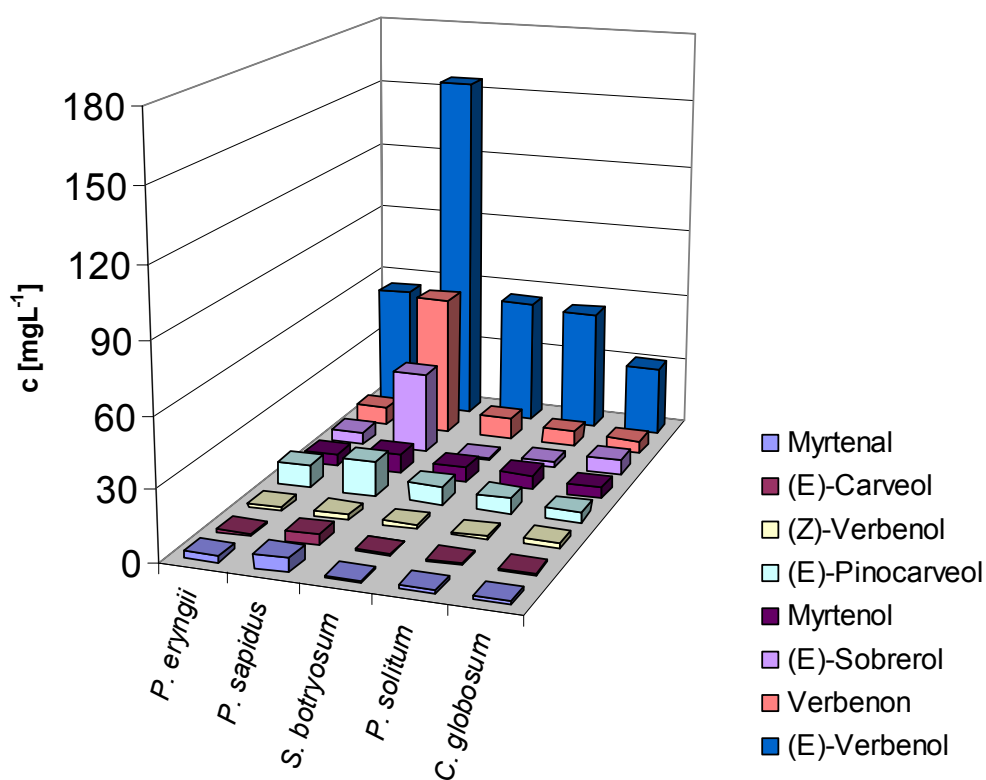


Abb. 2-6 Umsetzung von α -Pinen mit lyophilisiertem Pilzmyzel

Auch für die lyophilisierten Kulturen wurden entsprechende Kontrollwerte in 0,1 M MOPS - Puffer ohne Myzel mitgeführt. Die Quantifizierung mittels GC-FID ergab für (*E*)-Verbenol Gehalte von 6 - 11 mg L⁻¹, für alle anderen Transformationsprodukte wurden Gehalte von 0,5 bis 2 mg L⁻¹ bestimmt. Die Gehalte lagen somit deutlich unter denen der Transformationsansätze mit lyophilisiertem Pilzmyzel (**Abb. 2-7**). Die Umsetzung wurde mit durch Hitze desaktiviertem Lyophilisat (100 °C, 20 min) wiederholt. Die erhaltenen Konzentrationen lagen alle im Bereich des Blindwertes ohne Lyophilisat.

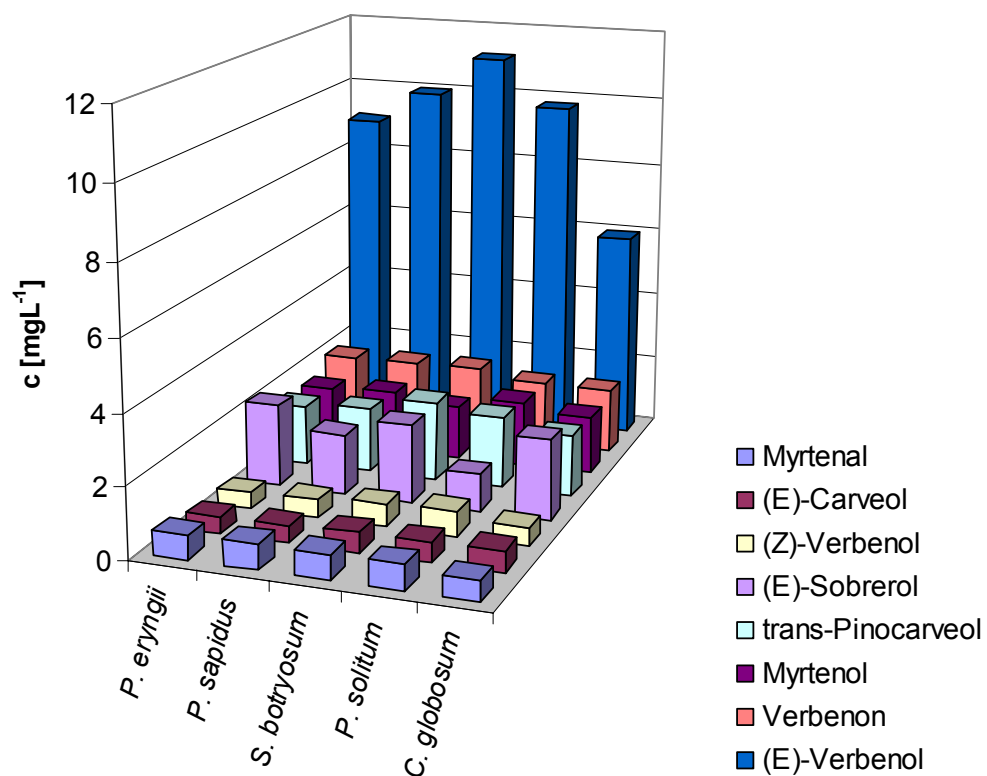


Abb. 2-7 Reagenzienblindwerte Lyophilisate

2.1.9 Vergleich der Effizienz der Transformationsansätze am Beispiel von *Pleurotus sapidus*

Pleurotus sapidus war bei allen durchgeführten Experimenten der Organismus mit den höchsten Produktausbeuten. **Abb. 2-8** zeigt ein GC-MS-Chromatogramm aus der Umsetzung mit lyophilisiertem Pilzmyzel.

Für den Vergleich wurden die Gehalte der Haupttransformationsprodukte (*E*)-Verbenol und Verbenon jeweils auf die eingesetzte Biofeuchtmasse und die Trockenmasse nach Lyophilisierung sowie in mol% bezogen auf das eingesetzte Substrat umgerechnet. Die Daten sind in **Tab. 2-3** zusammengestellt.

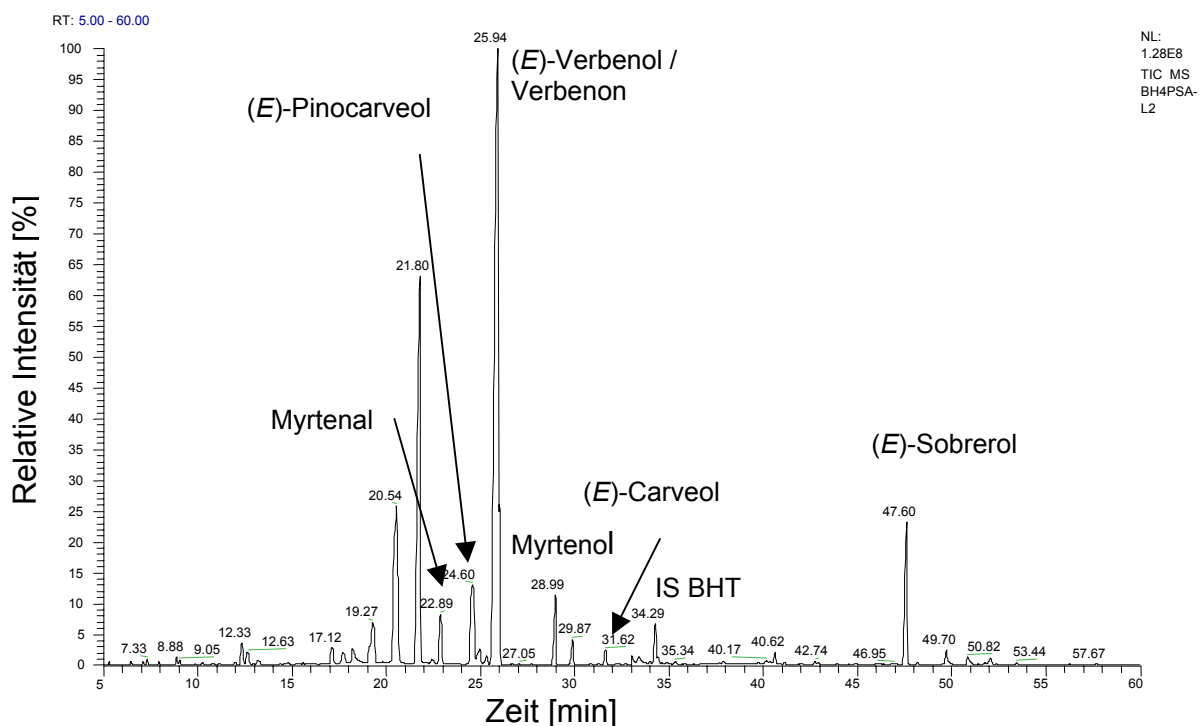


Abb. 2-8 GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von α -Pinen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

Tab. 2-3 Transformationsleistung von *Pleurotus sapidus* (Transformationsdauer Submerskultur, konzentrierte Kulturen 48 Stunden, Dosierung 10 mM α -Pinen ; Lyophilisate 20 Stunden, Dosierung 67 mM α -Pinen)

	Produkt	c [mg L ⁻¹]	Ausbeute [mg g BFM ⁻¹]	Ausbeute [mg g TM ⁻¹]	mol%
Submerskultur	(E)-Verbenol	19,9	0,40	8,65	1,27
	Verbenon	3,10	0,03	1,35	0,20
Konzentrierte Kulturen	(E)-Verbenol	78,6	0,08	1,71	5,02
	Verbenon	19,6	0,02	0,43	1,27
Lyophilisiertes Pilzmyzel	(E)-Verbenol	155,6	0,19	4,60	1,50
	Verbenon	61,9	0,07	1,86	0,60

Wie die in mol% berechneten Ausbeuten zeigen, führte die Erhöhung der Biomasse um den Faktor 20 zu einer Vervielfachung der (E)-Verbenol-Bildung bzw. zu einer um den Faktor 6 gesteigerten Produktion an Verbenon. Die Lyophilisate zeigten eine Umsatzrate ähnlich der Submerskultur, allerdings war die Bildung von Verbenon deutlich gesteigert. Die Ausbeuten wurden in wesentlich kürzerer Zeit erreicht. Wie die weiteren Ergebnisse zeigen, ist die Ausbeute durch längere Transformationszeit nicht mehr wesentlich zu steigern (siehe 2.2.11).

2.1.10 Oxidation von (Z)-Verbenol mit *Pleurotus eryngii*

P. eryngii bildete in Submerskultur und in den Ansätzen mit erhöhter Biomasse als einziger nur geringe Mengen an (*E*)-Verbenol. Dazu wurde eine Bildung von Verbenon mit Gehalten von 10 bis 15 mg L⁻¹ detektiert. Aufgrund der geringen Gehalte an (*E*)-Verbenol wurde vermutet, dass der Organismus in der Lage war, Verbenol zu Verbenon zu oxidieren, jedoch nur sehr geringe Mengen des α -Pinens zu Verbenol zu oxidieren. Um dies zu bestätigen, wurde zunächst zu einer Submerskultur 1 mmol (10 mM, 160 mg) einer ethanolischen (Z)-Verbenol-Lösung gegeben (5.5.2.1) und nach 48-stündiger Transformationsdauer extraktiv aufgearbeitet (**Abb. 2-9**).

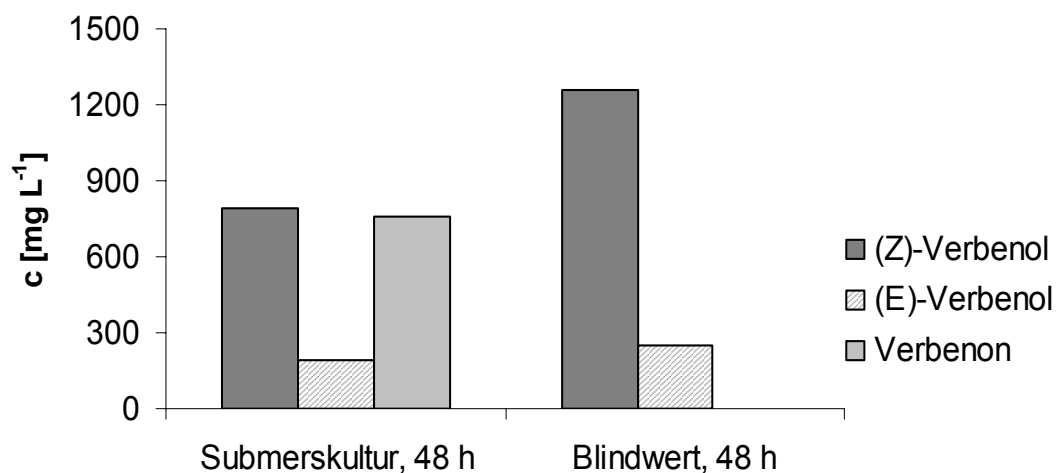


Abb. 2-9 Umsetzung von (Z)-Verbenol mit *Pleurotus eryngii* in Submerskultur (48 Stunden)

Nach 48-stündiger Umsetzung wurde eine Abnahme der Konzentration an (Z)-Verbenol von 48% festgestellt, während es im Kontrollwert lediglich zu einer geringen Isomerisierung zum (*E*)-Verbenol von 16,6% kam. Der Umsatz zu Verbenon betrug etwa 47 mol%. Die gebildete Menge an Verbenon im Kontrollwert betrug 2,5 mg L⁻¹ (0,2 mol%).

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob die Oxidation durch vom Pilz ausgeschiedene Exoenzyme wie z.B. bereits bekannte Oxidasen, oder durch ein intrazelluläres Enzymsystem durchgeführt wird. Hierzu wurde zunächst von einer Submerskultur das Pilzmyzel vom Medium durch Zentrifugation bei 4000 rpm (3.313 g) abgetrennt und mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen.

Die Umsetzungen erfolgten mit Kulturüberstand und Pilzmyzel durch Zugabe von 0,25 mmol (2,5 mM, 40 mg) (Z)-Verbenol zu jeweils 100 mL bzw. 100 g im Schüttelkolben für 40 Stunden (5.5.2.2). Als Referenz wurde eine Submerskultur zum Vergleich mitgeführt (**Abb. 2-10**).

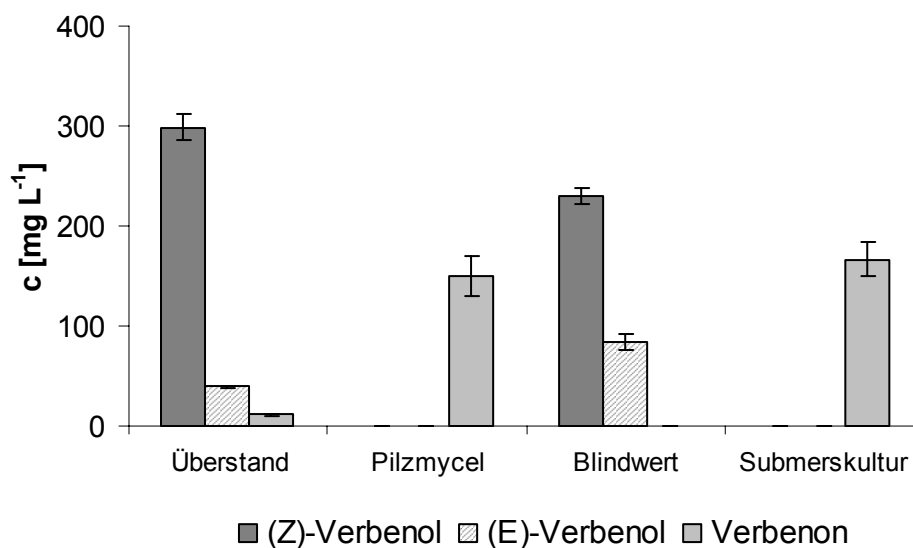


Abb. 2-10 Umsetzung von (Z)-Verbenol mit Pilzmyzel und Kulturüberstand (40 Stunden)

Die Oxidation von (Z)-Verbenol mit separiertem Pilzmyzel zeigte nach 40 Stunden bis auf einen Restgehalt von 0,14 mg L⁻¹ einen nahezu vollständigen Umsatz, während im Überstand nur eine geringe Umsetzung zu 11 mg L⁻¹ Verbenon (3,0 mol%) erfolgte. Die Umsetzung mit separiertem Pilzmyzel führte zu Verbenon-Gehalten von 149 mg L⁻¹ (39 mol%). Die Umsetzung mit separiertem Pilzmyzel führte zu Verbenon-Gehalten von 167 mg L⁻¹ (43 mol%), während im Blindwert lediglich Konzentrationen von 0,25 mg L⁻¹ (0,1 mol%) Verbenon gebildet wurden.

Da das oxidative Potential dieses Pilzes vermutlich membrangebunden oder intrazellulär vorlag, wurde die Umsetzung mit lyophilisiertem Pilzmyzel durchgeführt. Hierzu wurden zu 500 mg Lyophilisat in 15 mL MOPS-Puffer 0,1 mmol (15,4 mg) (Z)-Verbenol gegeben. Die Transformationsdauer betrug 20 bzw. 42 Stunden (**Abb. 2-11**).

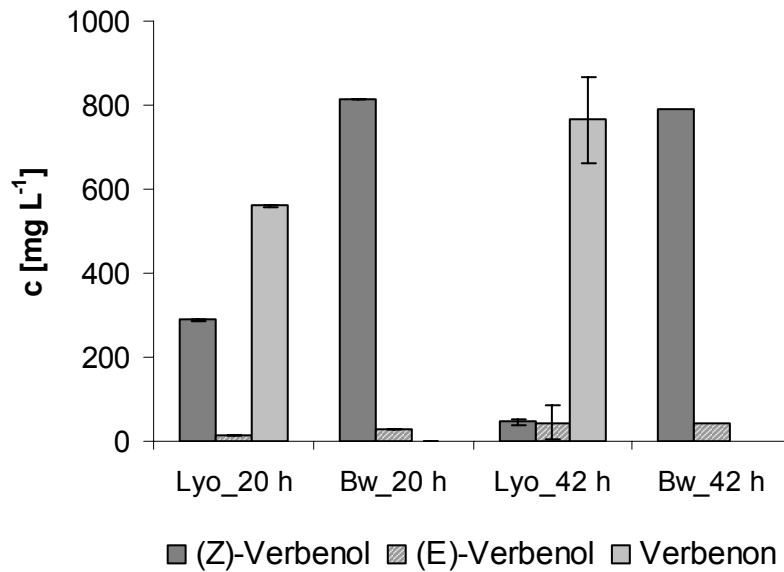


Abb. 2-11 Oxidation von (Z)-Verbenol mit Lyophilisaten von *P. eryngii* nach 20 bzw. 42 Stunden (Lyo = Lyophilisat; BW = Blindwert ohne Lyophilisat)

Die Oxidation von (Z)-Verbenol mit Lyophilisaten von *P. eryngii* ergab nach 20-stündiger Umsetzung eine Ausbeute von 560 mg L^{-1} (54,4 mol%) Verbenon. Nach 42 Stunden konnte eine Steigerung der Oxidation zum Verbenon auf 765 mg L^{-1} (74 mol%) erreicht werden. Die chemische Bildung von Verbenon im Kontrollwert war mit Gehalten von $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (0,1 mol%) vernachlässigbar.

2.1.11 Umsetzung von α -Pinen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* und *P. eryngii*

In den vorangegangenen Experimenten wurde mit *P. sapidus* ein Basidiomycet gefunden, der in der Lage war α -Pinen zu (*E*)-Verbenol und Verbenon zu transformieren. *P. eryngii* besaß die Fähigkeit, Verbenol zu Verbenon zu oxidieren. In beiden Fällen erwiesen sich Lyophilisate zur Transformation als am Besten geeignet. In den folgenden Experimenten sollte durch eine Kombination aus beiden Lyophilisaten zunächst mit *P. sapidus* Verbenol aus α -Pinen produziert und dieses anschließend mit *P. eryngii* zu Verbenon oxidiert werden. Die Umsetzung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden zu 50 mg Lyophilisat von *P. sapidus* (PSA) in 2 mL MOPS-Puffer (pH 7) 7,3 μ L (23 mM) α -Pinen zugegeben, und für 20 Stunden transformiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert, 1,2 mL des Überstands zu 50 mg Lyophilisat von *P. eryngii* (PEI) gegeben und 40 Stunden umgesetzt. Zum Vergleich wurden beide Ansätze einzeln 60 Stunden umgesetzt und ein Kontrollwert (BW) ohne Lyophilisat mitgeführt (**Abb. 2-12**).

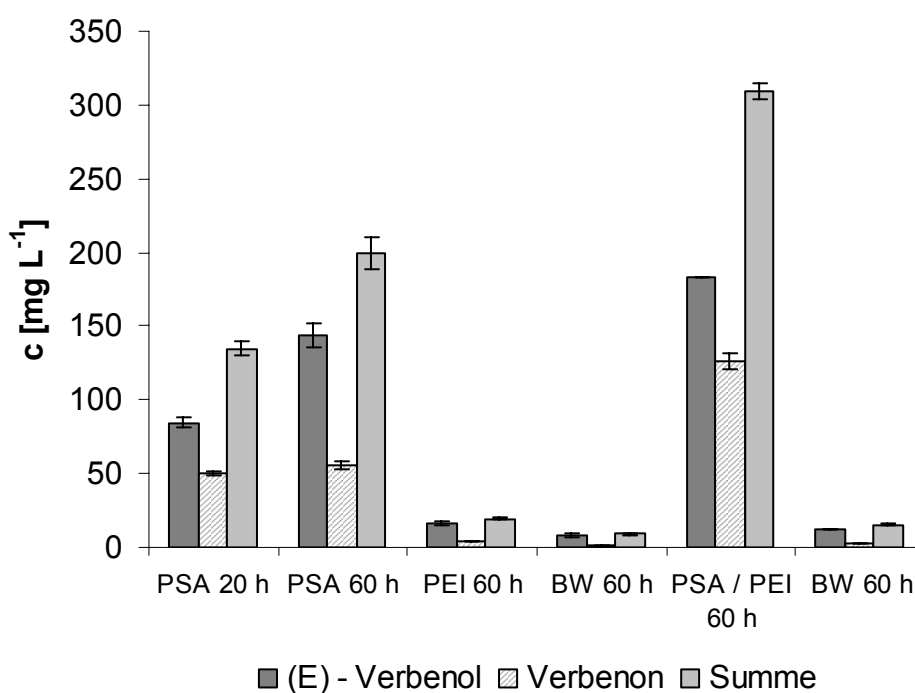


Abb. 2-12 Kombinierte Biotransformation von α -Pinen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* und *P. eryngii*

Die Kombination der beiden Lyophilisate ergab eine deutliche Steigerung der Ausbeute an Verbenon im Vergleich zur Umsetzung mit *Pleurotus sapidus* alleine. Während *Pleurotus eryngii* mit knapp 4 mg L⁻¹ Verbenon (0,12 mol%) und 16 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol (0,46 mol%) innerhalb von 60 Stunden nur Ausbeuten im Bereich des Blindwertes produzierte, konnten mit *Pleurotus sapidus* die Ausbeuten des Screenings mit 144 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol (4,11 mol%) und 56 mg L⁻¹ (1,62 mol%) Verbenon nach 60 Stunden reproduziert werden. Die Kombination brachte höhere Ausbeuten von 183 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol (5,23 mol%) und 126 mg L⁻¹ (3,65 mol%) Verbenon. Die Gehalte des Blindwertes betragen etwa 10 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol und 2 mg L⁻¹ Verbenon.

2.1.12 Teilzusammenfassung

Alle untersuchten Mikroorganismen waren in der Lage, α -Pinen durch allylische Oxidation hauptsächlich zu (*E*)-Verbenol und Verbenon zu transformieren. Dabei zeigte der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* in allen drei Transformationsansätzen die höchsten Ausbeuten an den angestrebten Zielprodukten (*E*)-Verbenol und Verbenon. Die Biotransformation in konzentrierten Kulturen zeigte eine effektive Steigerung der Umsatzrate in Bezug auf die Verbenol- bzw. Verbenonbildung. Mit lyophilisiertem Pilzmyzel konnten, im Vergleich zu Submerskultur und konzentrierter Biomasse, in wesentlich kürzerer Zeit deutlich höhere Konzentrationen an (*E*)-Verbenol und Verbenon erhalten werden. Der Umsatz in mol% blieb dabei für (*E*)-Verbenol auf dem Niveau der Submerskultur, während die Umsetzung zu Verbenon deutlich gesteigert war.

Pleurotus eryngii zeigte in Submerskultur bzw. konzentrierter Biomasse als einziger untersuchter Organismus keine Bildung von (*E*)-Verbenol, und mit 15 mg L⁻¹ vergleichsweise hohe Ausbeuten an Verbenon.

Der Pilz *P. eryngii* war in der Lage (*Z*)-Verbenol zu Verbenon zu oxidieren. Die höchste Oxidationsaktivität erfolgte dabei mit Pilzmyzel und lyophilisierten Kulturen. Mit einem Umsatz zu Verbenon von ca. 75 mol% nach 42 Stunden erwiesen sich die Lyophilisate als sehr effektiv.

Durch die Kombination der Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus eryngii* wurden die Ausbeuten an Verbenon von 55 mg L⁻¹ (*Pleurotus sapidus* alleine) auf 126 mg L⁻¹ mehr als verdoppelt.

2.2 Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen

Die Biotransformation wurde mit einem kommerziell erhältlichen Isomergemisch (α - und β -Isomere) des Sesquiterpens Farnesen (3,7,11-Trimethyl-dodeca-1,3,6,10-tetraen) durchgeführt. Ausgehend von Arbeiten von Kaspera (2004) wurden weitere Organismen als Biokonzentrate und Lyophilisate auf die Fähigkeit zur Transformation untersucht. Aus dem Sesquiterpen sind potenziell interessante aromaaktive Verbindungen zugänglich. Die Arbeiten von Kaspera zeigten die Bildung von 7-(E)-Hydroxyfarnesen als geruchsintensive Verbindung. Ziel war es, weitere aromaaktive oxyfunktionalisierte Verbindungen zu identifizieren und deren Biogenese zu klären.

2.2.1 Eingesetzte Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen zeigt **Tab. 2-4**:

Tab. 2-4 Für die Farnesenbiotransformation eingesetzte Mikroorganismen

Organismus	Kulturführung	Potenzial zur Biotransformation (Literatur)
<i>Aspergillus niger</i> (LB 2025)	Biokonzentrat	Kaspera (2004)
<i>Penicillium solitum</i> (LCI)	Biokonzentrat, Lyophilisat	Brauer (2004)
<i>Thelebolus canninus</i>	Biokonzentrat, Lyophilisat	Brauer (2004), Veddeler (2004)
<i>Stemphylium botryosum</i> (LCI)	Biokonzentrat, Lyophilisat	Brauer (2004)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Lyophilisat	Langhoff (2002), Veddeler (2004)
<i>Pleurotus sapidus</i>	Lyophilisat	Onken (1998), Kaspera (2004)
<i>Trametes versicolor</i>	Lyophilisat	Veddeler (2004)
<i>Marasmius scorodonius</i>	Lyophilisat	Langhoff (2002)

2.2.2 Identifizierung der Transformationsprodukte des Farnesens

2.2.2.1 Vergleich der Transformationsprodukte mit Referenzsubstanzen

Die Transformationsprodukte wurden mittels GC-MS und anhand der Retentionsindices mit kommerziell erhältlichem Farnesol (4 Farnesol-Isomere) und einem Extrakt aus Orangen (angereichert mit α - und β -Sinensal) verglichen. Die Transformationsprodukte zeigten alle abweichende Retentionsindices, oder hatten im EI-MS-Spektrum ein von den Referenzsubstanzen deutlich unterscheidbares Fragmentierungsmuster (**Tab. 2-5**).

Tab. 2-5 Kovats-Indices und charakteristische Fragment-Ionen der Farnesolisomere und Sinensale

Referenz	KI (CW20)	Massenspektren m/z (EI, 70 eV)
Farnesol	2270	222 (M ⁺), 93, 81, 69 (100)
Farnesol	2310	222 (M ⁺), 93, 81, 69 (100)
Farnesol	2326	222 (M ⁺), 93, 81, 69 (100)
Farnesol	2352	222 (M ⁺), 93, 81, 69 (100)
β -Sinensal	2210	218 (M ⁺), 134, 93 (100), 55
α -Sinensal	2310	218 (M ⁺), 133, 93 (100), 55

2.2.2.2 Sensorische Analyse der Transformationsprodukte

Die bei der Biotransformation mit *Aspergillus niger* entstandenen Transformationsprodukte wurden GC-Olfaktometrisch untersucht. Dabei fielen einige Verbindungen mit interessanten fruchtigen Geruchsnoten, die an Aprikose oder Pflaume erinnern, auf. Die Transformationsmetabolite und ihre Kovats-Indices sind in **Tab. 2-6** dargestellt.

Tab. 2-6 Sensorische Untersuchung der Transformationsprodukte des Farnesens (GC-O)

Verbindung	KI (CW20)	Geruchseindruck	Geruchsschwelle [ng] am GC-O-Port
[1a]	2070	Fruchtig	~100
[1b]	2110	fruchtig, Aprikose	~50
[1]	2150	fruchtig, Pflaume	~50
3-(Z)-7-Hydroxyfarnesen	2273	Zitrone	~50
3-(E)-7-Hydroxyfarnesen	2294	Orange, Mandarine	~50
Unbekannt M ⁺ 218	2310	-	-
Unbekannt M ⁺ 218	2344	blumig, fruchtig	~20

2.2.2.3 Identifizierung der Oxidationsprodukte

3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen wurde über einen Vergleich mit bekannten Spektren, sowie über den Kovats-Index (Kaspera, 2004) identifiziert. Es lag bei nahezu allen Transformationsansätzen als Hauptverbindung mit Gehalten von bis zu 60 mg L⁻¹ vor. 3-(*Z*)-7-Hydroxyfarnesen besitzt ein nahezu identisches Massenspektrum wie das 3-(*E*)-Isomer. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit publizierten Massenspektren (Fielder et al., 1998).

Zudem wurden weitere geruchsaktive Verbindungen (RI (CW) 2150 [1], 2110 [1b] und 2070 [1a]) detektiert, die nur von *Aspergillus niger* gebildet wurden. Durch einen Vergleich der Massenspektren konnten zwei weitere Verbindungen mit ähnlichen Fragmentierungsmuster im EI-MS identifiziert werden, wobei es sich vermutlich um Strukturisomere handelt. Das Chromatogramm der mittels Kieselgel gereinigten Transformationsansätze (5.8.3) zeigt **Abb. 2-13**. Die Zielverbindungen befanden sich alle in der Fraktion mit der Zusammensetzung Pentan / Diethylether 60:40 (v/v).

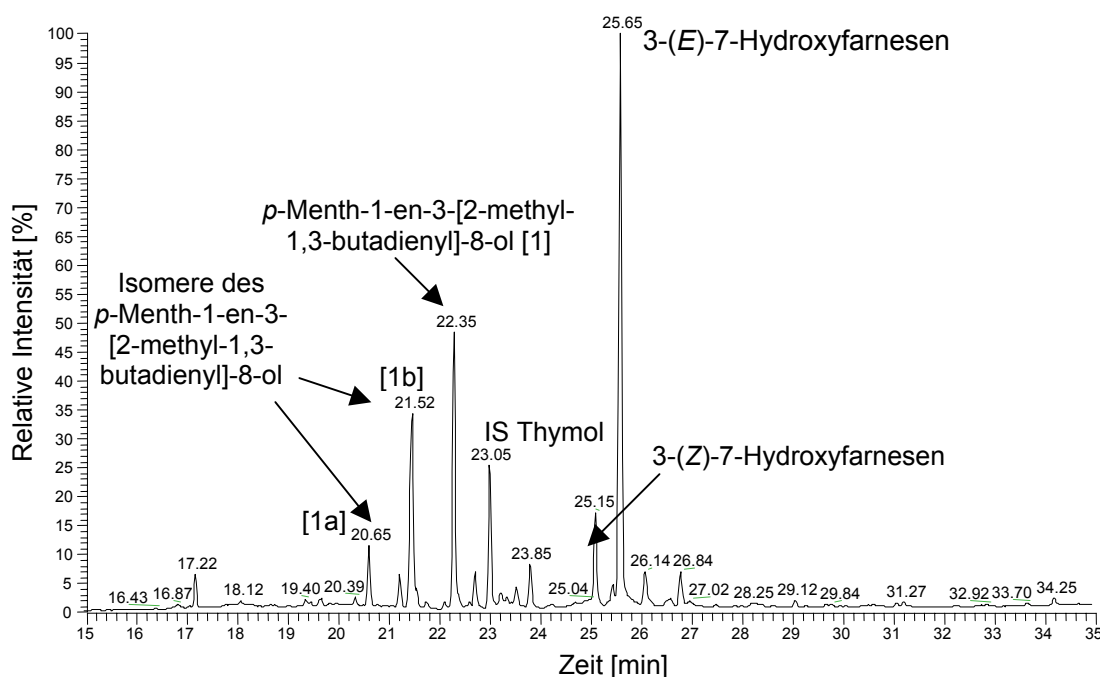


Abb. 2-13 GC-MS-Chromatogramm der oxyfunktionalisierten Produkte aus der Kieselgelfraktion Pentan/Diethylether 60:40

Zur Identifizierung von **[1]** wurden die Extrakte der Transformationsansätze durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (5.8.3) vom restlichen Farnesenisomerenmisch abgetrennt. Die Fraktion Pentan/Diethylether 60:40 (**Abb. 2-13**) wurde mittels präparativer Gaschromatographie (5.8.4.7) weiter gereinigt und die Zielverbindung in einer Ausbeute von 1,5 mg mit einer Reinheit von > 95% isoliert. Den Reinigungserfolg zeigt **Abb. 2-14**:

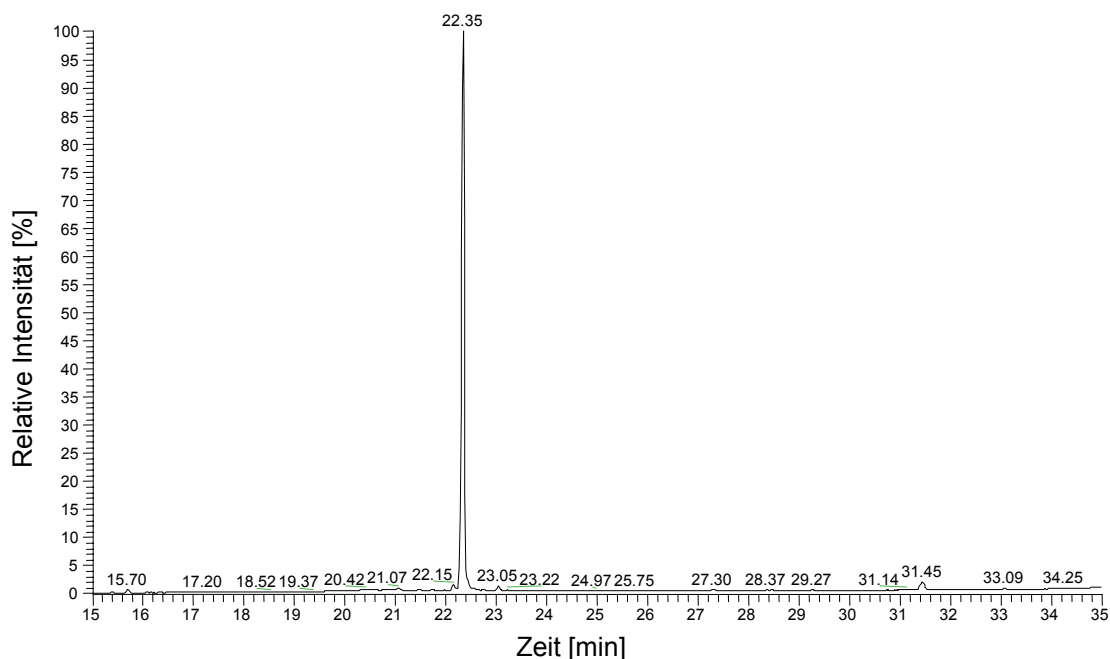


Abb. 2-14 Isolierung des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]** mittels präparativer Gaschromatographie

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$, HMQC und HMBC und ROESY.

Die chemischen Verschiebungen wurden mit den theoretisch errechneten Daten nach dem Inkrementsystem (Hesse et al., 2002) verglichen (**Tab. 2-7**).

Tab. 2-7 $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol und Vergleich mit den theoretisch berechneten Daten (ChemDraw 2002); (ber. =berechnet)

Position	$\delta \text{ H (m, J in Hz)}$	$\delta \text{ H ber.}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ C ber.}$	Multiplizität
1	-		134,2	141,1	C
2	2,05 (m)	1,96	31,5	34,9	CH_2
3	1,72, 1,81 (m)	1,61	19,3	23,3	CH_2
4	1,72 (m)	1,74	48,3	55,9	CH
5	3,30 (m)	2,63	35,8	23,9	CH
6	-		72,8	71,6	C-OH
7	5,51 (<i>br d</i> 10,5)	5,34	132,6	126,2	CH
8	-		132,2	137,4	C
9	6,35 (ddd 17,8;10,7; 0,75)	6,25	141,6	136,9	CH
10a	5,11 (ddd 17,8; 0,95; 0,60);	5,16	111,4	116,3	CH_2
10b	4,95 (ddd 10,7; 0,95; 0,60)	5,02			
11	5,15 (<i>dq</i> 7,3; 1,35)	5,37	122,9	124,3	CH
12	1,21 (s)	1,26	28,0	28,4	CH_3
13	1,22 (s)	1,26	28,5	28,4	CH_3
14	1,71 (<i>br s</i>)	1,71	23,4	23,2	CH_3
15	1,82 (d 1,3)	1,71	11,9	17,2	CH_3

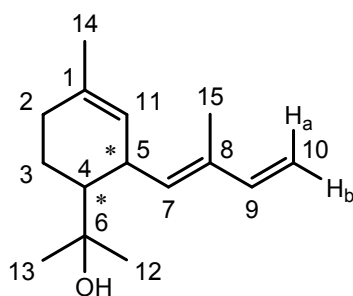


Abb. 2-15 Struktur des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [1]

Das ^{13}C -Spektrum und das ^1H -Spektrum sind in Übersicht in **Abb. 2-16** bzw. **2-17** dargestellt.

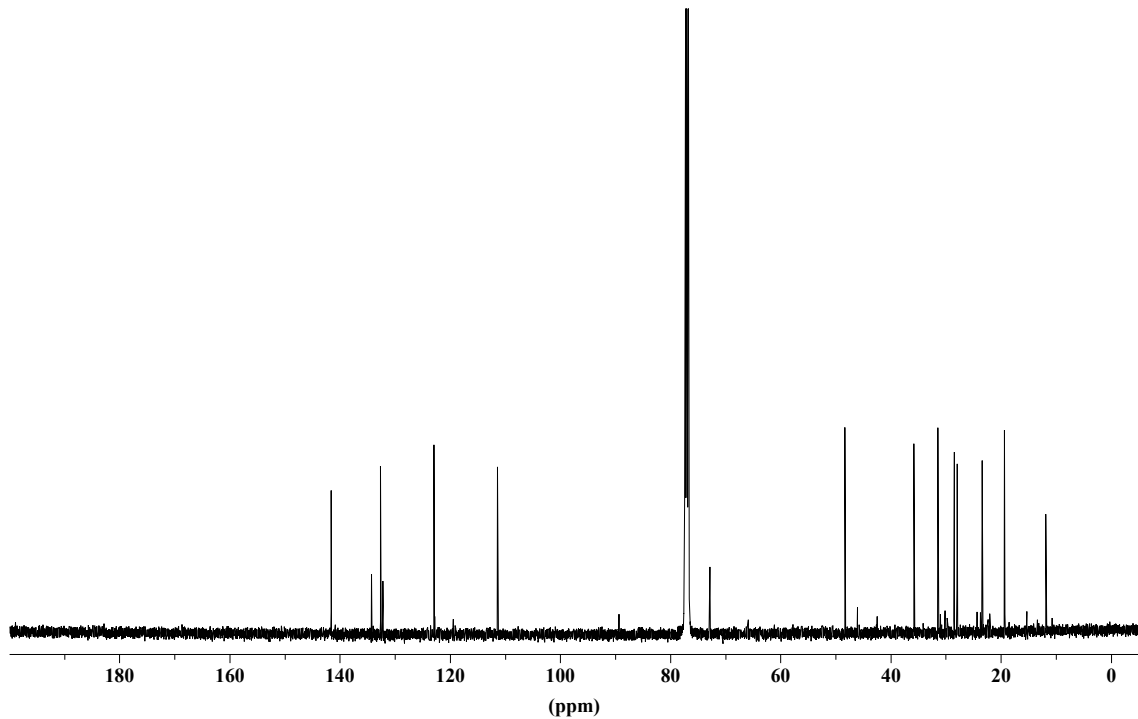


Abb. 2-16 ^{13}C -NMR-Spektrum von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol

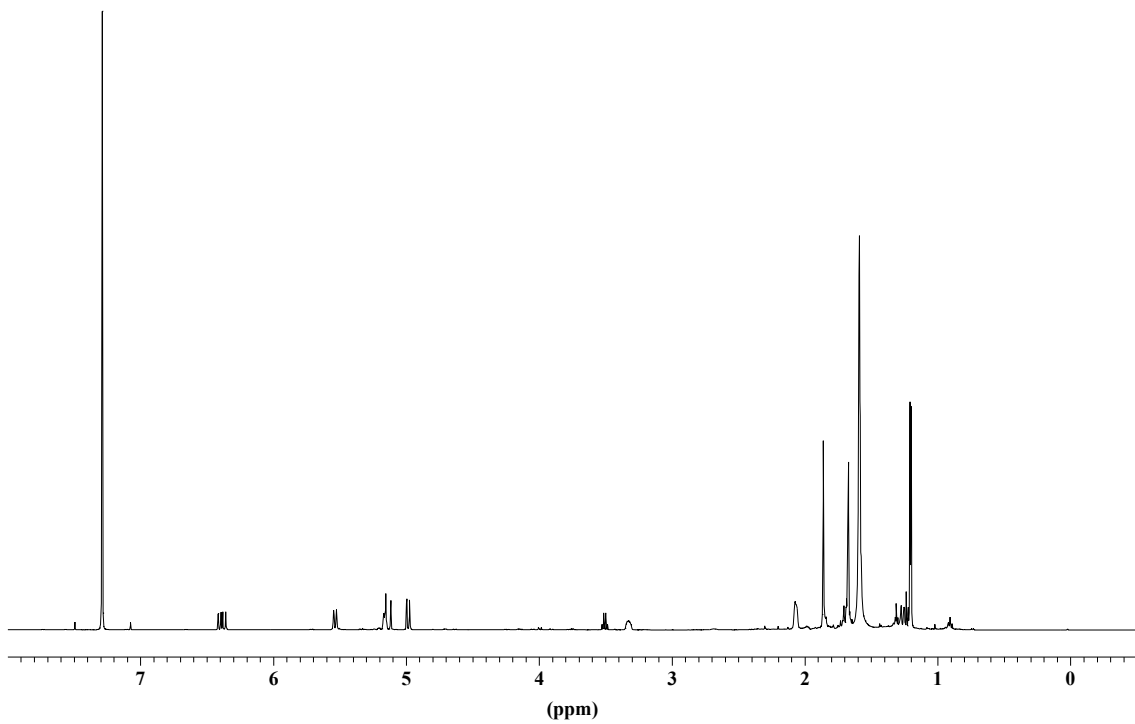


Abb. 2-17 ^1H -Spektrum von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol

Die NMR-Daten zeigen Molekül **[1]** (Abb. 2-15) mit C=C-Bindungen in den Positionen 1,11 7,8 9,10. Sechs C-Atome wiesen eine starke Entschirmung mit einer chemischen Verschiebung von 110 - 144 ppm auf. Dies ist typisch für Doppelbindungen, woraus sich insgesamt drei Doppelbindungen ergeben. Drei C-Atome mit 72,8 (C6) 132,2 (C8) und 134,2 (C1) ppm zeigten im zweidimensionalen HMQC keine Kopplung zu einem H-Atom, und liegen somit als quartäre C-Atome vor, zwei als C=C. Die ^1H -Verschiebungen wurden über ^1H , ^{13}C -spin-spin-Korrelation den jeweiligen C-Atomen zugeordnet. Die Daten deuten auf einen Ringschluss mit drei Doppelbindungen hin, wovon zwei an quartären C-Atomen lokalisiert sind. Die Seitenkette (C7-C10) zeigt konjugierte Doppelbindungen in Position 7,8 und 9,10. Das Proton von C7 koppelt mit den Protonen von C15 ($^3J=7,9$ Hz) und mit dem Proton von C9 ($^3J=10,7$ Hz) Untersuchungen mittels ROESY bestätigten die 7,8 (*E*)-Struktur. Das Proton von C7 zeigt eine starke ROE-Konnektivität zu dem Proton von C9, während das Proton von C5 ein starkes ROE-Kreuzsignal zu den Protonen von C15 aufweist. Hierdurch wird die (*E*)-Struktur bestätigt.

Das Proton von C5 koppelt mit dem Proton von C11 und dem Proton in Position C4. Die Kopplungen belegen einen Ringschluss zwischen C4 und C5. Die Position der OH-Gruppe wurde aufgrund der Kopplungen mittels HMBC abgeleitet. Die Hydroxygruppe befindet sich in Position C6, was noch zusätzlich über einen Vergleich mit α -Terpineol, das ebenfalls eine *p*-Mentha-1-en-8-ol-Struktur aufweist, abgesichert wurde. Die Protonen von C9 und C10 zeigen eine typische Verschiebung von 1,21 bzw. 1,22 ppm. Ebenso stimmt die chemische Verschiebung des tertiären C-Atoms mit 72,8 ppm ziemlich genau mit Verbindung **[1]** überein.

Das Massenspektrum (**Abb. 2-18**) zeigt Verbindung **[1]** mit einem schwachen Molekülion bei m/z 220, und dem Basispeak bei m/z 59, der durch Abspaltung des Isopropanol-Restes entsteht.

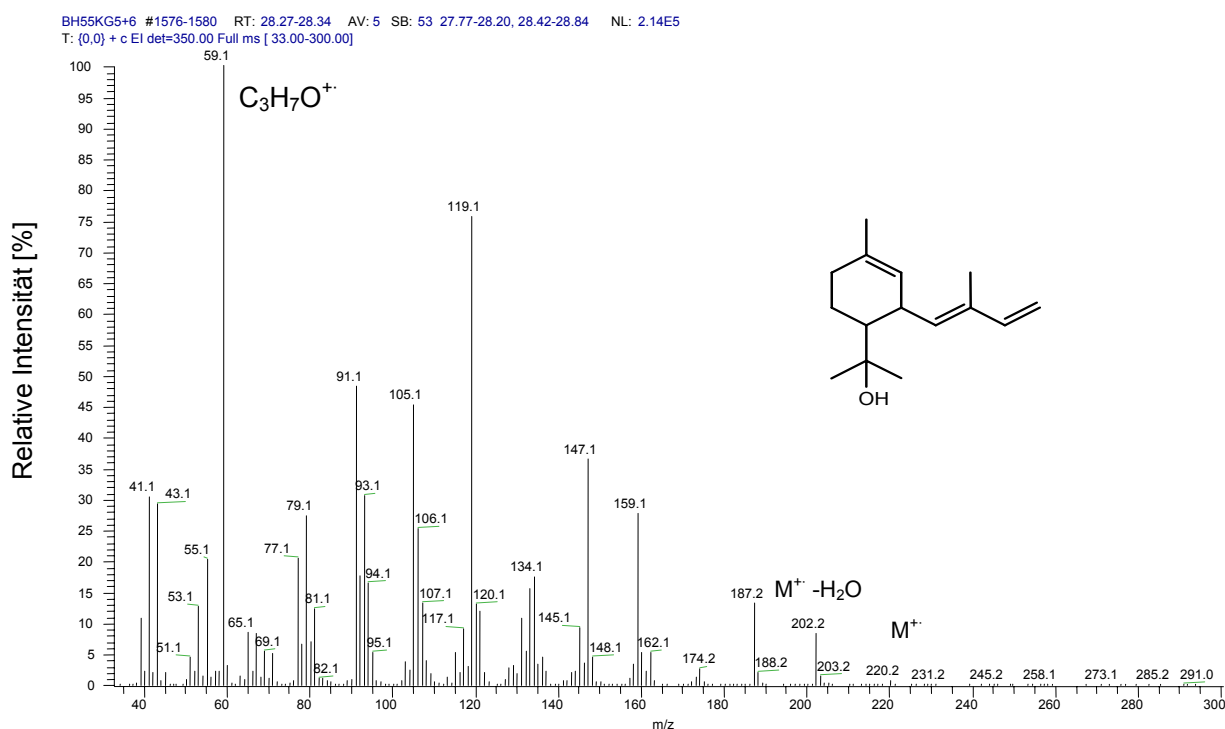


Abb. 2-18 Massenspektrum von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]**

Die Struktur des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol konnte durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Diese Verbindung entsteht durch einen Ringschluss aus α -Farnesen. Diese Verbindung ist in der Literatur bislang nicht erwähnt und daher als neuer Naturstoff einzustufen (Abb. 2-19).

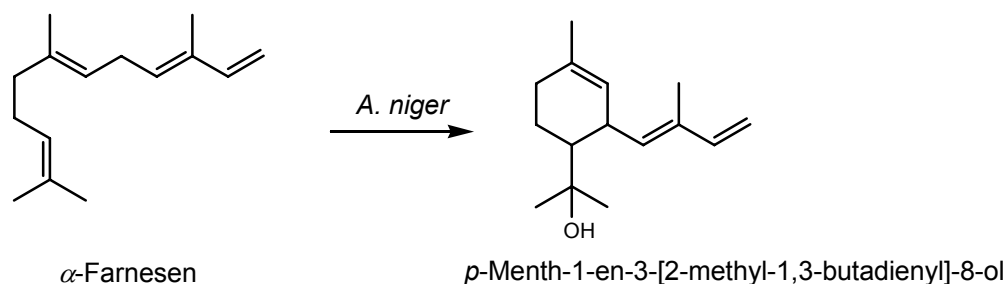


Abb. 2-19 Bildung von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol aus α -Farnesen durch *A. niger*

2.2.2.4 Silylierungen

p-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [**1**], sowie die postulierten Strukturisomere [**1a**, **1b**] wurden über Nacht nach 5.9.2 mit BSTFA silyliert. Im EI-MS wurden Hauptfragmente mit m/z 131 und 73 identifiziert. Das Massenspektrum des silylierten Terpenalkohols [**1**] zeigt das erwartete Molekölion bei m/z 292. Das Hauptfragment m/z 131 entsteht aus der Abspaltung des silylierten Isopropanyl-Restes vom Ring. Die Silylierung der Isomere [**1a**, **1b**] ergab ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster im EI-MS (siehe 6.1) (**Abb. 2-20**).

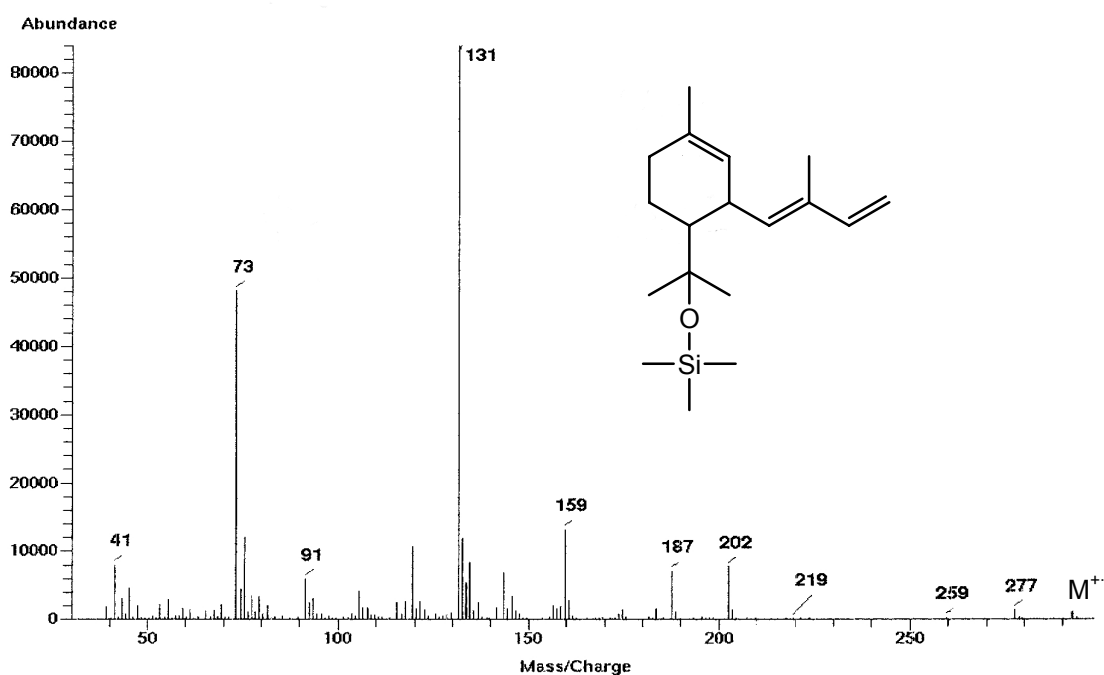


Abb. 2-20 Silylierte Probe von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [**1**]

2.2.2.5 Untersuchungen zur Stereochemie

p-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [**1**] verfügt über zwei Stereozentren in den Positionen 4 und 5. Für den Fall einer stereoselektiven Bildung von [**1**] müsste das Konzentrationsverhältnis stark in Richtung eines Isomeren verschoben sein. Die gereinigten Probenextrakte wurden auf einer chiralen Säule getrennt und die Enantiomerenverhältnisse bestimmt. Für *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [**1**] ergab sich ein racemisches Verhältnis. Auch Verbindung [**1b**] zeigte eine racemische Enantiomerenverteilung. Hierbei handelt es sich vermutlich um das analoge Diastereomerenpaar von [**1**]. Für 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen wurde ebenfalls eine chirale Trennung durchgeführt. Auch hier konnte eine Enantiomerenverteilung von 1:1 festgestellt werden (**Abb. 2-21**, **Tab. 2-8**).

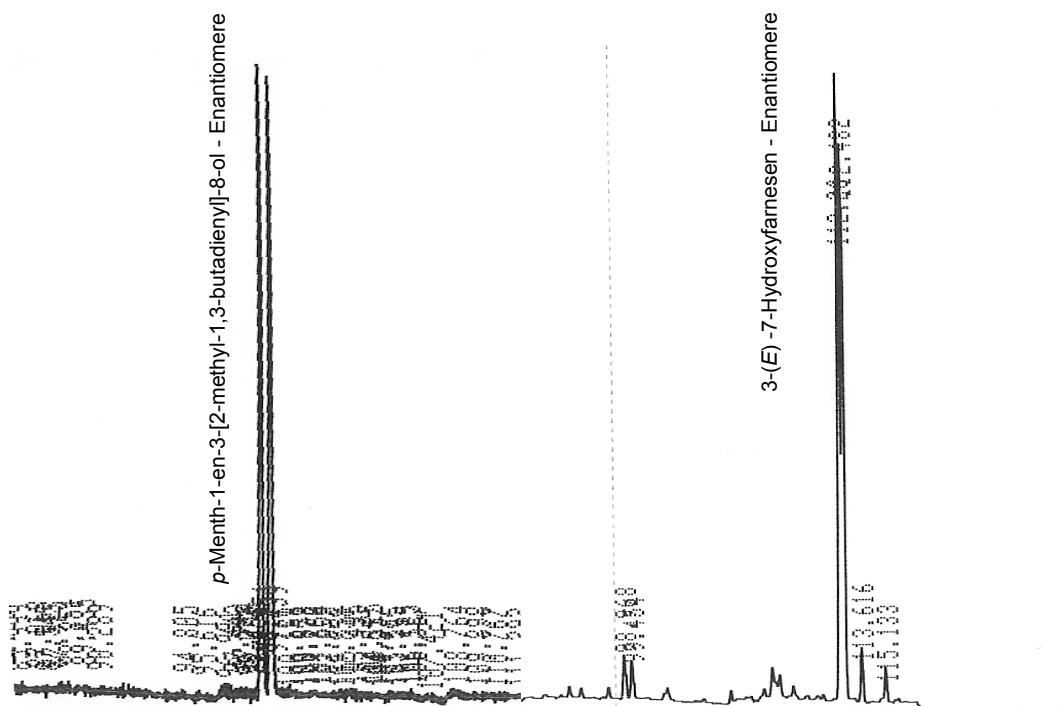


Abb. 2-21 Trennung der Enantiomeren von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, sowie von 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen

Tab. 2-8 Berechnung der Enantiomerenverhältnisse von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol und 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen

Produkt	Area Enantiomer A	Area Enantiomer B
<i>p</i> -Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol	40096	40696
ee(%)		0,74
3-(<i>E</i>)-7-Hydroxyfarnesen	36249	36590
ee(%)		0,47

Die berechneten Werte des Enantiomerenüberschusses unterliegen in diesem Bereich den analytischen Schwankungen, so dass man hier nicht von einem wirklichen Enantiomerenüberschuss sprechen kann.

Mit der Verbindung **[1b]** wurden aufgrund der geringen Mengen und der damit verbundenen Co-Elution von Verunreinigungen keine chiralen Messungen durchgeführt. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein *cis*- / *trans*- Isomer von **[1]**.

2.2.2.6 Stabilität der Transformationsprodukte

Die gebildeten Farnesenalkohole zeigten nach einem Bildungsmaxima bei 24 Stunden eine starke Abnahme der Produktkonzentration (2.2.3) Aus der Biotransformation von Farnesen mit *A. niger* wurde 6-Methyl-5-hepten-2-on mit einem Retentionsindex von 1344 (Lit.: 1321 (CW 20); Kondjoyan et al., 1996) mit Gehalten von 10 mg L⁻¹ quantifiziert. Die Verbindung ist als Spaltprodukt des 3-(*E*)-7-Hydroperoxyfarnesens, welches bei der Autoxidation von Farnesen entsteht bekannt (Anet, 1969). Es kann jedoch auch direkt aus aus 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen gebildet werden (Whitaker et al., 2000) (**Abb. 2-22**). Das Massenspektrum ist in **Abb. 2-23** dargestellt.

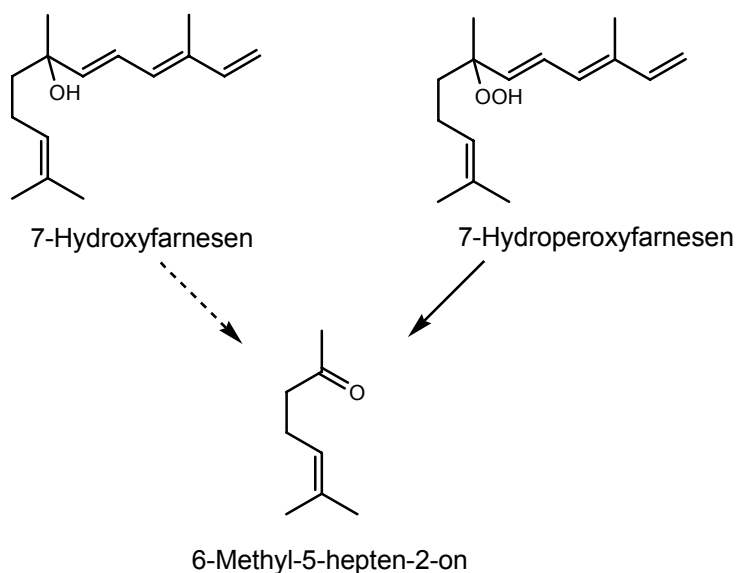


Abb. 2-22 Bildung von 6-Methyl-5-hepten-2-on aus 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen und dem entsprechenden Hydroperoxid

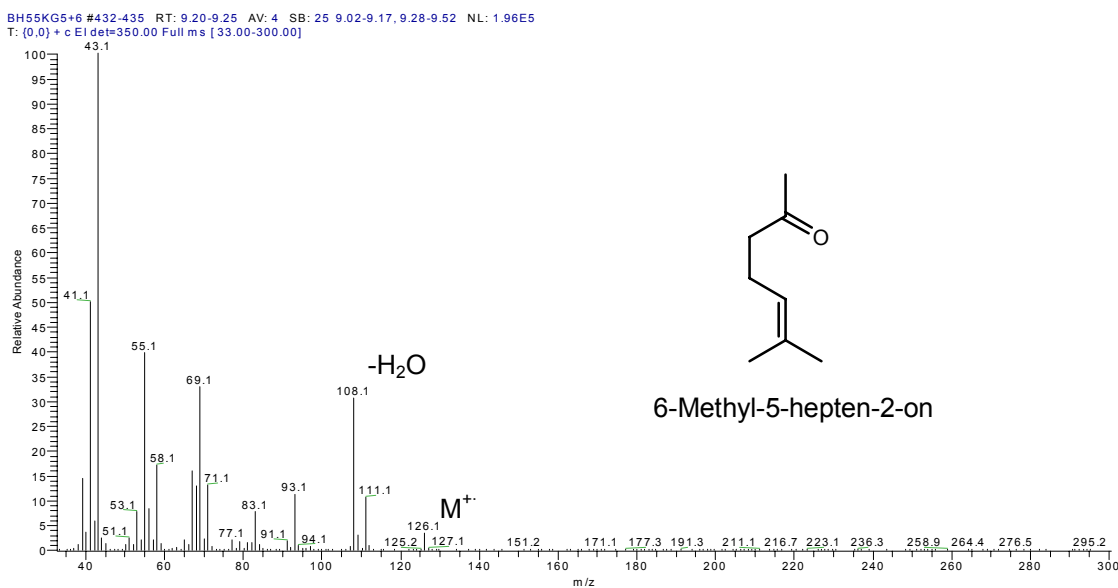


Abb. 2-23 Massenspektrum von 6-Methyl-5-hepten-2-on

2.2.3 Biotransformation mit konzentriertem Pilzmyzel

Für die Umsetzung erhöhter Biomasse wurden zu 33 g Biofeuchtmasse und 17 mL frischem SNL-H-Medium 0,5% Farnesenisomerenge-misch (v/v; 25 mM) gegeben und die Transformation für 24 Stunden durchgeführt (5.5.3.1). Die Extraktion erfolgte nach 5.7.4. Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard Thymol (Abb. 2-24).

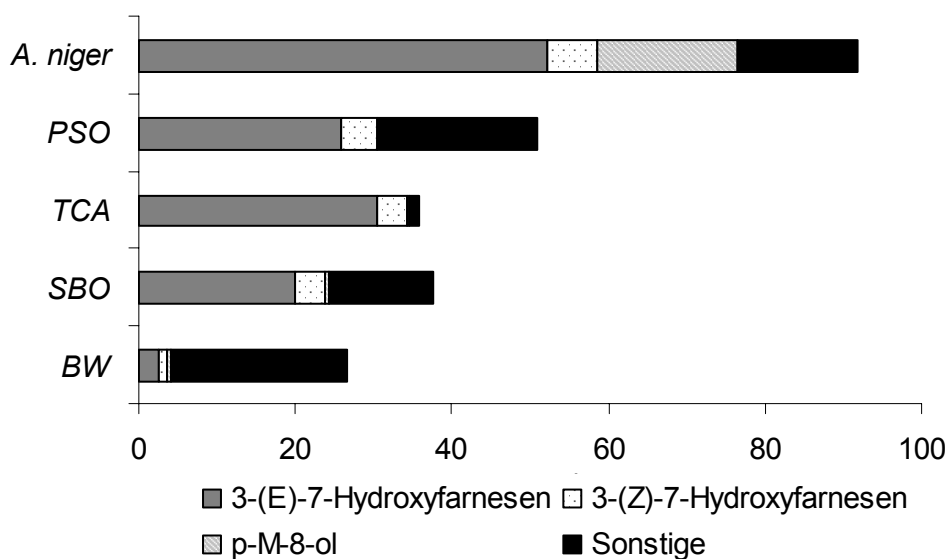


Abb. 2-24 Biotransformation mit konzentrierten Kulturen; PSO = *Penicillium solitum*; TCA = *Thelebolus canninus*; SBO = *Stemphylium botryosum*; BW = chemischer Blindwert; p-M-8-ol = *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol

Hauptprodukt der Biotransformation war 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen mit Ausbeuten bis zu 50 mg L⁻¹ durch *A. niger*, während die anderen untersuchten Organismen Gehalte zwischen 20-30 mg L⁻¹ bildeten. Zwei weitere Verbindungen mit Retentionsindices von 2310 und 2344 wurden in Konzentrationen von etwa 5 mg L⁻¹ detektiert. Bei diesen Substanzen handelt es sich jedoch nicht um Transformationsprodukte aus der Biotransformation, da sie im chemischen Blindwert mit Gehalten von bis zu 9 mg L⁻¹ in gleicher oder höherer Konzentration ebenfalls vorhanden waren. Zudem wurde das als 3-(*Z*)-7-Hydroxyfarnesen identifizierte Transformationsprodukt in Gehalten von bis zu 10 mg L⁻¹ (*A. niger*) gebildet. *A. niger* bildete als einziger Organismus die *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ole **[1, 1a, 1b]** mit Ausbeuten von bis zu 25 mg L⁻¹, bzw. 12 mg L⁻¹ **[1b]** und 5 mg L⁻¹ **[1a]**.

Die Produktbildung wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Kaspera (2004) nach 24 Stunden untersucht, da sich hier die höchsten Produktkonzentrationen zeigten. Im weiteren Verlauf der Transformation nach 48 bzw. 72 Stunden nahm die Konzentration der Metabolite deutlich ab (**Abb. 2-25**).

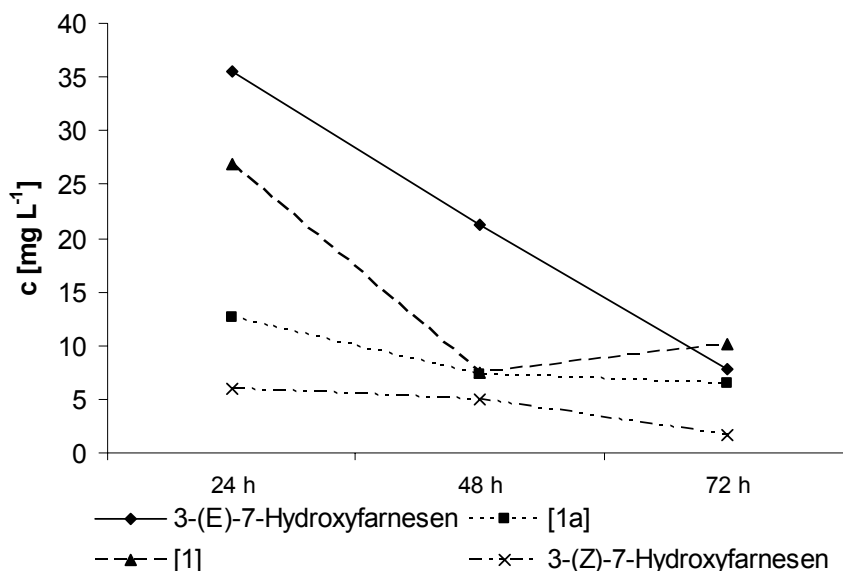


Abb. 2-25 Konzentration der Transformationsprodukte von *Aspergillus niger* über 24 - 72 Stunden

Parallel wurden auch Kontrollwerte unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Es zeigten sich nur geringe Konzentrationen an Transformationsprodukten mit $< 2 \text{ mg L}^{-1}$ für 3-(E)-7-Hydroxyfarnesen. Eine Ausnahme bilden die Verbindungen mit KI 2310 bzw. 2344, die mit Gehalten von 6 bzw. 8 mg L^{-1} deutlich über denen der Biotransformationsansätze lagen. *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol **[1]** sowie die postulierten Strukturisomere **[1a,b]** wurden im chemischen Blindwert nicht nachgewiesen (**Abb. 2-26**).

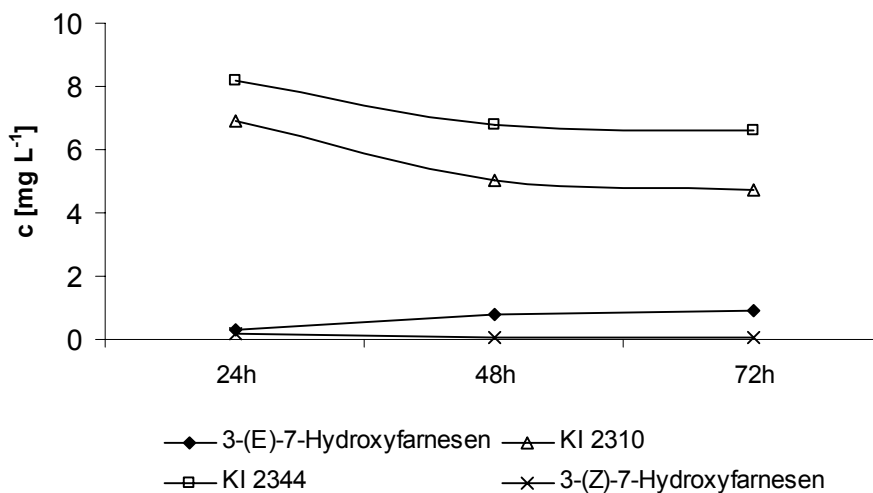


Abb. 2-26 Produktbildung im chemischen Blindwert

2.2.4 Umsetzung mit (*E*)- β -Farnesen

Die Umsetzung mit kommerziell erhältlichen (*E*)- β -Farnesen (95%) wurde analog zu den Transformationsexperimenten des Farnesenisomerengemisches mit konzentriertem Pilzmyzel durchgeführt. (5.5.3.1) Das eingesetzte Farnesenisomerengemisch bestand hauptsächlich (90%) aus den Isomeren des α -Farnesens und zu einem geringen Teil (3%) aus β -Farnesen (**Abb. 2-27**).

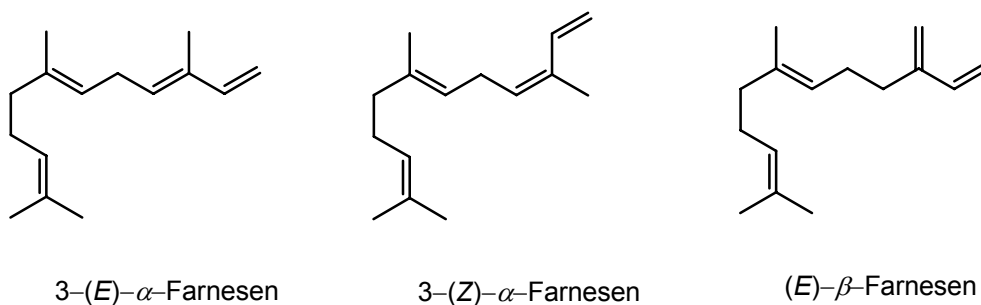


Abb. 2-27 Hauptkomponenten des zur Biotransformation eingesetzten Farnesenisomerengemisches

Es sollte untersucht werden, ob der Einsatz von (*E*)- β -Farnesen ebenfalls zu einer Bildung von Transformationsprodukten führte. Zudem sollte durch einen Vergleich mit der Umsetzung des Isomerengemisches von α -Farnesen geklärt werden, ob sich einige Produkte vom α - oder β -Farnesen ableiten lassen. Die Produktidentifizierung erfolgte mittels GC-MS.

Der Vergleich der Transformationsprodukte aus der Umsetzung mit (*E*)- β -Farnesen mit denen des chemischen Blindwertes zeigte, bis auf einen kleinen Peak bei 34,5 min (M^+ 189) der sensorisch unauffällig war und daher nicht weiter untersucht wurde, keine signifikanten Unterschiede in der Produktbildung (**Abb. 2-28**).

Die Gehalte an möglichen Transformationsprodukten waren mit denen des Kontrollwertes identisch oder lagen teilweise noch darunter. Auch wurden durch einen Vergleich der Massenspektren keine Transformationsprodukte gefunden, die durch die Biotransformation mit dem Farnesenisomerengemisches entstanden sind.

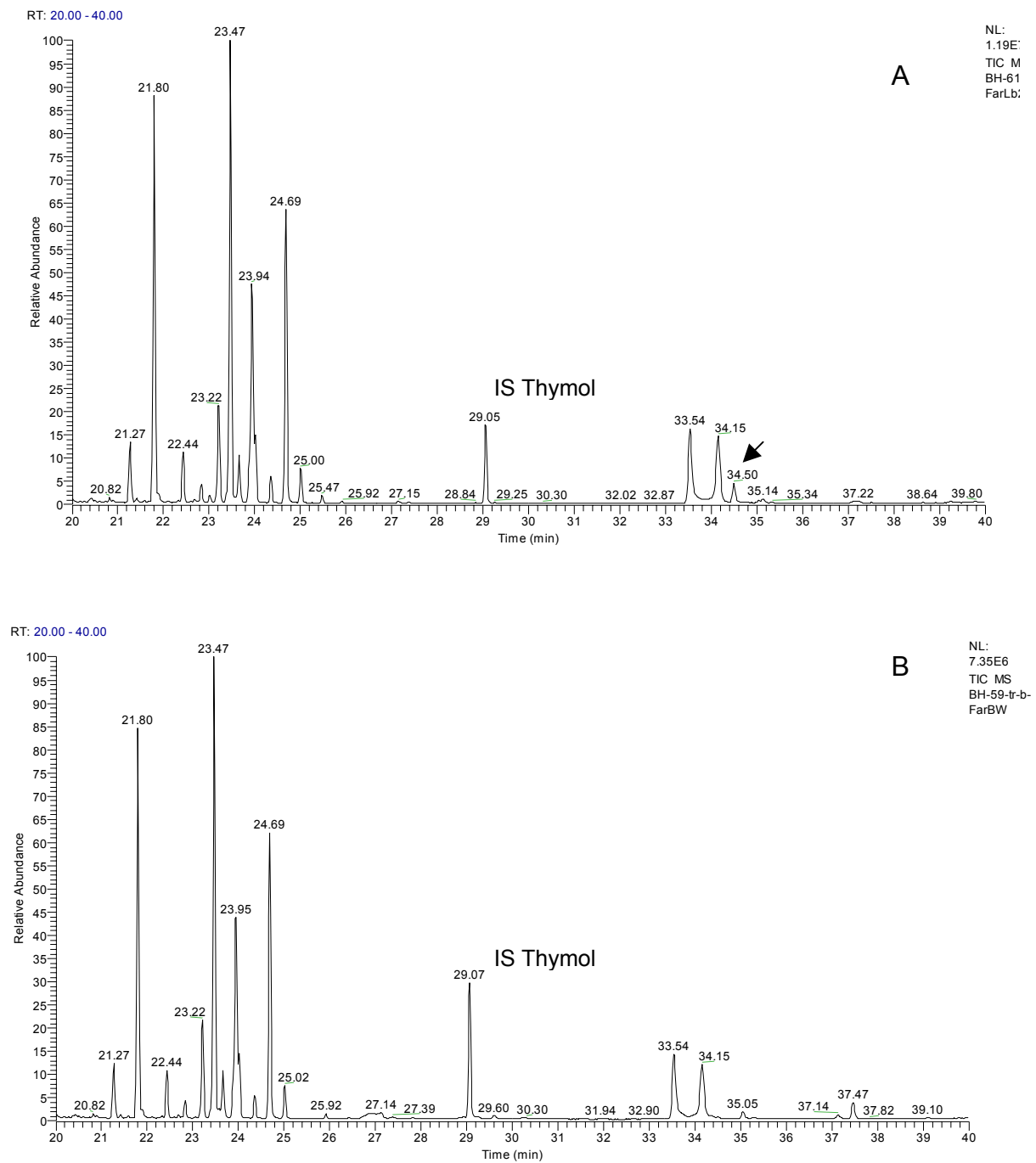


Abb. 2-28 Vergleich der Transformationsprodukte von (*E*)- β -Farnesen mit Biokonzentraten von *A. niger* (A) und im chemischen Blindwert (B)

2.2.4 Biotransformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel

Die Umsetzung mit Lyophilisaten erfolgte nach 5.5.3.2 in Mikroansätzen mit 1,5 mL Probevolumen. In Anlehnung an die Arbeiten von Kaspera wurden 27,4 mM (7,3 μ L) des Farnesengemisches zu den rehydratisierten Lyophilisaten gegeben und für 20 Stunden umgesetzt. Das Haupttransformationsprodukt war 3-(E)-7-Hydroxyfarnesen mit Ausbeuten von bis zu 30 mg L⁻¹ und eine Verbindung mit einem KI von 2265 (CW20), die im Kontrollwert mit bis zu 20 mg L⁻¹ gebildet wurde, in den Transformationsansätzen aber nur Konzentrationen <5 mg L⁻¹ erreichte und daher nicht weiter untersucht wurde. Die aus den Ansätzen mit erhöhter Biofeuchtmasse aus *A. niger* identifizierte Verbindung *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol wurde in keinem der untersuchten Ansätze detektiert (**Abb. 2-29**).

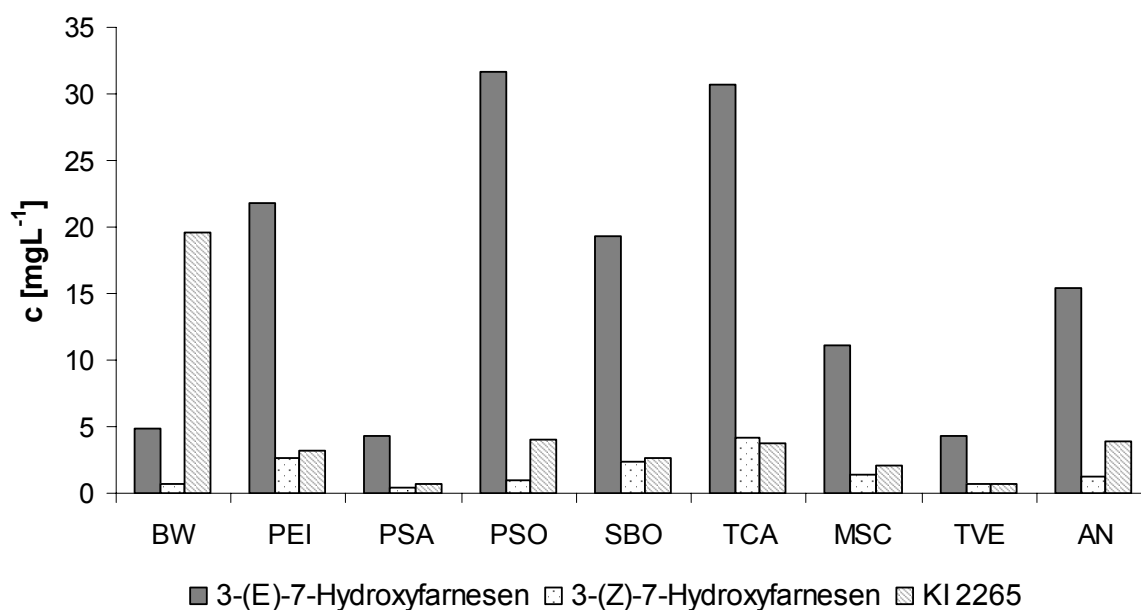


Abb. 2-29 Biotransformation von Farnesen mit ausgewählten Lyophilisaten. BW = Blindwert; PEI = *Pleurotus eryngii*; PSA = *Pleurotus sapidus*; PSO = *Penicillium solitum*; SBO = *Stemphylium botryosum*; TCA = *Thelebolus caninus*; MSC = *Marasmius scorodonius*; TVE = *Trametes versicolor*; AN = *Aspergillus niger*

2.2.5 Teilzusammenfassung

Die Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen führte zu einer Reihe aromaaktiver Verbindungen. Haupttransformationsprodukt mit Ausbeuten von bis zu 60 mg L^{-1} (1,1 mol%) war 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen, zudem wurde das 3-(*Z*)-Isomer identifiziert. Die Konzentrationen lagen hier im Bereich von etwa 10 mg L^{-1} (0,2 mol%).

Ein als *A. niger* identifizierte Ascomycet produzierte eine Reihe aromaaktiver Verbindungen mit fruchtiger Note, die sonst von keinem anderen untersuchten Organismus gebildet wurden und die im chemischen Blindwert nicht nachweisbar waren.

Eine Verbindung wurde mittels NMR-Spektrometrie als *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol identifiziert. Zwei potentielle Strukturisomere dazu wurden mittels EI-MS identifiziert. Die Verbindung ist bislang in der Literatur nicht erwähnt und ist daher als neuer Naturstoff einzuordnen.

Die Umsetzung mit Lyophilisaten ergab Ausbeuten von bis zu 30 mg L^{-1} 3-(*E*)-7-Hydroxyfarnesen. Die Ausbeute konnte im Vergleich zu den konzentrierten Kulturen jedoch nicht gesteigert werden. *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol wurde in keinem der Ansätze mit Lyophilisaten identifiziert.

2.3 Spaltung von Carotinoiden mit Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*

Die Spaltung von Carotinoiden führt zu geruchsintensiven Verbindungen, den sogenannten Norisoprenoiden. Die Bildung von norisoprenoiden Verbindungen durch eine polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden (Langhoff, 2002; Veddeler, 2004). Am Beispiel von *Marasmius scorodonius* soll die Spaltung von Carotinoiden zu aromaaktiven Verbindungen gezeigt werden. *Marasmius scorodonius* zeigte bereits in vorausgegangenen Arbeiten einen effektiven Abbau von β,β -Carotin (Zorn et al., 2003b). Für die Spaltung sind zwei Peroxidasen verantwortlich, die bereits molekularbiologisch charakterisiert wurden. (Scheibner, 2006; Hülsdau, 2007)

Der enzymatische Abbau sollte zudem mittels HPLC untersucht werden, um zusätzlich nicht-flüchtige Spaltprodukte zu identifizieren. Neben den eingesetzten Carotinoiden wurden auch potentielle Spaltprodukte des β,β -Carotinabbaus eingesetzt, um deren weiteren Abbau zu prüfen.

2.3.1 Die Spaltung ausgewählter Substrate

Für die Spaltung wurden die in **Abb. 2-30** aufgeführten Verbindungen eingesetzt. β,β -Carotin war als einzige Verbindung kommerziell zugänglich. Lutein wurde durch Verseifung von Luteinestern aus „Marigold-Oleorosin“, einer Zubereitung aus *Tagetes erecta* (5.12.1.2.) isoliert. Zeaxanthin und Lycopin wurden von DSM zur Verfügung gestellt. Die Xanthophylle Neoxanthin und Violaxanthin wurden aus tiefgefrorenem Spinat isoliert. Die Apocarotinale β -Apo-8'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal wurden von BASF bereitgestellt und als Referenzsubstanzen des β,β -Carotinabbaus eingesetzt. Die Substanzen wurden aber auch selbst für die enzymatische Spaltung verwendet.

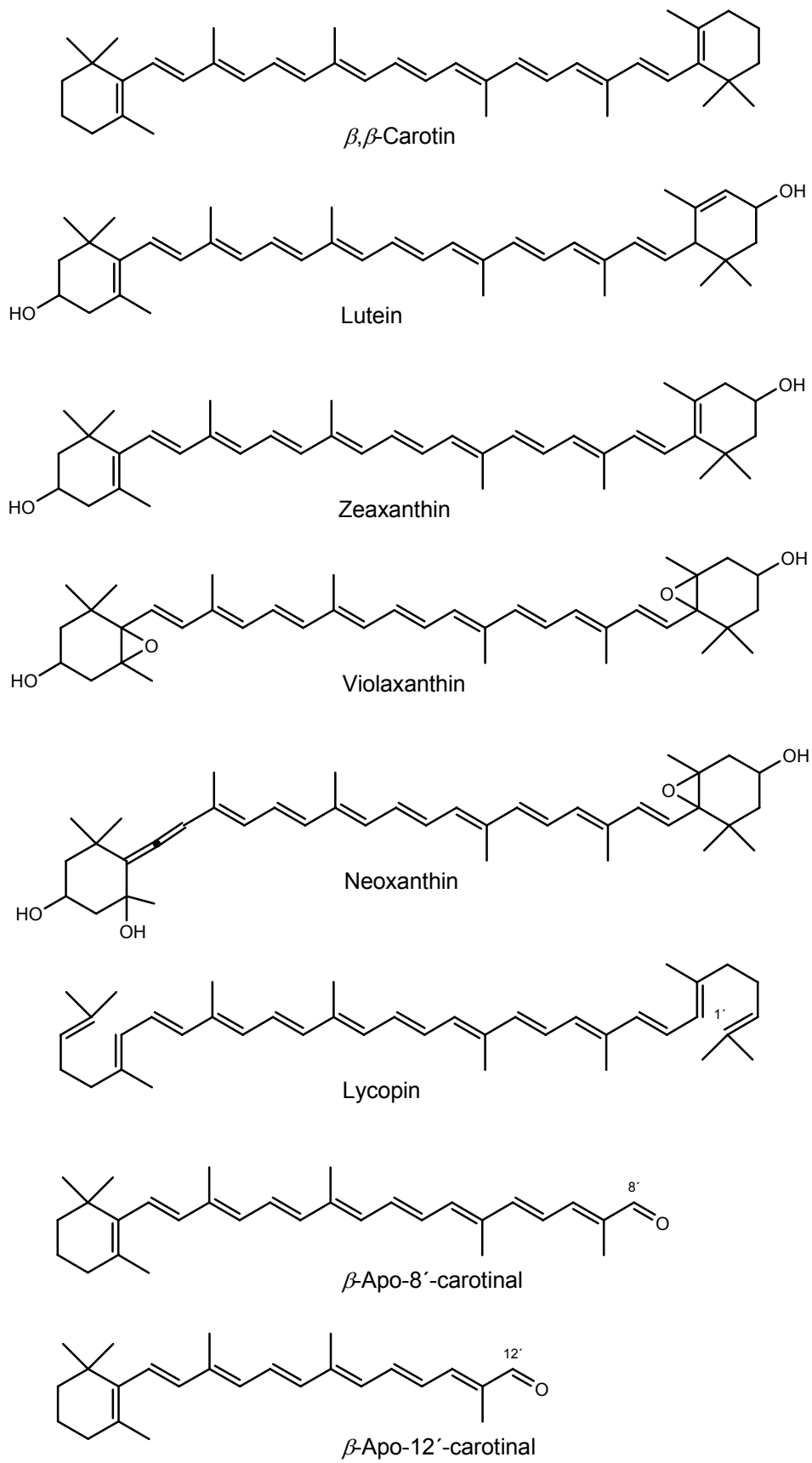


Abb. 2-30 Für den enzymatischen Abbau eingesetzte Substrate

2.3.1.1 Extraktion der Xanthophylle aus Spinat

Für die Herstellung eines Spinatextraktes wurde handelsüblicher, tiefgekühlter Blattspinat verwendet und nach 5.12.1.1 aufgearbeitet. Die Ausbeute an Spinatextrakt betrug $8,82 \text{ g kg}^{-1}$. Die Konzentration der zur Spaltung einzusetzenden Xanthophylle wurde photometrisch bestimmt, die Reinheit mittels HPLC überprüft. Die Ausbeute an Neoxanthin betrug $18,5 \text{ mg kg}^{-1}$, für Violaxanthin $38,8 \text{ mg kg}^{-1}$.

2.3.1.2 Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin mittels semi-präparativer HPLC

Die Isolierung erfolgte im semipräparativen Maßstab (5.8.5.2) unter Verwendung einer Nucleosil C18-Phase. Neoxanthin und Violaxanthin wurden jeweils vollständig von den restlichen Verbindungen aus dem Spinatextrakt abgetrennt. Zur Produktisolierung wurden $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ des Spinatextraktes in Methanol gelöst und 2 mL dieser Lösung mittels semi-präparativer HPLC getrennt. Pro HPLC-Lauf konnten $52 \text{ }\mu\text{g}$ Neoxanthin und $111 \text{ }\mu\text{g}$ Violaxanthin isoliert werden (**Abb. 2-31**).

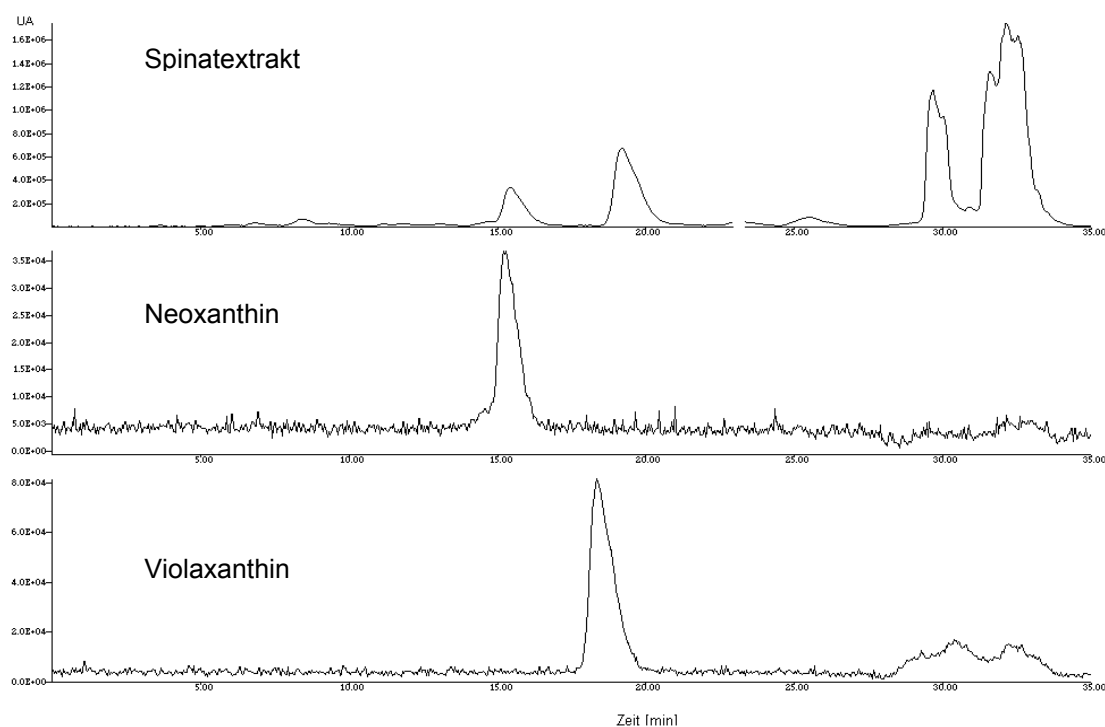


Abb. 2-31 Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin aus Spinatextrakt (HPLC-DAD, $\lambda = 450 \text{ nm}$)

2.3.1.3 Produktidentifizierung und Quantifizierung

Alle isolierten Verbindungen wurden spektralphotometrisch identifiziert. Das UV-/Vis-Absorptionsspektrum wurde in Ethanol bzw. Petrolether aufgenommen. Durch den Vergleich mit Literaturspektren (Britton et al., 1995) wurden die entsprechenden Xanthophylle identifiziert. Auch für die zur Verfügung gestellten Verbindungen wurden Spektren aufgenommen. Gleichzeitig wurde die Reinheit mittels HPLC-DAD und HPLC-MS (APCI⁺) überprüft. Die Quantifizierung erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten im entsprechenden Lösungsmittel bei der in der Literatur angegebenen Wellenlänge (**Tab. 2-9**).

Tab. 2-9 Spektralphotometrische Überprüfung der isolierten Substrate und der zur Verfügung gestellten Referenzsubstanzen, sowie die entsprechenden Molekülmassen (Lit.: Britton et al., 1995)

Substrat	Lösungsmittel	Absorptionsmaxima			Literatur			[M+H] ⁺
Lutein	Ethanol	422	447	474	422	445	474	569
Zeaxanthin	Ethanol	424	451	479	428	450	478	569
Neoxanthin	Ethanol	414	437	465	415	439	467	601
Violaxanthin	Ethanol	421	444	470	419	440	470	601
Lycopin	Petrolether	442	469	500	444	470	502	537
<i>β</i> -Apo-8'-carotinal	Petrolether	457			457			417
<i>β</i> -Apo-12'-carotinal	Petrolether	415			414			351

2.3.2 Produktion von Peroxidasen durch Lignininduktion im Bioreaktor

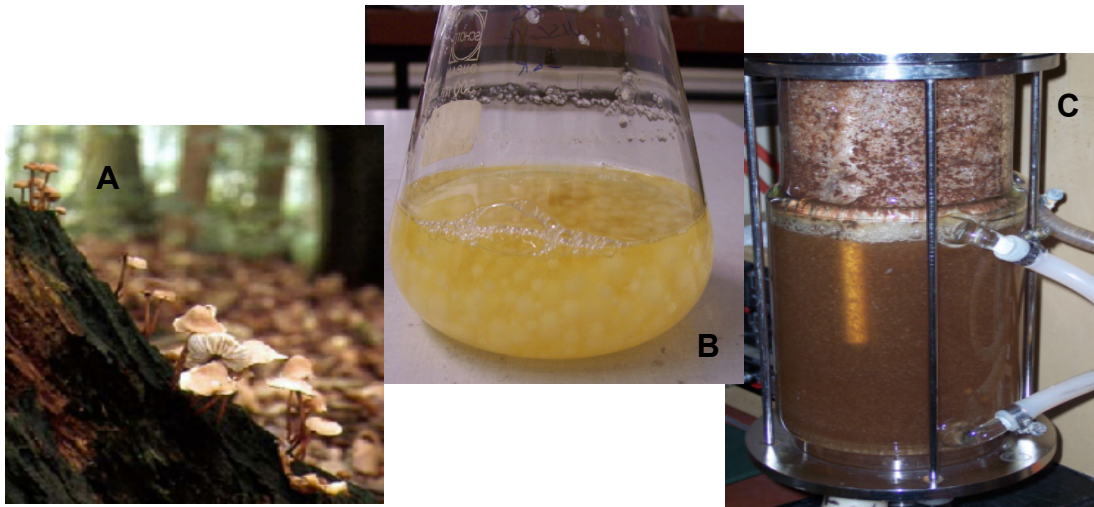


Abb. 2-32 *Marasmius scorodonius*: A natürliches Habitat (F.V. Larsen); B Submerskultur; C Kultivierung im Bioreaktor mit Lignininduktion

Lignin ist neben Cellulose der Hauptbestandteil von Holz und stellt ein natürliches Substrat für viele Weißfäulepilze dar. Durch die Zugabe von Lignin sollte die Bildung der Peroxidasen induziert werden. Die Arbeiten von Peters (2004) zeigten eine vermehrte Produktion von Peroxidasen durch die Kultivierung mit Lignin. Die Produktion der Exoenzyme erfolgte in einem 2-L-Bioreaktor (5.4.2.6), mit einer Lignindosierung von 1,8 g pro Gesamtansatz. Die Aktivität des konzentrierten Kulturüberstands wurde mittels Aktivitätstest mit β,β -Carotin-Lösung (5.11.1.1) bestimmt. Aus einem aufgearbeitetem Bioreaktoransatz konnte so eine Gesamtzymaktivität von ca. 600 mU erhalten werden.

2.3.3 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten in wässriger Lösung

Die Quantifizierung des Abbaus erfolgte spektralphotometrisch. Hierzu war es erforderlich, von den Substraten entsprechende wässrige Extinktionskoeffizienten zu bestimmen. Von β,β -Carotin war dieser bereits bekannt (Langhoff, 2002). Die Bestimmung erfolgte durch Messung unterschiedlicher Konzentrationen im linearen Bereich (ca. 100 μg absolut). Die Gehalte wurden mittels HPLC über die entsprechenden Referenzsubstanzen quantifiziert. Von Neoxanthin und Violaxanthin wurden keine wässrigen Koeffizienten bestimmt. Die Quantifizierung des Abbaus erfolgte hier mittels HPLC. Von den wässrigen Lösungen wurde zudem ein UV-/VIS-Absorptionsspektrum aufgezeichnet (**Tab. 2-10**).

Tab. 2-10 Wässrige Extinktionskoeffizienten einiger eingesetzter Substrate

Substrat	wässriger Extinktionskoeffizient [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]	[λ _{max}]
β,β-Carotin	95.000	450
Lutein	137.100	455
Zeaxanthin	141.800	462
Lycopin	137.200	481
β-Apo-8'-carotinal	75.500	463
β-Apo-12'-carotinal	61.700	432

2.3.4 Umsetzung von Carotinoiden mit konzentriertem Enzymüberstand

Die Umsetzung wurde zunächst mit einer Enzymaktivität von 4 mU und einem Gehalt an β,β-Carotin von 100 µg pro 5 mL Assay in Anlehnung an die Arbeiten von Veddelar (2004) durchgeführt. Hierbei sollte zunächst der Abbau überprüft werden. Als Puffer wurde 50 mM Natriumacetat / Essigsäure, eingestellt auf pH 5 verwendet. Die Umsetzung erfolgte bei 27 °C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht. Der Abbau wurde photometrisch bei 450 nm verfolgt (**Abb. 2-33**).

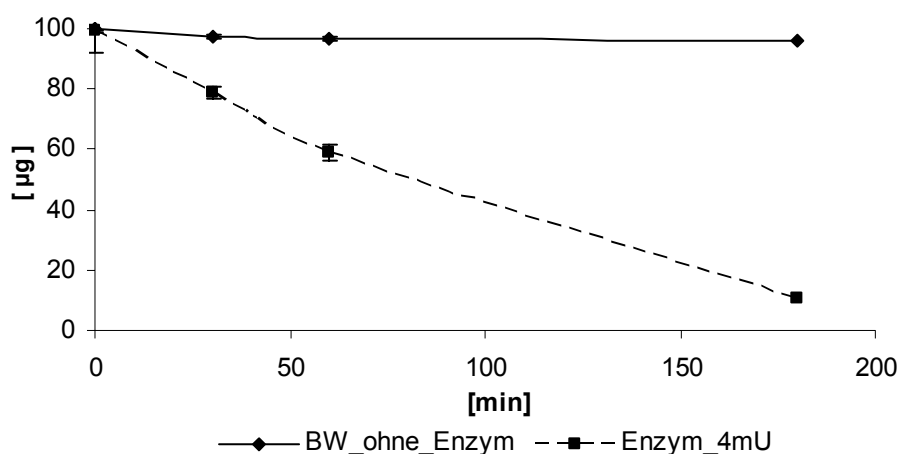


Abb. 2-33 Kinetik des Abbaus von β,β-Carotin durch *Marasmius scorodonius* mit konzentriertem Kulturüberstand

Nach 180 min waren etwa 90% des eingesetzten β,β-Carotins abgebaut, während der mitgeführte Kontrollwert nahezu unverändert blieb. Für die Analytik der nicht-flüchtigen Verbindungen wurde der Abbau nach 60 min gestoppt und mit der Extraktion begonnen.

Hierzu wurde ein dreifacher Ansatz verwendet, um ausreichende Produktmengen zu erhalten. Pro 15 mL-Ansatz wurde eine Enzymmenge eingesetzt, die etwa 12 mU entsprach. Die konzentrierten Kulturüberstände wurden vor jeder Umsetzung auf Aktivität überprüft und eine 12 mU entsprechende Menge eingesetzt, was je nach Aktivität einem Volumen von 1,8 bis 4,2 mL entsprach.

2.3.4.1 Quantifizierung des enzymatischen Abbaus

Alle Substrate wurden von den Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* abgebaut. Um nicht-flüchtige Spaltprodukte identifizieren zu können, wurde der enzymatische Abbau nach 60 min unterbrochen und mit der Aufarbeitung begonnen. Die Quantifizierung erfolgte über die berechneten Extinktionskoeffizienten und wurde zum Vergleich mittels HPLC überprüft (**Tab. 2-11**).

Um die spektralphotometrisch bestimmten Gehalte in der wässrigen Lösung zu bestätigen, wurde eine Wiederfindung mit β,β -Carotin und β -Ionon, als Beispiel eines Abbauproduktes, durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Proben nach 5.13.5 aufgearbeitet und mittels HPLC-DAD und GC-FID über externe Standards quantifiziert. Für β,β -Carotin ergab sich eine Wiederfindung von 97%, für β -Ionon betrug die Wiederfindung 98%.

Tab. 2-11 Abbauraten der eingesetzten Substrate (60 min, pH 5, 27°C, 150 rpm)

Substrat	Abbau [%] UV/Vis	Abbau [%] HPLC
β,β -Carotin	53	57
Lutein	43	45
Zeaxanthin	26	29
Lycopin	24	28
Neoxanthin	26	31
Violaxanthin	35	38
β -Apo-8'-carotinal	41	44
β -Apo-12'-carotinal	10	11

Der gemessene Abbau mittels HPLC ergab durchgehend leicht höhere Werte als photometrisch gemessene. Ein Grund hierfür könnte die Zeitspanne von der photometrischen Messung bis zur Aufarbeitung sein, sowie ähnliche Absorptionsmaxima der Substrate und der entstandenen Abbauprodukte.

2.3.4.2 Identifizierung der flüchtigen Spaltprodukte mittels GC-FID und GC-MS

Der Abbau der Carotinoide führt zu einer Vielzahl an flüchtigen Spaltprodukten, von denen vor allem die C₁₃-Norisoprenoide von Interesse waren. Die Identifizierung und Quantifizierung der durch SPE (5.14.5) extrahierten Proben erfolgte mittels GC-FID (5.8.4.2) und GC-MS (5.8.4.5b). Quantifiziert wurde über den internen Standard α -Terpineol (20 μ L, c = 218 mg L⁻¹) **Abb. 2-34** zeigt die identifizierten Spaltprodukte am Beispiel des β,β -Carotin-Abbaus.

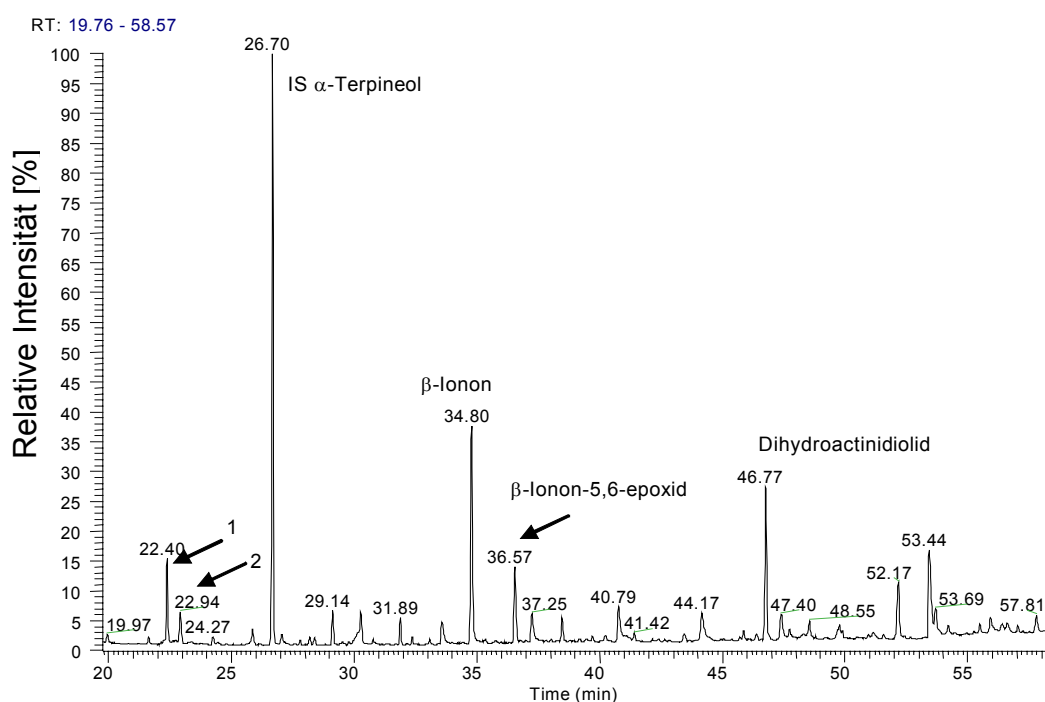


Abb. 2-34 GC-MS- Chromatogramm (CW 20) der flüchtigen Spaltprodukte des β,β -Carotin-Abbaus.

1 = 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon; 2 = β -Cyclocitral

Die Identifizierung der flüchtigen Verbindungen erfolgte über einen Vergleich der entsprechenden Kovats-Indices und durch einen Vergleich der Massenspektren mit vorhandenen Spektrenbibliotheken und Literatur. Die entsprechenden Daten sind in **Tab. 2-12** aufgeführt. Eine Übersicht der Strukturformeln zeigt **Abb. 2-35**.

Tab. 2-12 Kovats-Indices der identifizierten flüchtigen Spaltprodukte; Lit: [a] Kondjoyan et al. 1996; [b] Lee et al., 2005; [c] Duque et al., 2002; [d] Veddeler, 2004; [e] Straubinger et al., 1998; [f] Bonnländer, 2002

Substanz	KI	KI Lit.	Fragmentierung m/z
β -Ionon	1911 (CW20)	1905 ^[a]	192(M ⁺), 177(100), 135, 107, 105, 93, 91, 79, 77
β -Ionon-5,6-epoxid	1964 (CW 20)	1962 ^[a]	208(M ⁺), 135, 124, 123(100), 107, 95, 91, 79
Dihydroactinidiolid	2321 (CW 20)	2330 ^[f]	180(M ⁺), 137, 111(100), 110, 109, 95, 69, 67
β -Cyclocitral	1595 (CW 20)	1599 ^[a]	152(M ⁺), 137, 123, 109, 95, 81, 79, 67(100)
2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone	1583 (CW 20)	1575 ^[a]	156(M ⁺), 128, 110, 95, 85, 71(100), 69, 58
3-Hydroxy- α -ionon	1627 (DB 5)	1623 ^[d]	208(M ⁺), 147, 125, 124, 109(100), 105, 91, 81
3-Hydroxy- β -ionon	1677 (DB 5)	1675 ^[c]	208(M ⁺), 193(100), 175, 147, 131, 121, 109, 105
3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid	1688 (DB 5)	1695 ^[c]	224(M ⁺), 125, 124, 123(100), 109, 95, 79, 77
3-Hydroxy- β -cyclocitral	2346 (CW 20)	2367 ^[e]	168(M ⁺), 135(100), 121, 107, 91, 55
Geranial	1269 (DB 5)	1277 ^[a]	152(M ⁺), 136, 121, 107, 94, 93, 79, 69(100)
6-Methyl-5-hepten-2-on	1324 (CW 20)	1321 ^[a]	126(M ⁺), 111, 108(100), 93, 71, 69, 67, 55

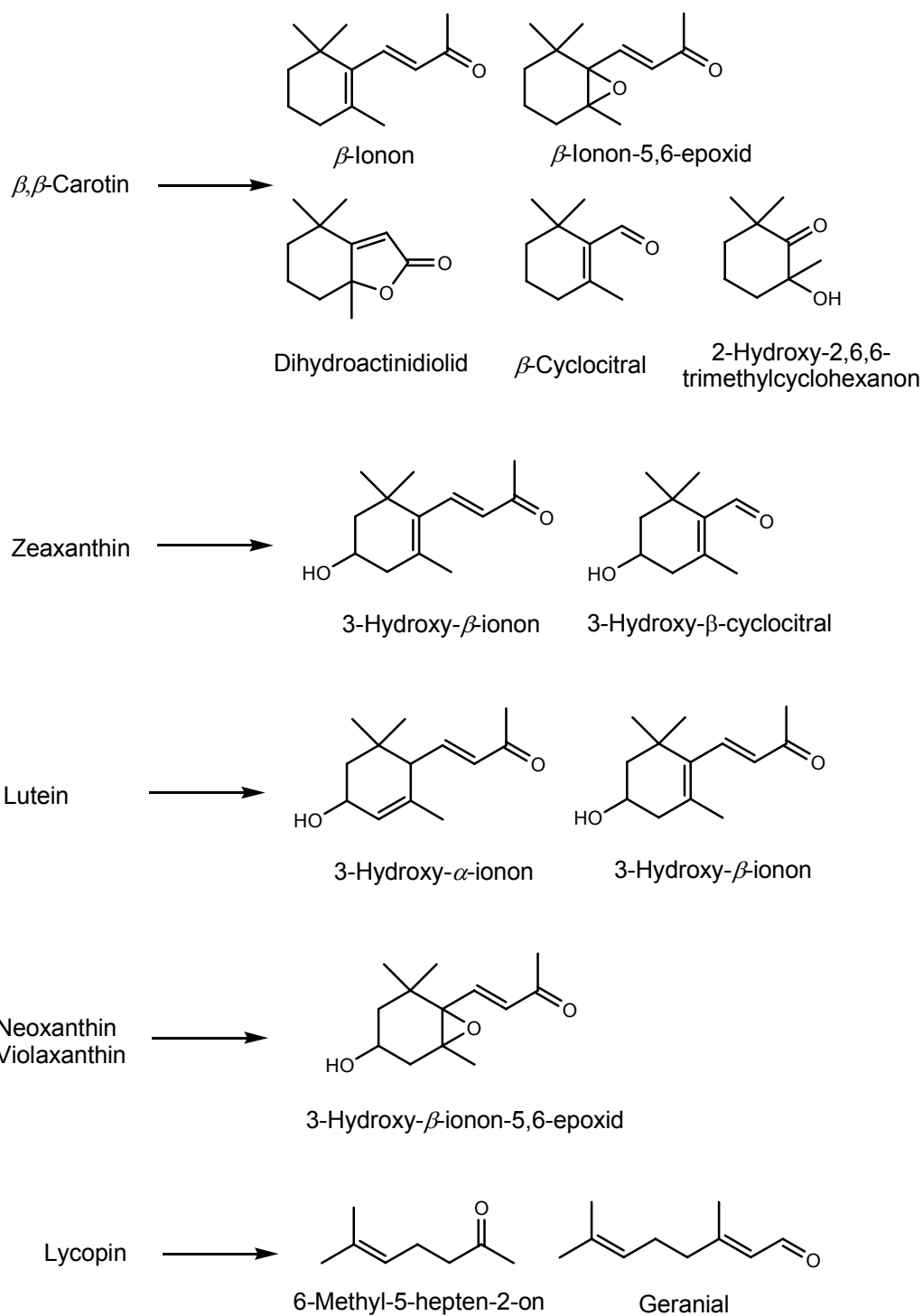


Abb. 2-35 Flüchtige Abbauprodukte der enzymatischen Spaltung durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*

Der über den internen Standard α -Terpineol berechnete Gehalt an flüchtigen Spaltprodukten wurde auf die abgebaute Menge des jeweiligen Substrates in mol% umgerechnet. 3-Hydroxy- β -cyclocitral wurde beim Abbau von Zeaxanthin nur in sehr geringen, nicht quantifizierbaren Mengen im SIM-Modus mittels GC-MS identifiziert. Eine Übersicht ist in **Tab. 2-13** dargestellt.

Tab. 2-13 Identifizierte Abbauprodukte der enzymatischen Spaltung der verwendeten Substrate

Substrat	Abbauprodukt	Ausbeute [mol%]
β,β -Carotin	β -Ionon	7,9
	β -Ionon-5,6-epoxid	1,3
	Dihydroactinidiolid	7,0
	β -Cyclocitral	1,5
	2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon	2,5
Lutein	3-Hydroxy- α -ionon	11
	3-Hydroxy- β -ionon	6,3
Zeaxanthin	3-Hydroxy- β -ionon	5,7
	3-Hydroxy- β -cyclocitral	Spuren
Violaxanthin, Neoxanthin	3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid	6,9
		6,8
Lycopin	Geranial	1,3
	6-Methyl-5-hepten-2-on	7,2

Auch bei der Umsetzung der beiden Apocarotinalen, β -Apo-8'-und β -Apo-12'-carotinal entstanden flüchtige Verbindungen. Es wurden die gleichen Spaltprodukte wie beim Abbau von β,β -Carotin identifiziert (**Tab. 2-14**).

Tab. 2-14 Flüchtige Spaltprodukte aus dem Abbau von Apocarotinalen

Substrat Produkt	β -Apo-8'-carotinal [mol%]	β -Apo12'-carotinal [mol%]	β,β -Carotin [mol%]
β -Ionon	5,4	3,2	7,9
β -Ionon-5,6-epoxid	1,9	1,0	1,3
Dihydroactinidiolid	2,1	2,2	7,1
2-Hydroxy-2,2,6- trimethyl-cyclohexanon	1,4	<0,1	2,5
β -Cyclocitral	1,6	2,4	1,5

2.3.4.3 Isolierung von DHA und Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses

Die Spaltung von β,β -Carotin durch *Marasmius scorodonius* führte zur Bildung von Dihydroactinidiolid (DHA), das durch die Entstehung eines neuen Stereozentrums in zwei möglichen Enantiomeren vorkommen kann.

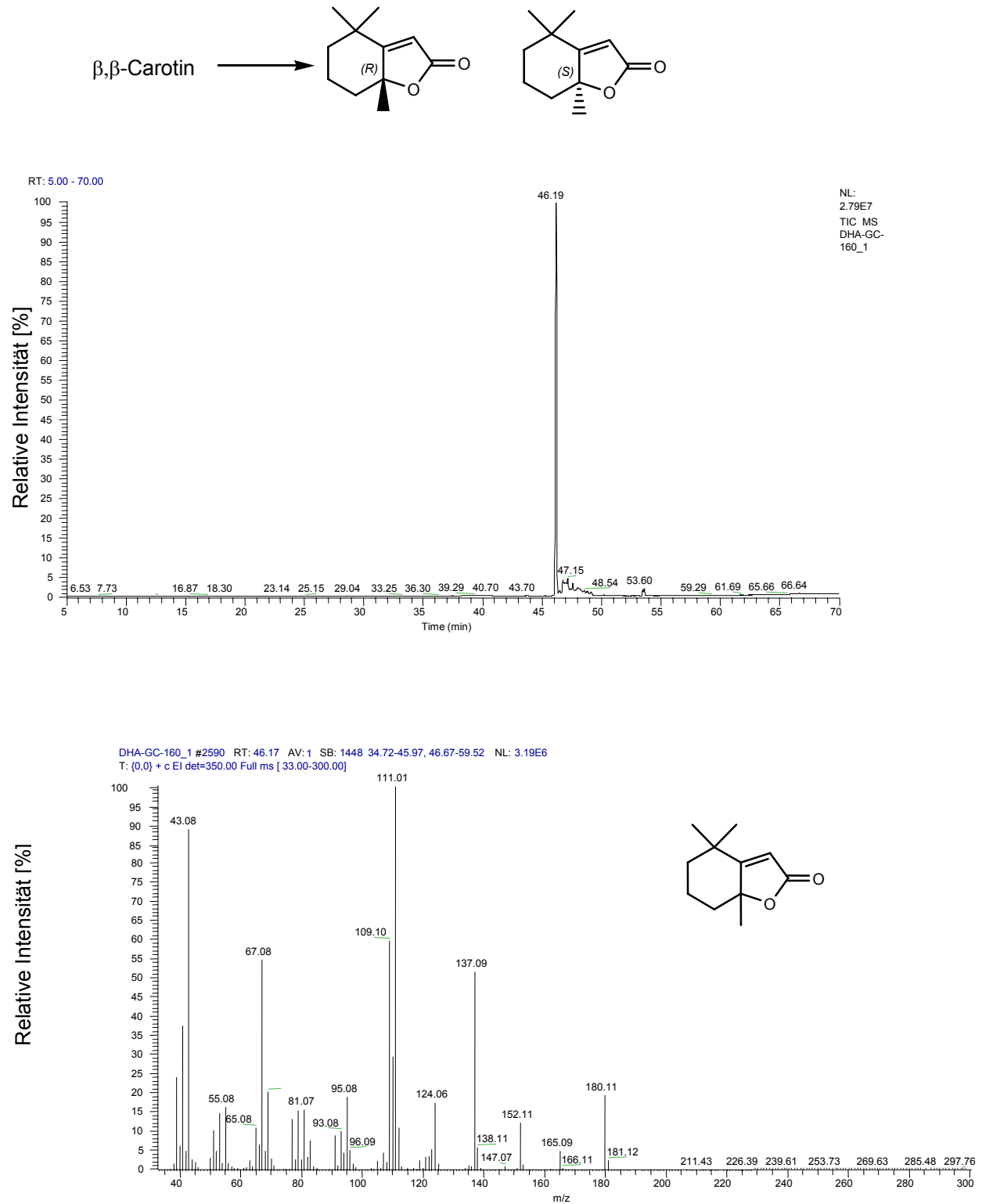


Abb. 2-36 GC-MS-Chromatogramm und Massenspektrum des aus der enzymatischen Spaltung von β,β -Carotin isolierten Dihydroactinidiolids

Zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses des Dihydroactinidiolids aus dem β,β -Carotin-Abbau wurden mehrere Extrakte durch Kieselgelfraktionierung gereinigt (5.8.3) Die Überprüfung der isolierten Fraktionen erfolgte mittels GC-FID und durch einen Vergleich der Kovats-Indices. Die Hauptfraktionen wurden konzentriert und Dihydroactinidiolid mittels präparativer Gaschromatographie (5.8.4.7) in einer Ausbeute von etwa 30 μg und einer Reinheit von ca. 90% isoliert (**Abb. 2-36**).

Aus der Messung des Enantiomerenverhältnisses des Dihydroactinidiolids ergab sich ein racemisches Gemisch (persönliche Mitteilung Prof. Mosandl, Universität Frankfurt). Die enzymatische Spaltung mit den Peroxidasen aus *Marasmius scorodoni* führte also zu einer nicht-selektiven Bildung eines racemischen Gemisches von Dihydroactinidiolid.

2.3.4.4 Analytik der nicht-flüchtigen Spaltprodukte mittels HPLC-DAD

Bei der enzymatischen Spaltung entstehen neben den bereits identifizierten flüchtigen norisoprenoiden Verbindungen auch nichtflüchtige Verbindungen und oxyfunktionalisierte Vorstufen, die dann weiter abgebaut werden. Für die Identifizierung wurde der enzymatische Abbau nicht vollständig durchgeführt, sondern nach einer Stunde unterbrochen. Zu diesem Zeitpunkt sollten sich sowohl flüchtige Verbindungen als auch nichtflüchtige, noch nicht vollständig abgebaute Zwischenprodukte erfassen lassen. Für die Analytik wurde ein HPLC-Programm gewählt, das zu einer möglichst guten Auftrennung der Zielprodukte führte (Mathieu et al. 2005). Die Proben wurden mittels HPLC-DAD (5.8.5.1) analysiert, so dass von den Abbauprodukten ein UV/Vis-Absorptionsspektrum aufgenommen werden konnte (**Abb. 2-37**).

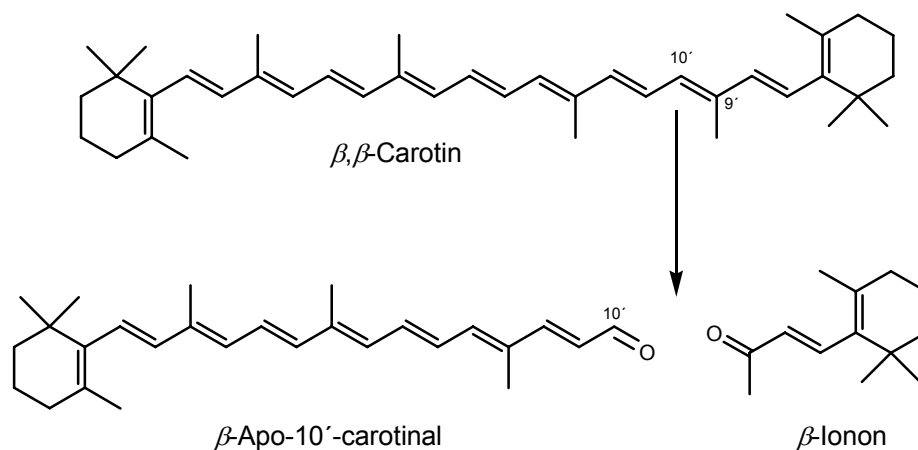


Abb. 2-37 Spaltung von β,β -Carotin in Position 9,10 (9', 10')

Die mittels HPLC-DAD erhaltenen Chromatogramme zeigten nicht-flüchtige Abbauprodukte mit hypsochromer Verschiebung zum eingesetzten Substrat im Bereich von 380 - 440 nm. Die Konzentrationen waren gegenüber der ursprünglich eingesetzten Menge an Substrat sehr gering, jedoch deutlich größer als in den entsprechenden Kontrollwerten. Von den Hauptverbindungen wurden UV/Vis-Absorptionsspektren aufgenommen und mit der Literatur (Britton et al., 1995) verglichen. Zudem wurden die Laufprofile der HPLC - Chromatogramme durch einen Vergleich mit der Literatur überprüft. **Abb. 2-38** zeigt das Chromatogramm der nichtflüchtigen Spaltprodukte aus dem β,β -Carotin-Abbau.

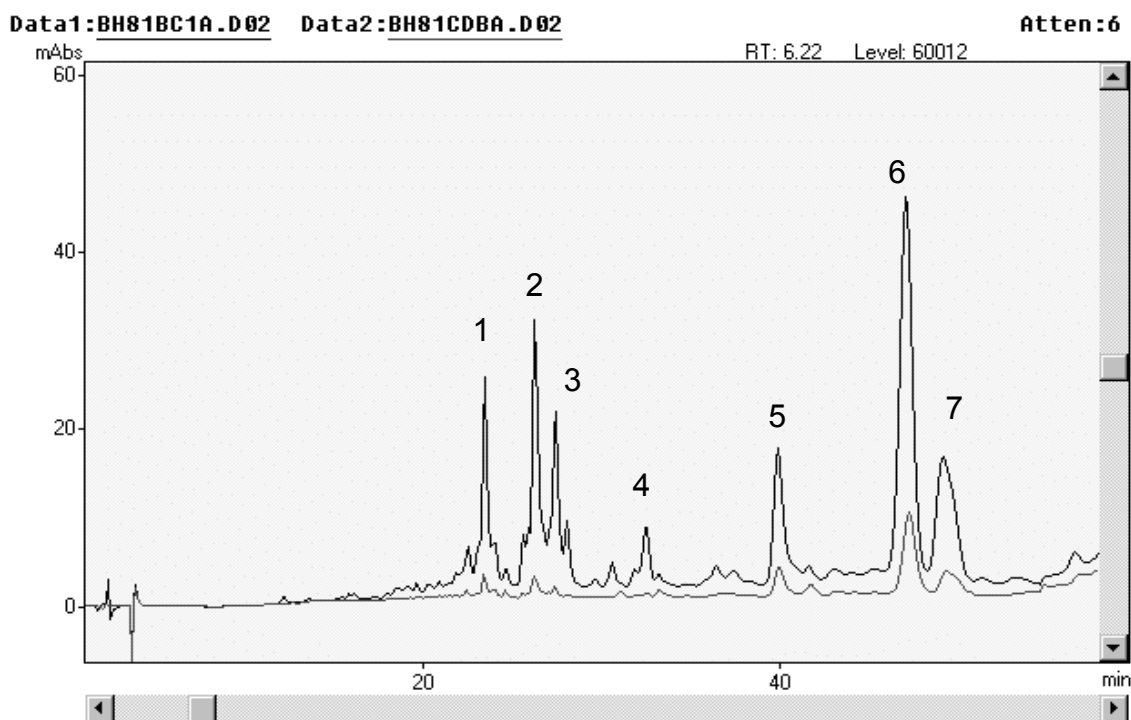


Abb. 2-38 HPLC-DAD-Chromatogramm ($\lambda = 450 \text{ nm}$) des β,β -Carotin-Abbaus durch *Marasmius scorodonius*. Die untere Linie zeigt den Kontrollwert mit deaktivierter Enzymlösung.

Die Spektren der identifizierten Verbindungen befinden sich im Anhang. Durch einen Vergleich mit der Literatur wurde versucht, diese Verbindungen über die Retentionszeit und das entsprechende Absorptionsspektrum zu identifizieren (Britton et al., 1995; Caris-Veyrat et al., 2001). Verbindung 6 zeigte eine große Übereinstimmung mit β -Carotin-5,6-epoxid. Verbindung 2 zeigte ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum wie β -Apo-12'-carotinal. Diese Verbindung wurde zusätzlich über eine vorhandene Referenzsubstanz identifiziert. β -Apo-10'-carotinal wurde unter dem Peak 3 vermutet, da dieser zwischen den Standards von β -Apo-12'- und β -Apo-8'-carotinal lag. Das Elutionsprofil der nicht-flüchtigen Spaltprodukte lässt sich in zwei Bereiche einteilen, die bereits in der Literatur beschrieben sind (Caris-Veyrat et al., 2001). So eluieren die Apocarotinale im Bereich der Verbindungen 1-3, während die Monoepoxide im Bereich 5-7 liegen. Eine endgültige Aussage konnte hier nur mittels HPLC-MS gemacht werden.

2.3.4.5 Identifizierung der nicht-flüchtigen Spaltprodukte mittels HPLC-MS

Aufgrund der geringen Produktmengen mussten für die Analytik zunächst mehrere Extrakte vereint werden. Die Extrakte wurden mittels Säulenchromatographie (5.8.3) gereinigt, um Reste des verwendeten Emulgators Tween80 abzutrennen, der die MS-Analytik störte. Zudem wurde nicht abgebautes β,β -Carotin aus dem Ansatz entfernt. Die Überprüfung der Aufreinigung erfolgte mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchung (5.14.9) (**Abb. 2-39**).

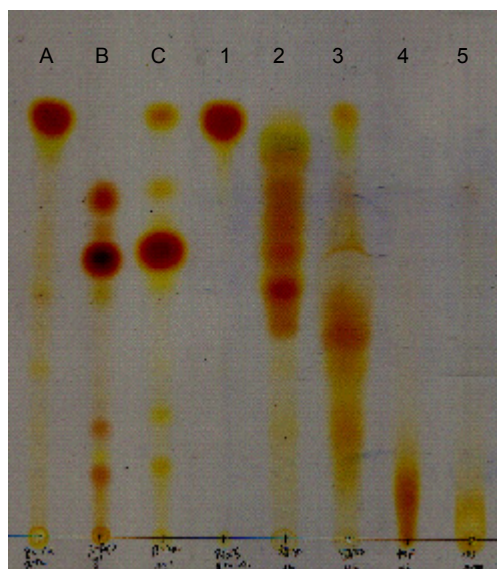


Abb. 2-39 Dünnschichtchromatographische Untersuchung des enzymatischen Abbaus von β,β -Carotin. A Kontrollwert; B Referenz β -Apo-8'-carotinal; C Referenz β -Apo-12'-carotinal; Fraktionen 1-5 (100% Pentan; 80% Pentan / 20% Diethylether; 50% Pentan / 50% Diethylether; 100% Diethylether; 100% Methanol)

Fraktion 2 wurde für die Untersuchungen mittels HPLC-MS verwendet, da sie die höchsten Gehalte an Zielprodukten enthielt (**Abb. 2-39**).

Zur Produktidentifizierung wurden die zu erwartenden Massen im SIM-Modus gesucht. Dabei konnten Massen von $[M+H]^+$ 377, 351 und 311 eindeutig identifiziert, und den entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm zugeordnet werden. β,β -Carotin-5,6-epoxid zeigt eine Masse von $[M+H]^+$ 553, was typisch für ein Monoepoxid ist und die Daten des Absorptionsspektrums bestätigt. Ein weiteres Monoepoxid konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich um 5,8-Epoxid ($[M+H]^+$ 552). Es konnten nur sehr geringe Mengen an vermutlich zweifach epoxidierten Verbindungen mit der Masse $[M+H]^+$ 569 nachgewiesen werden (**Abb. 2-40 - 2-45**). Verbindung 7 wurde in dieser Fraktion und in den anderen nicht mehr nachgewiesen, sie wurde vermutlich aufgrund ihrer Instabilität abgebaut.

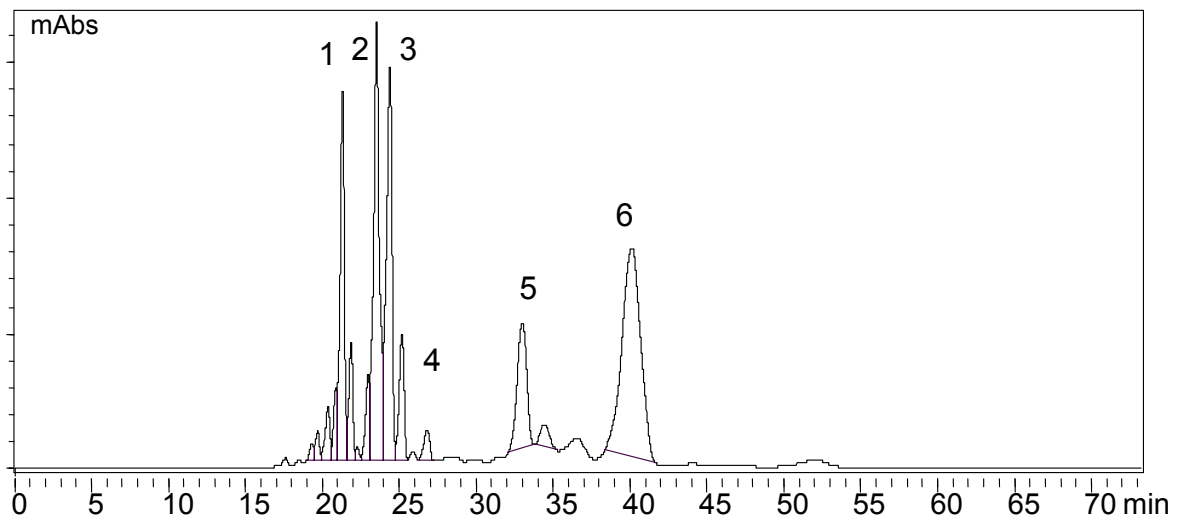


Abb. 2-40 HPLC-MS-Chromatogramm ($\lambda = 450 \text{ nm}$) mit nicht-flüchtigen Spaltprodukten des enzymatischen β,β -Carotin-Abbaus

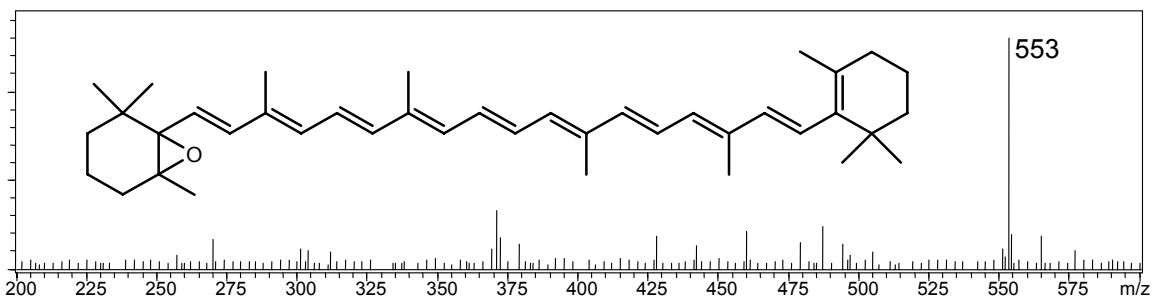


Abb. 2-41 Massenspektrum von β -Carotin-5,6-epoxid (40.13 min, Verbindung 6)

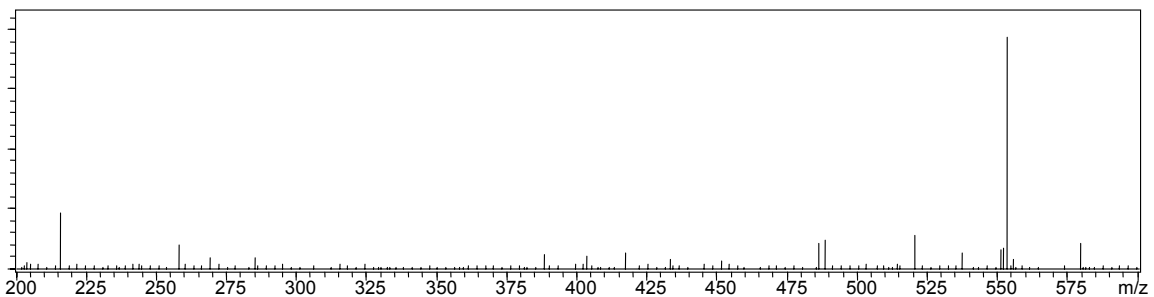


Abb. 2-42 Massenspektrum der Verbindung (32.99 min, Verbindung 5) Monoepoxid?



Abb. 2-43 Massenspektrum des β -Apo-10'-carotinals (24.39 min, Verbindung 3)

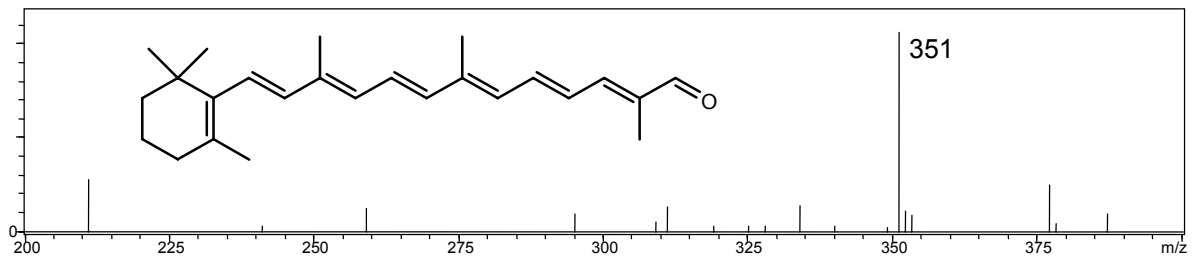


Abb. 2-44 Massenspektrum des β -Apo-12'-carotinals (23.54 min, Verbindung 2)

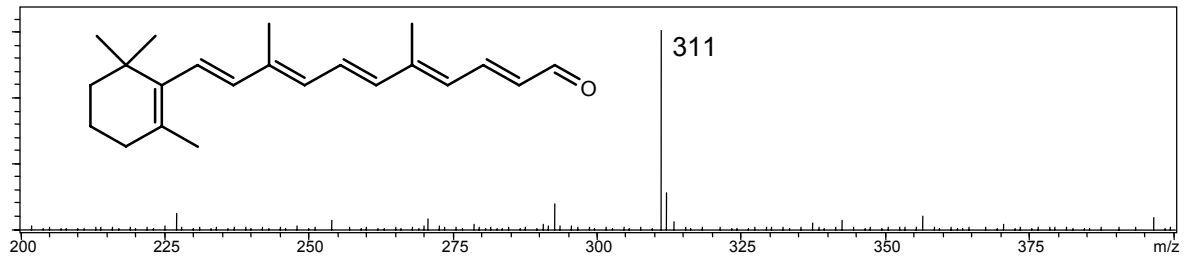


Abb. 2-45 Massenspektrum des β -Apo-14'-carotinals (21.32 min, Verbindung 1)

Auch aus dem Abbau der anderen zur Spaltung eingesetzten Xanthophylle und Apocarotinoide wurden nicht-flüchtige Verbindungen in geringer Konzentration mittels HPLC-MS identifiziert. Die Spaltprodukte des Lycopins waren in sehr geringer Konzentration bei 400 bzw. 450 nm messbar. Die Konzentrationen reichten jedoch trotz starker Konzentrierung nicht für eine eindeutige Identifizierung mittels LC-MS aus. Die entsprechenden Molekülmassen $[M+H]^+$ und jeweilige Strukturvorschläge sind in **Tab. 2-15** angegeben.

Tab. 2-15 Nicht-flüchtige Verbindungen aus der Spaltung der eingesetzten Carotinoide

Substrat	Ret.-Zeit	[M+H] ⁺	Substanzvorschlag
Lutein	15,5	327	3-Hydroxy- β -apo-14'-carotinal
	19,5	367	3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal
	20,8	393	3-Hydroxy- β -apo-10'-carotinal
	23,5	433	3-Hydroxy- β -apo-8'-carotinal
	40,9	585	Lutein (epoxid)
Zeaxanthin	16,1	327	3-Hydroxy- β -apo-14'-carotinal
	19,9	367	3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal
	21,3	393	3-Hydroxy- β -apo-10'-carotinal
	24,8	433	3-Hydroxy- β -apo-8'-carotinal
	41,3	585	Zeaxanthin (epoxid)
Violaxanthin	12,4	343	3-Hydroxy- β -apo-14'-carotinal-5,6-epoxid
	16,5	383	3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal-5,6-epoxid
	17,7	409	3-Hydroxy- β -apo-10'-carotinal-5,6-epoxid
Neoxanthin	12,2	343	3-Hydroxy- β -apo-14'-carotinal-5,6-epoxid
	16,5	383	3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal-5,6-epoxid
	17,9	409	3-Hydroxy- β -apo-10'-carotinal-5,6-epoxid
β -Apo-8-carotinal	24,0	433	β -Apo-8'-carotinal-5,6-epoxid
	12,7	257	C17-Dialdehyd
	16,5	297	C20-Dialdehyd
	18,2	453	β -Apo-8'-carotinal (dihydroxy)
	19,6	449	β -Apo-8'-carotinal (diepoxid)
	22,3	433	β -Apo-8'-carotinal (epoxid)
β -Apo-12-carotinal	21,1	367	β -Apo-12'-carotinal-5,6-epoxid
	15,8	383	β -Apo-12'-carotinal (diepoxid?)

2.3.5 Enzymisolierung

Die Enzymreinigung wurde mittels FPLC durchgeführt und das Reinigungsprotokoll aus vorherigen Arbeiten mit leichten Modifikationen übernommen (Scheibner, 2006). Die Methode basiert auf zwei nacheinander geschalteten Reinigungsschritten. Ausgehend vom ultrafiltrierten Kulturüberstand (5.12.2) wurde der erste Reinigungsschritt über eine Ionenaustauschersäule durchgeführt (5.12.4). In diesem Reinigungsschritt wurden bereits etwa 97% des enthaltenen Fremdproteins entfernt. Im zweiten Schritt konnten die beiden Zielenzyme mittels Größenausschlusschromatographie (5.12.4) isoliert werden. Durch SDS-PAGE (5.12.6) und anschließender Silberfärbung wurde der Reinigungserfolg visualisiert (**Abb. 2-46**).

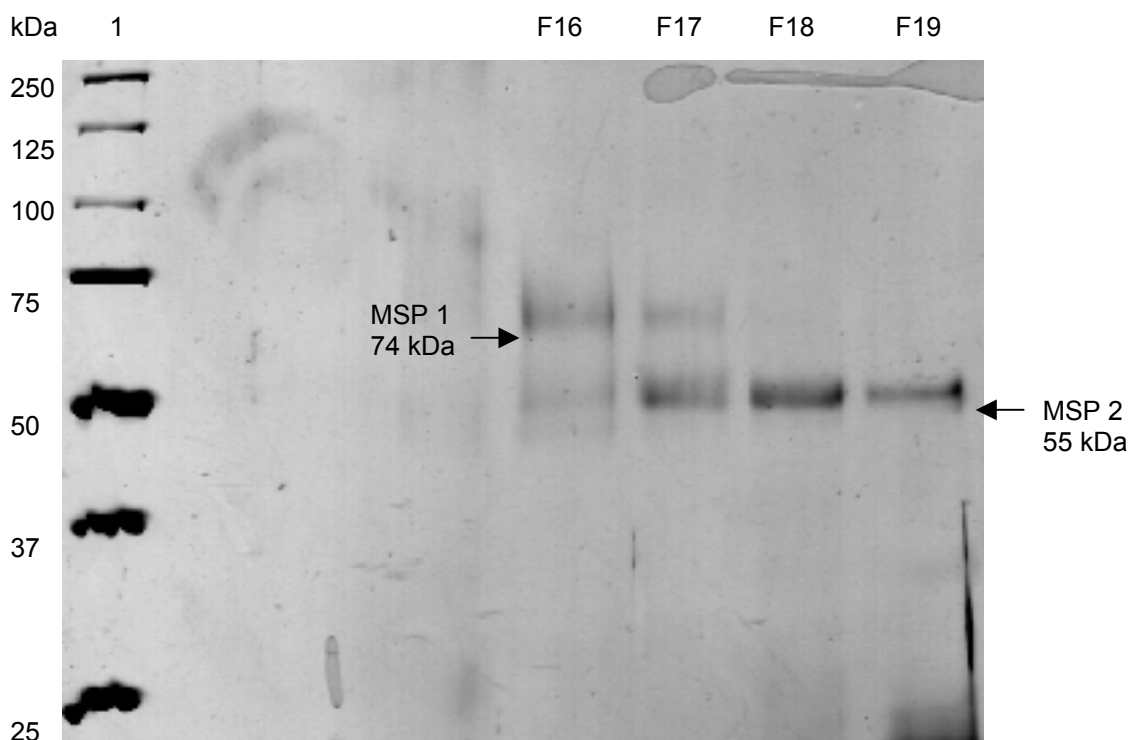


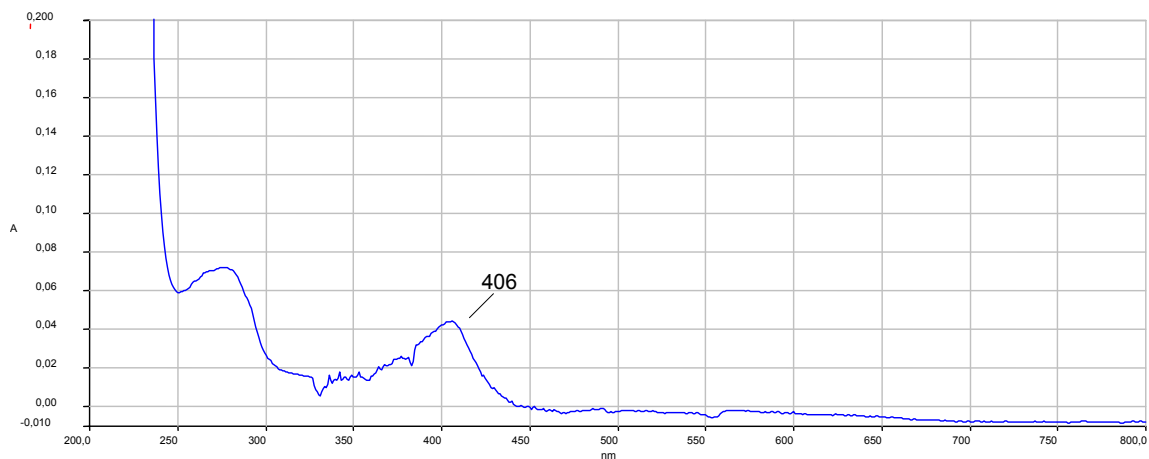
Abb. 2-46 Isolierung der Zielenzyme MSP1 und MSP2 mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung; 1 = Proteinstandard, F16 - F19 = Proteinfractionen aus der Größenausschlusschromatographie

Für die gereinigten Enzymfraktionen wurde die Aktivität mittels Enzymaktivitätstest (5.12.1.3) bestimmt. Zusammen mit dem nach 5.12.3 quantifizierten Proteingehalt der jeweiligen Enzymfraktion ließ sich die spezifische Aktivität in den Fraktionen berechnen (**Tab. 2-16**).

Tab. 2-16 Aktivität, Proteingehalt und spezifische Aktivität der isolierten Enzymfraktionen

Fraktion	Aktivität [mU mL ⁻¹]	Proteingehalt [mg mL ⁻¹]	spezifische Aktivität [mU mg ⁻¹]
15	1,5	0,013	112
16	2,9	0,020	141
17	1,5	0,024	63
18	2,6	0,033	78
19	2,5	0,020	122

Die Enzymfraktionen MSP1 und MSP2 wurden jeweils getrennt mittels Vivaspin R-15-Einheiten (Vivascience, Göttingen) konzentriert und anschließend von jeder Fraktion ein UV-/Vis-Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Es zeigt sich ein Maximum von 403 nm für MSP1 und 406 nm für MSP2, was auf Häm-Gruppen in den jeweiligen Enzymen hindeutet. Für MSP2 ist das Spektrum in **Abb. 2-47** dargestellt.

**Abb. 2-47** UV-/Vis-Spektrum von MSP2

Die Bestimmung der Reaktionskinetik für MSP2 wurde nach 5.12.6 durchgeführt. Es wurde eine β,β -Carotin-Lösung mit Konzentrationen von 3,5 - 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ verwendet. Für die Geschwindigkeitskonstante K_m ergab sich ein Wert von 0,045 μM (**Abb. 2-48**).

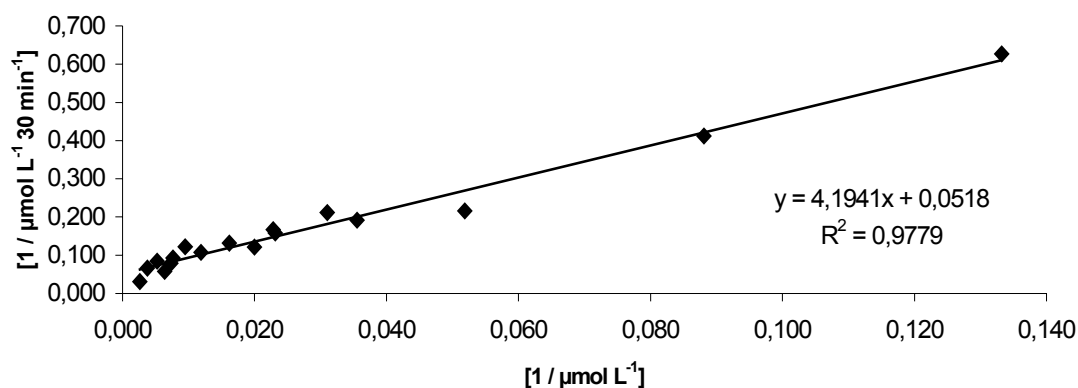


Abb. 2-48 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Enzymkinetik von MSP2

2.3.6 Aktivitätssteigerung der Peroxidasen durch Zugabe von H₂O₂

Die Peroxidasen aus *Marasmius scorodoni* spalteten die Carotinoide auch ohne Zugabe von H₂O₂ als Cofaktor. Zur Untersuchung des Einflusses peroxidhaltiger Lösungen wurde die Enzymaktivität einmal ohne Zugabe und anschließend nach Zugabe von 5 μL 20 mM H₂O₂-Lösung mittels Enzymtest (5.12.1.3) überprüft. Die Aktivität konnte sowohl im Kulturüberstand, als auch bei den isolierten Enzymfraktionen MSP1 und MSP2 deutlich gesteigert werden (**Tab. 2-17**).

Tab. 2-17 Steigerung der Enzymaktivität durch Zugabe von H₂O₂

Enzymfraktion	Aktivität [mU mL ⁻¹]	Aktivität + H ₂ O ₂ [mU mL ⁻¹]
Konz. Kulturüberstand	4,3	10,7
Enzymfraktion MSP1	1,6	3,6
Enzymfraktion MSP2	2,3	5,6

Bei Zugabe von H₂O₂ zu desaktiviertem konzentriertem Kulturüberstand (100°C, 20 min) wurde kein signifikanter Abbau von β,β-Carotin beobachtet (**Abb. 2-49**).

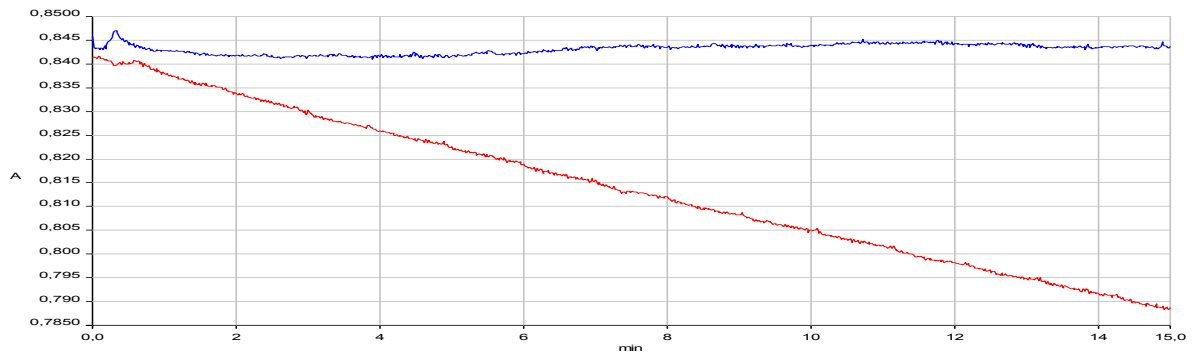


Abb. 2-49 Einfluss von H_2O_2 auf den Abbau von β,β -Carotin unter Verwendung von desaktiviertem Kulturüberstand (obere, blaue Linie) und aktivem Kulturüberstand (untere, rote Linie)

2.3.7 Vergleich der Umsetzung von β,β -Carotin mit Tween80 und Triton X-100

Die Umsetzung wurde mit Triton X-100 als Emulgator unter gleichen Bedingungen wie mit Tween80 durchgeführt. Triton X-100 lässt sich im Gegensatz zu Tween80 nicht durch Lipasen spalten und zeigt damit nicht die Bildung von Ölsäure, die als Hauptverbindung in den GC-Chromatogrammen vorhanden ist. Dadurch können potentielle Spaltprodukte überdeckt und die Analytik erschwert werden. Die Spaltung des β,β -Carotins unter Verwendung von Triton X-100 ergab mit 61,9% einen etwas höheren Abbau als mit Tween80. Dies liegt vermutlich an Spuren von Wasserstoffperoxid, die aus der Herstellung des Emulgators stammen können, und die hier als Cosubstrat dienen. Es wurden die gleichen flüchtigen und nicht-flüchtigen Spaltprodukte, wie beim Abbau mit Tween80 identifiziert. Die Chromatogrammqualität konnte hierdurch nicht verbessert werden, da sich andere Verbindungen aus dem Triton X-100 zeigten. Diese könnten aus der Herstellung dieses Emulgators stammen, da sie auch in den Blindwerten in gleicher Konzentration identifiziert wurden. Die Ausbeuten an flüchtigen Verbindungen betragen hier 5,9 mol% β -Ionon und 5,2 mol% Dihydroactinidiolid.

2.3.8 Umsetzung von β,β -Carotin mit gereinigten Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*

Für die enzymatische Spaltung wurde ein 15 mL-Ansatz wie auch schon bei der Umsetzung in Kulturüberständen unter gleichen Bedingungen (27 °C, 60 min, 150 rpm) durchgeführt. Der Zusatz von 1 μ L 20 mM H₂O₂-Lösung als Cofaktor diente der Beschleunigung der enzymatischen Spaltung. Ein Kontrollwert ohne Enzymzugabe, aber mit Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde parallel mitgeführt. Die Analytik erfolgte mittels GC-FID, GC-MS sowie HPLC-DAD. Die Chromatogrammqualität konnte durch die Abtrennung möglicher Lipasen, die für die Spaltung des Tween80 verantwortlich waren, deutlich verbessert werden. Dabei zeigten sich die gleichen Spaltprodukte, die schon zuvor mit den ultrafiltrierten Kulturüberständen identifiziert werden konnten. Die Ausbeuten an β -Ionon betragen für MSP1 6,9 mol% und MSP2 5,5 mol%, für Dihydroactinidiolid 6 mol% für MSP1 bzw. 3,5 mol% für MSP2 (**Abb. 2-50**).

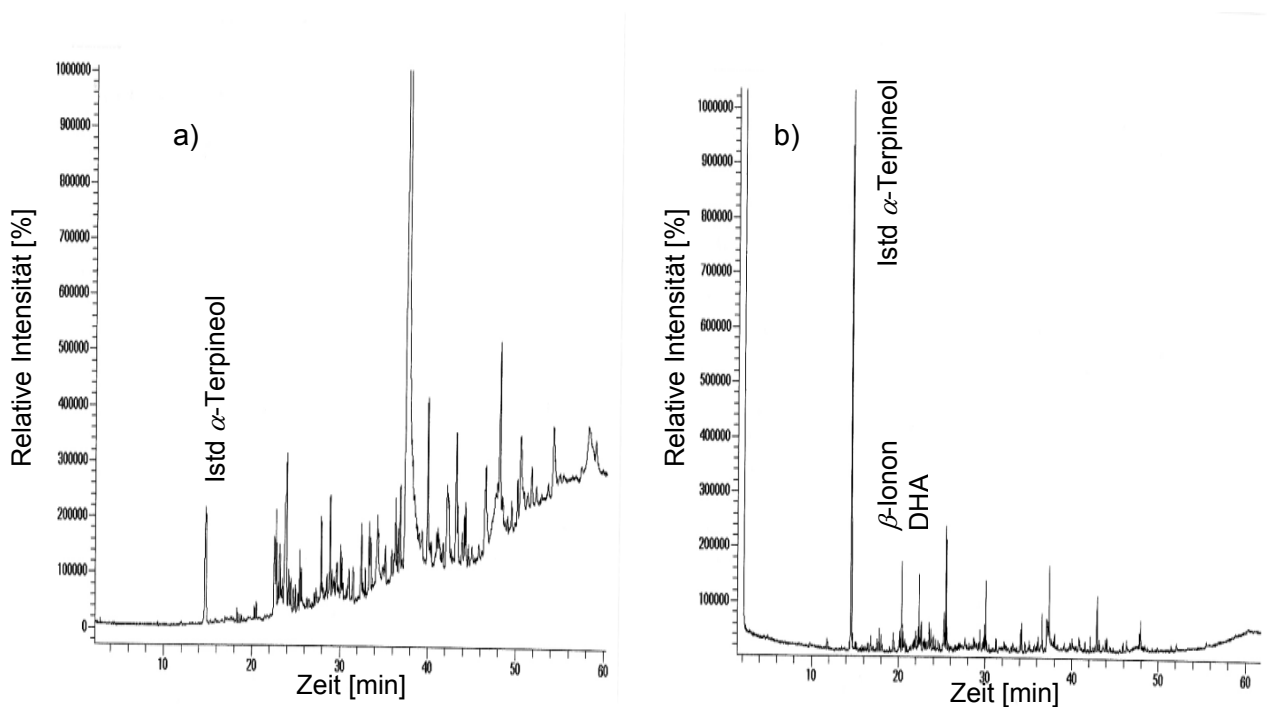


Abb. 2-50 Vergleich der GC-FID-Chromatogramme mit a) konzentrierten Kulturüberständen und b) gereinigter Enzymfraktion MSP2

2.3.9 Teilzusammenfassung

Die Spaltung von Carotinoiden mit Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* führte zur Bildung von flüchtigen Spaltprodukten wie β -Ionon, Dihydroactinidiolid und β -Cyclocitral. Daneben konnten auch Spaltprodukte identifiziert werden, die als Vorstufen für Aromastoffe stehen können, wie 3-Hydroxy- β -cyclocitral, 3-Hydroxy- β -ionon, und 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid.

Zudem wurden eine Reihe nicht-flüchtiger Verbindungen wie β -Apo-10'-carotinal, β -Apo-12'-carotinal und β -Apo-14'-carotinal sowie β,β -Carotin-5,6-epoxid gefunden.

Von den anderen eingesetzten Substraten wurden ebenfalls nicht-flüchtige Abbauprodukte in geringen Konzentrationen identifiziert. Aus Lutein und Zeaxanthin wurden 3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal und 3-Hydroxy- β -apo-10'-carotinal, aus Violaxanthin und Neoxanthin 3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal-5,6-epoxid und 3-Hydroxy- β -apo-12'-carotinal-5,6-epoxid über ihre jeweiligen Massen identifiziert. Aus den beiden Apocarotinolen die jeweiligen epoxidierten Verbindungen in Position 5,6. Daneben wurden bei β -Apo-8'-carotinal noch zwei Apocarodienale (C17- und C20) identifiziert.

Die Umsetzung mit vollständig gereinigtem Enzym ergab die gleichen Spaltprodukte wie mit konzentriertem Kulturüberstand.

Es konnte eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid erreicht werden. Änderungen im Produktspektrum ergaben sich hierdurch nicht.

3 Diskussion

3.1 Terpenoide und Norisoprenoide als Aromastoffe und Aromaprecusoren

3.1.1 Bedeutung und Vorkommen von Terpenoiden und Norisoprenoiden

Terpenoide Aromastoffe können von nahezu allen höheren Organismen biosynthetisiert werden. Sie sind ein wichtiger Bestandteil vieler etherischer Öle in höheren Pflanzen. Dabei zeigen gerade die monofunktionalisierten Verbindungen der Mono- und Sesquiterpene eine große Bandbreite an interessanten Geruchseigenschaften, während reine Terpenkohlenwasserstoffe eher unauffällige und somit kaum bedeutsame Geruchsqualitäten besitzen. Wegen des großen Interesses der Duft- und Aromenindustrie an blumigen Duftkomponenten für Kosmetika und Parfums, sowie an citrus- und minzigen Noten für aromatisierte Lebensmittel, zeigen Terpenoide aufgrund ihrer Geruchseigenschaften ein breites Anwendungsgebiet. Terpenoide kommen im Pflanzenreich oft als sehr komplexes Gemisch mit einem Anteil in etherischen Ölen von 1 - 5% vor. Die Isolierung ist daher meist kostenintensiv, was sich in den hohen Preisen der einzelnen Substanzen widerspiegelt.

α -Pinen ist mit seinem terpentinartigen Geruch ein Hauptbestandteil des Kiefernharzes und wird überwiegend als Lösungsmittel und Synthesevorstufe für Aromastoffe verwendet. Es kommt im griechischen Terpentinöl (*Pinus halepensis* Mill.) mit Gehalten bis zu 90% vor (Ohloff, 1994).

Verbenon, mit seinem campherartigen, minzigen Geruchseindruck, als eines der Haupttransformationsprodukte der Biotransformation des α -Pinens, kommt mit einem Anteil von bis zu 2,5% in Rosmarinöl (*Rosmarinus officinalis* L.) vor (Bauer et al., 2001).

Das Sesquiterpen Farnesen ist in Mandarinenölen (*Citrus reticulata* Blanco L.) mit einem Gehalt von etwa 0,1% als Minorkomponente bestimmt worden (Ohloff, 1994). Es findet sich zudem in den Schalen von Äpfeln und ist dort eine Vorstufe des 7-Hydroxyfarnesens, das für die Schalenkrankheit bei Äpfeln verantwortlich gemacht wird (Whitaker and Saftner, 2000; Rudell et al., 2005). 7-Hydroxyfarnesen ist als ein Naturstoff aus der Pflanze *Critoniella acumunata* isoliert worden (Bussmann et al., 1984).

Norisoprenoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Verbindungen wie β -Ionon, β -Cyclocitral und Dihydroactinidiolid leiten sich aus der Spaltung der entsprechenden Carotinoide und Xanthophylle ab. Andere aromaaktive Verbindungen wie β -Damascenon und Safranal entstehen als sekundäre Produkte durch Oxidation oder Umlagerungen (Winterhalter und Rouseff, 2002). Sie sind wichtige Komponenten des Tee-, Wein- und Tabakaromas und werden im Laufe des Fermentationsprozesses aus glykosidisch gebundenen Vorstufen freigesetzt. Mittlerweile sind einige für die Spaltung verantwortliche Enzyme aus Pflanzen charakterisiert worden (Fleischmann et al., 2002 und 2003; Schwartz et al., 2001).

3.1.2 Terpenbiosynthese aus Isopreneinheiten

Terpene spielen im Tier- und Pflanzenreich eine wichtige Rolle. Mehr als 30.000 Verbindungen sind bereits identifiziert worden, wobei der größte Teil aus pflanzlichem Material isoliert wurde. Zur Biosynthese sind nahezu alle höheren Lebewesen befähigt (Luckner, 1990). Die Ausgangsverbindung aller Terpene ist Isopentenyl-diphosphat (IPP), das durch enzymatische Isomerisierung in Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP) umgewandelt werden kann. Die Biosynthese dieser Verbindungen erfolgt durch zwei unterschiedliche Wege. Der klassische Weg führt über Mevalonsäure, während neuere Studien eine Mevalonsäure-unabhängige Genese von IPP in Plastiden zeigen (Davis und Croteau, 2000; Lichtenthaler et al., 1997) (**Abb. 3-1**).

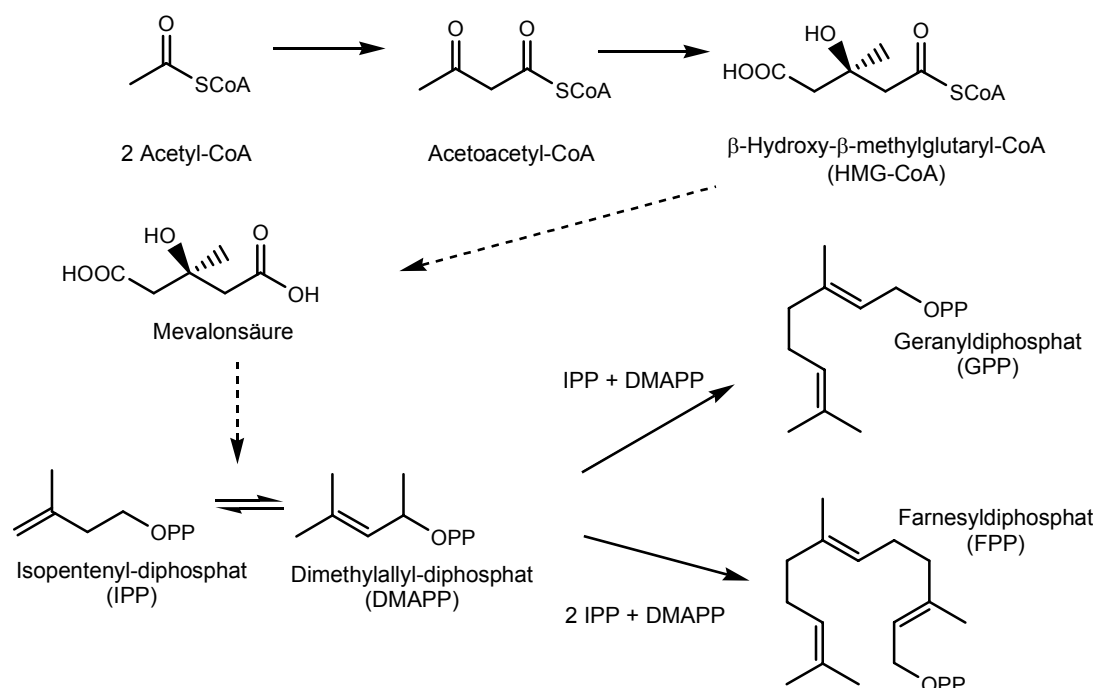


Abb. 3-1 Biosynthese der Mono- und Sesquiterpene über den Mevalonat-Weg (Davis und Croteau, 2000)

Durch Kondensation von IPP mit DMAPP entsteht Geranyldiphosphat als Ausgangsverbindung der Monoterpene. Die Verknüpfung mit einer weiteren C5-Einheit (IPP) ergibt Farnesyldiphosphat (FPP), woraus sich das für die Umsetzung verwendete Sesquiterpen Farnesen direkt durch Abspaltung des Diphosphatrestes ableiten lässt.

Das bicyclische Monoterpen α -Pinen entsteht aus Geranyldiphosphat über das α -Terpinyl-Kation durch 2,8-Verknüpfung mit anschließender Deprotonierung (**Abb. 3-2**).

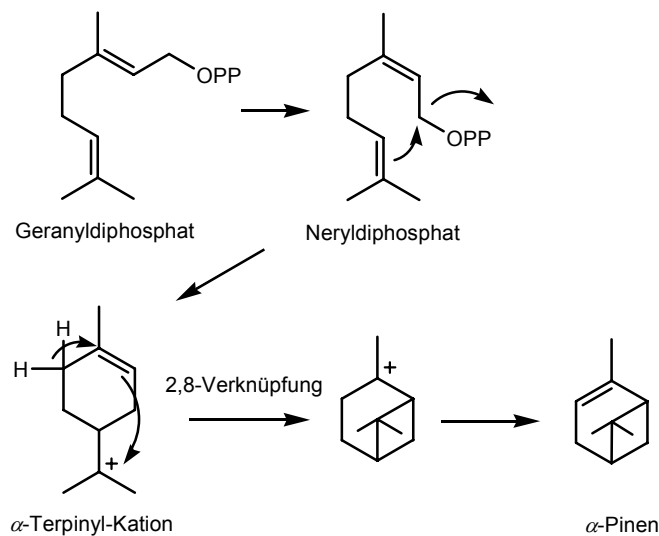


Abb. 3-2 Biosynthese des in der Biotransformation eingesetzten α -Pinens aus Geranyldiphosphat (Davis und Croteau, 2000)

Die Synthese der Tetraterpene erfolgt aus zwei Geranylgeranyldiphosphat-Einheiten zum Phytoen, aus dem dann in weiteren Schritten durch mehrere enzymatische Dehydrierungsschritte die Carotinoide mit konjugierten Doppelbindungen biosynthetisiert werden. In weiteren Transformationsschritten kommt es zur Bildung von hydroxylierten Verbindungen, wie Lutein oder Zeaxanthin, das weiter zum Violaxanthin oxidiert werden kann (Lois et al., 2000, Sandmann, 2001).

3.1.3 Physiologische Bedeutung

Terpenoide und Norisoprenoide besitzen im Tier- und Pflanzenreich ein breites Wirkspektrum. So nutzen einige Pflanzen diese flüchtigen *Verbindungen* um bestimmte Insekten zur Bestäubung anzulocken, andere schützen sich mit ihnen vor natürlichen Fraßfeinden. Bestimmte Substanzen spielen eine Rolle als Signalstoffe und Wachstumsregulatoren bei Pflanzen.

Viele Insekten bilden durch mit der Nahrung aufgenommene Terpene Pheromone, die eine wichtige Rolle als Lock- und Signalstoffe darstellen. So sind die Hauptprodukte der Biotransformation von α -Pinen, Verbenol und Verbenon, wichtige Komponenten bei der Fortpflanzung der Borkenkäfer („Buchdrucker“, *Ips typographus*). Während Verbenol für die Borkenkäfer als Sexuallockstoff dient, bewirkt Verbenon die Verhinderung einer Überbesiedlung mit anderen Borkenkäfern und sichert so das Überleben der Nachkommen (Breitmaier, 2005). Diese Eigenschaft kann auch zur Bekämpfung dieser Schadinsekten genutzt werden, um sie auf natürliche Weise in eine Falle zu locken.

Auch in der Pharmaindustrie spielen Terpenoide eine wichtige Rolle. Verbenon dient als Synthesebaustein für das Krebsmedikament Taxol[®] und dessen Derivate. Das bei akuter Bronchitis und Sinusitis eingesetzte Präparat Gelomyrtol[®] ist eine Mischung aus α -Pinen, Limonen und Cineol. Sobrerol wirkt gegen chronische Rhinosinusitis (Bellussi et al., 1990) und wird als natürliches mucolytisches Therapeutikum (Exspectorans) eingesetzt.

Carotinoide und Xanthophylle sind für ihre radikalfangenden Eigenschaften bekannt (¹O₂-Quencher, Römp-Online, 2006). β,β -Carotin bildet zudem die Vorstufe für Vitamin A, das für den menschlichen Körper essentiell ist. Die intensiven Geruchseigenschaften der Norisoprenoide dienen Pflanzen als Attraktantien für das Anlocken von Insekten zur Bestäubung. Einige Apocarotinale, wie die Abscisinsäure dienen als Wachstumsregulatoren in Pflanzen (Barrero et al., 2005).

Aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* cv Morocco) isoliertes 3-Hydroxy- β -Ionon inhibierte das Wachstum von Keimlingen des Eisbergsalats (*Lactuca sativa*) (Kato-Noguchi et al., 1993).

3.1.4 Terpenbiotransformationen

3.1.4.1 Vorteile der biotechnologischen Produktion von Aromastoffen

Die biotechnologische Produktion von Aromastoffen gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Aufgrund der anhaltend hohen Nachfrage aus der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, aber auch zunehmend der Pharmaindustrie, ist der weltweite Bedarf nicht mehr alleine durch Extraktion aus pflanzlichem Material zu decken. Die Wirtschaftlichkeit der extraktiven Gewinnung von Aromakomponenten ist aufgrund der geringen Konzentration nur in den seltensten Fällen gegeben, was ein Grund für die chemische Synthese der meisten Aromastoffe ist.

Die Biotransformation bietet einige wesentliche Vorteile. Sie geht von einfachen, in großen Mengen verfügbaren und somit preiswerten Ausgangsverbindungen aus. Es handelt sich in der Regel um Abfallprodukte aus industriellen Prozessen, deren Preis in der Regel nur wenige Dollar pro Kilogramm beträgt und die zu mehreren Tausend Tonnen jährlich anfallen. Diese Precursoren werden zudem aus nachwachsenden Rohstoffen produziert und sind somit im Gegensatz zu Produkten aus der Erdölindustrie nahezu unbegrenzt verfügbar (Berger und Schrader, 2001).

Zudem kann die Abhängigkeit von landwirtschaftlichen Produkten, als Rohstoffe der Aromastoffe, ein Problem darstellen, da klimatische Veränderungen, Pflanzenkrankheiten oder geopolitische Instabilität zu einer lokalen Verknappung führen können (Krings und Berger, 1998).

Das Interesse an der biotechnologischen Transformation ist aufgrund der rechtlichen Einstufung als „natürliches Aroma“ und der damit steigenden Verbraucherakzeptanz aus wirtschaftlichen Gründen hoch. Zudem ist die chemische Synthese oft mit einer komplexen Anzahl an Stufen und einer jeweils aufwendigen Reinigung verbunden, während enzymatische Umsetzungen das Zielprodukt oft in einem Schritt erzeugen. Meist finden Biotransformationen in wässrigen Systemen statt, was sowohl ökologisch, wie auch wirtschaftlich sinnvoll ist. Die enzymatischen Verfahren haben oft den Vorteil einer stereospezifischen Produktbildung, die durch Chemosynthesen nur schwer erreicht werden kann.

Die Transformationsleistung vieler Mikroorganismen, wie z.B. aus Hefen, Bakterien sowie von Asco- und Basidiomyceten ist mittlerweile intensiv erforscht worden. Einige Biotransformationswege sind bereits auf molekularbiologischer Ebene untersucht worden. So gelang die Überexpression eines Cytochrom-P450_{cam}-Gens

aus Pseudomonaden in *E. coli* und die Biotransformation von α -Pinen zu (Z)-Verbenol (Bell et al., 2002).

Die Biotransformation von α -Pinen mit Mikroorganismen ist bereits vor über 45 Jahren erstmals beschrieben und in zahlreichen Folgepublikationen mit einer ganzen Reihe von Mikroorganismen durchgeführt worden (Bhattacharyya et al., 1960; Trudgill, 1994). Van Dyk et al. (1998) erreichten mit der Hefe *Hormonema sp.* Produktausbeuten von 300 mg L⁻¹ Verbenon und 400 mg L⁻¹ Verbenol nach 96 Stunden.

3.1.4.2 Geeignete Enzymsysteme und wichtige Reaktionen

Eine Terpenbiotransformation kann nur erfolgen, wenn der verwendete Pilz über ein geeignetes Enzymsystem verfügt. Bei den vorwiegend saprophytisch oder parasitisch wachsenden Pilzen sind diese Enzymklassen meist aufgrund ihrer natürlichen Umgebung vorhanden. Sie wachsen häufig an Bäumen oder im Unterholz und haben dadurch die Fähigkeit, komplexe Ausgangsverbindungen wie Lignin und Cellulose oxidativ abzubauen. Man unterscheidet zwischen einer Detoxifikationsreaktion, bei der unpolare Terpene konjugierbar und damit als polare Moleküle ausgeschieden werden, und einer Nutzung des Substrates als C-Quelle, z.B. über β -Oxidation ähnlich dem Abbau der Fettsäuren.

Wichtige Reaktionen wie z.B. Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Hydrolyse und Reduktionen sind biotechnologisch durchführbar. Eine Übersicht über die Enzyme, die zunächst nur in Pflanzen, später aber auch in Mikroorganismen entdeckt wurden, zeigt **Tab. 3-1**.

Tab. 3-1 Für die mikrobielle Terpententransformation verantwortliche Enzymsysteme mit ihren Reaktionen (modifiziert nach van der Werf et al., 1997)

Enzym	Reaktionstyp
Monooxygenase	Hydroxylierung Epoxidierung
Reduktasen	Reduktion
Hydrolasen (Esterasen, Lipasen)	Hydrolyse und reverse Hydrolyse
Oxidoreduktasen (z.B. Peroxidasen)	Redox-Reaktionen
Alkoholdehydrogenasen	Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden und Ketonen

Eine der wichtigsten Reaktionen in der Aromabiotechnologie ist die allylische Hydroxlierung, die zu interessanten Aromastoffen oder deren direkten Vorstufen, wie z.B. Carveol und Verbenol führt.

Eine allylische Hydroxylierung kann mit oder ohne Umlagerung der Doppelbindung ablaufen. Die Umlagerung lässt sich zum einen über einen radikalischen Übergangszustand erklären, wie er am Ende des Oxidationszyklus der Cytochrom-P450-Monooxygenasen vorliegt, oder durch Bildung eines radikal-kationischen Zwischenproduktes, das bei Peroxidase-vermittelten Reaktionen vorkommt.

Die Bildung einiger Transformationsprodukte aus α -Pinen und Limonen durch allylische Oxidation zeigt **Abb. 3-3**.

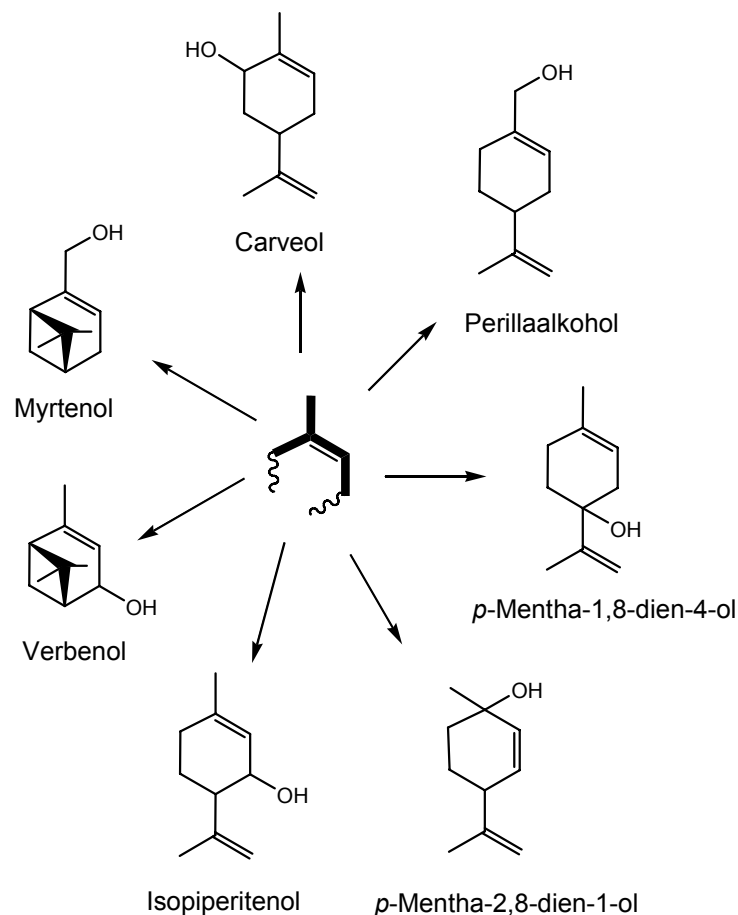


Abb. 3-3 Durch allylische Oxidation entstandene Transformationsprodukte der Biotransformation von α -Pinen und Limonen (Berger et al., 2002)

Für die Oxyfunktionalisierung der untersuchten Terpenkohlenwasserstoffe können sowohl intra- als auch extrazelluläre Enzyme verantwortlich sein. Extrazelluläre Enzyme dienen dem Abbau komplexer organischer Verbindungen wie z.B. Lignin. Diese können dann von Pilzen metabolisiert und als Energiequelle genutzt werden. Aus dem Weißfäulepilz *Pleurotus sapidus* wurden Laccasen und

Lipasen isoliert und charakterisiert, die im Falle der Laccase Lignin oxidieren können (Linke et al., 2005a, b). Weitere Exoenzyme sind Peroxidasen, die ebenfalls komplexe organische Verbindungen oxidativ abbauen können, und auf die in Kapitel 3.4 noch ausführlicher eingegangen wird.

Bei den intrazellulären Enzymen haben Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine große Bedeutung. Sie sorgen durch die Übertragung von Sauerstoff auf nicht-aktivierte aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe für eine Erhöhung des polaren Anteils und damit für eine bessere Wasserlöslichkeit. Dies spielt insbesondere bei Entgiftungsreaktionen xenobiotischer Verbindungen wie z.B. polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs) eine wichtige Rolle. Mittlerweile sind mehr als 6000 P450-Monooxygenase-Sequenzen bekannt, wovon etwa 1000 aus Pilzen stammen (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Man geht von etwa 150 Monooxygenasen in Basidiomyceten aus, von denen erst einige wenige identifiziert worden sind (van den Brink et al., 1998). So konnte aus dem Weißfäulepilz *Coriolus versicolor* eine neue Klasse von P450-Monooxygenase-Genen, ebenso wie die dazugehörige Cytochrom-P450-Reduktase identifiziert werden (Ichinose et al., 2002 a und b). Das Funktionsprinzip der Hydroxylierung ist in **Abb. 3-4** dargestellt:

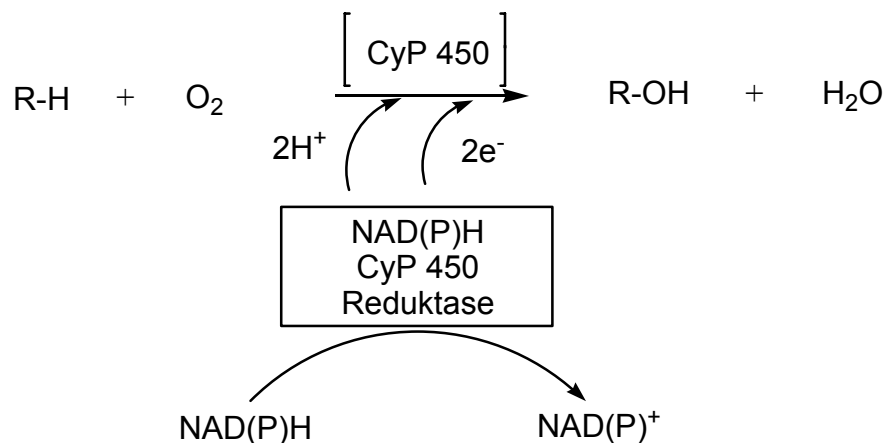


Abb. 3-4 Hydroxylierung über das Zweikomponentensystem P450-Monooxygenase / Reduktase (nach Lutz-Wahl, 1999)

Monooxygenasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum eine Hämgruppe, mit einem Fe(III)-Ion. Die Bindung des Substrates erfolgt zunächst am Fe(III)-Ion, welches dann zum Fe(II)-Ion reduziert wird. Das Fe(II)-Ion kann nun Sauerstoff binden und durch heterolytische Spaltung und Reduktion auf das Substrat übertragen. Die Reaktionsprodukte sind zunächst Wasser und das hydroxylierte Reaktionsprodukt.

Die Regeneration des Fe(II)-Ions erfolgt über eine Cytochrom-P450-Reduktase, die bei höheren Pilzen zusammen mit der P450-Monooxygenase als gemeinsamer Komplex membrangebunden vorliegt. Zur Regeneration wird NAD(P)H als Cofaktor benötigt.

Die meisten P450-Monooxygenasen in Pilzen werden am endoplasmatischen Retikulum vermutet. Sie lassen sich nur schwer isolieren (van den Brink et al., 1998). Im Rahmen der Experimente mit α -Pinen sollten durch die Verwendung unterschiedlicher Transformationsansätze mit erhöhter Biomasse, bzw. der Konzentrierung und Zerstörung der Pilzmembranen durch Lyophilisierung mögliche P450-Monooxygenaseaktivitäten in Pilzen untersucht werden.

3.1.5 Problematik bei der Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen

Bei der Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen treten eine Reihe von Schwierigkeiten auf, die im weiteren Verlauf näher diskutiert werden. Ein Problem ist die Flüchtigkeit, die zu einem Verlust an zudosiertem Substrat über die Gasphase führt. In den Transformationsansätzen mit α -Pinen waren aber nach der Umsetzung immer noch ausreichende Mengen an Substrat nachweisbar. Die Flüchtigkeit der Transformationsprodukte wird durch die Oxyfunktionalisierung und der damit verbundenen besseren Wasserlöslichkeit deutlich erniedrigt.

3.1.5.1 Empfindlichkeit der eingesetzten Substrate

α -Pinen, Farnesen und die zum enzymatischen Abbau eingesetzten Carotinoide sind strukturell bedingt anfällig gegenüber Autoxidation. Diese Autoxidation führt in der Regel zu den gleichen Produkten, wie sie auch in der enzymatischen Umsetzung zu finden sind. So resultierte die Autoxidation von α -Pinen in der Bildung von (*E*)-Pinocarveol, (*E*)-Verbenol, (*E*)-Carveol, Verbenon, Myrtenal und α -Pinenoxid als Hauptprodukte. Letzteres kann in wässriger saurer Lösung leicht zu (*E*)-Sobrerol hydratisiert werden. Der Mechanismus der Autoxidation läuft über die Bildung allylischer Hydroperoxide, die durch Folgereaktionen zu den oben erwähnten Verbindungen umgesetzt werden (Moore et al., 1956). Die Autoxidation des Sesquiterpens Farnesen läuft in wässrigen Systemen relativ langsam (Anet, 1969). Das Hauptprodukt der Biotransformation, 7-Hydroxyfarnesen wurde in den Kontrollwerten nur in geringen Konzentrationen von $<1 \text{ mg L}^{-1}$ nachgewiesen. Auch Carotinoide sind aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften instabil und zeigen daher schon bei niedrigen Temperaturen eine geringe Bildung der Zielverbindungen (Mordi et al., 1991). Autoxidative Prozesse können auch durch Metall-Ionen, wie Fe(II)-Ionen, gefördert werden.

Neben der Autoxidation kommt es häufig auch zur *E/Z*-Isomerisierung, Racemisierung, Hydratisierung, Cyclisierung und Polymerisation der Monomere (Clark et al., 1992).

3.1.5.2 Geringe Wasserlöslichkeit der Terpene

Die zur Biotransformation eingesetzten Verbindungen α -Pinen und Farnesen sind aufgrund ihrer stark lipophilen Eigenschaften in wässrigen Systemen nur schlecht löslich. Dabei zeigt das bicyclische α -Pinen mit 5 mg L^{-1} im Gegensatz zum Farnesen eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit. Zweiphasige Umsetzungen mit Lösungsmitteln wie z.B. Decan oder der Einsatz von Emulgatoren können die Substratverfügbarkeit verbessern. Dies wurde im Fall der enzymatischen Umsetzung der wasserunlöslichen Tetraterpene mit Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* durch den Emulgator Tween 80 erreicht, um sie hierdurch für die oxidative Spaltung verfügbar zu machen. Die Löslichkeiten einiger Terpenoide ist in **Tab. 3-2** dargestellt.

Tab. 3-2 Log P-Werte und Wasserlöslichkeit (bei 25 °C) einiger terpenoider Substrate, berechnet nach www.logp.com

Substrat	Log P-Wert	Wasserlöslichkeit [mg L^{-1}]
α -Pinen	4,44	4,58
Farnesen	6,50	0,29
Verbenol	2,28	1826
Verbenon	2,24	1004
7-Hydroxyfarnesen	5,90	0,46
<i>p</i> -Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol	4,23	16
β -Ionon	4,23	54,5

Generell weisen oxyfunktionalisierte Terpene gegenüber ihren Ausgangsverbindungen eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit auf. So hat (*E*)-Verbenol eine 400-mal höhere Wasserlöslichkeit als α -Pinen. Die Löslichkeit der Carbonylverbindungen wie z.B. Verbenon und Myrtenal ist im Gegensatz zu den entsprechenden Alkoholen aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen deutlich geringer.

3.1.5.3 Toxizität von Terpenen und Terpenoiden

Die antimikrobielle Wirkung von Terpenen und Terpenoiden ist allgemein bekannt. Daher werden sie in zahlreichen Reinigungsmitteln eingesetzt. Auch für die eingesetzten Mikroorganismen sind Mono- und Sesquiterpene cytotoxisch. Diese lösen sich aufgrund ihrer guten Lipidlöslichkeit gut in den Zellmembranen der Mikroorganismen. Die Folge ist eine Störung der Membranintegrität und der Verlust der Permeabilität (Knobloch et al., 1988). Konzentrationen über 0,05% (v/v) führen normalerweise zu einem Wachstumsstopp (van der Werf et al., 1997). Ein guter Anhaltspunkt für die Cytotoxizität einer Verbindung ist der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Wasser, der log P-Wert. Besitzt eine Substanz einen Wert zwischen 1 und 5, so gilt sie als cytotoxisch. Das in dieser Arbeit verwendete α -Pinen ist somit als noch cytotoxisch anzusehen, während Farnesen mit einem log P von über 5 deutlich weniger cytotoxisch wirkt. Die oxyfunktionalisierten Verbindungen zeichnen sich grundsätzlich durch einen niedrigeren log P-Wert, und sind somit in Hinblick auf ihre Cytotoxizität generell als bedenklicher einzustufen (Knobloch et al., 1988).

3.1.5.4 Kulturführung und Haltbarkeit der Biokatalysatoren

Die Biotransformation mit höheren Pilzen erfordert im Vergleich zu Bakterien und Hefen manchmal eine zeitaufwendigere Kulturführung von mehreren Wochen, bis die gewünschten Biomassen/Produktausbeuten erreicht sind. Dadurch erhöhen sich die Kosten und die Gefahr einer Kontamination erheblich. Zudem steigt damit auch die Gefahr des chemischen Substrat- und Produktabbaus. Die Kulturführung in Ganzzellsystemen kann sich aber im Vergleich zur Umsetzung mit aufwendig gereinigten Enzymen trotzdem als kostengünstiger erweisen.

Ein weiteres Problem stellt die Haltbarkeit und Wiederverwendbarkeit des eingesetzten Biokatalysators da. In den meisten Fällen ist ein erneuter Einsatz nur mit einem hohen Verlust an Aktivität zu erreichen.

3.2 Biotransformation des Monoterpens α -Pinen

Für den Vergleich der Transformationsleistung unterschiedlicher Biotransformationsansätze mit α -Pinen wurden fünf Stämme aus der Gruppe der Basidio- und Ascomyceten ausgewählt. Besonderer Wert wurde hier auf die Bildung von Verbenol und Verbenon gelegt, die als allylische Oxidationsprodukte bekannt sind.

3.2.1 Transformationsleistung ausgewählter Mikroorganismen

Drei Asco- und zwei Basidiomyceten wurden in dieser Untersuchung verwendet. Beim Ascomyceten *Penicillium solitum* handelt es sich um ein Isolat von Kiwis, das in Submerskultur eine hohe Transformationsleistung von α -Pinen mit Produktausbeuten von bis zu 80 mg L⁻¹ an (*E*)-Verbenol und bis zu 35 mg L⁻¹ Verbenon bildete. Allerdings wurden hier 47 mM Substrat eingesetzt (im Screening 10 mM; siehe 2.1.6), was aber auf eine hohe Terpentoleranz dieses Pilzes schließen lässt. Dieser Organismus war zudem in der Lage eine hauptsächlich limonenhaltige Reststofffraktion aus der citrusverarbeitenden Industrie zu interessanten aromaaktiven Verbindungen zu transformieren (Brauer, 2004). *Stemphylium botryosum*, ein Isolat von Salbei, bildete *p*-Mentha-1,4-dien-9-ol aus γ -Terpinen (Krings et al., 2005) und im Screening mit α -Pinen in Submerskultur ebenfalls große Mengen an (*E*)-Verbenol und Verbenon (Brauer, 2004). *Chaetomium globosum* als ein weiterer Vertreter der Ascomyceten katalysierte die Reaktion von (+)-Valencen zu Nootkaton (Kaspera et al., 2005) und zeigte zudem eine regioselektive Bildung von 7-Hydroxyfarnesen mit Ausbeuten von bis zu 160 mg L⁻¹ (Kaspera, 2004).

Der Basidiomyzete *Pleurotus sapidus* produzierte ebenfalls allylische Transformationsprodukte aus Limonen, α - und β -Pinen in Submerskultur (Onken, 1999). Das lyophilisierte Pilzmyzel wurde erfolgreich zur Transformation von (+)-Valencen zu Nootkaton mit Ausbeuten von bis zu 250 mg L⁻¹ in 13 Stunden eingesetzt (Kaspera, 2004).

Der zweite untersuchte Basidiomyzete, *Pleurotus eryngii*, ist bereits durch seine Fähigkeit zum Abbau von Carotinoiden durch eine extrazelluläre Peroxidase charakterisiert worden (Zorn et al., 2003a; Langhoff, 2002).

3.2.2 Transformationsmöglichkeiten durch Mikroorganismen

Alle untersuchten Organismen waren zur Biotransformation von α -Pinen in der Lage. *Pleurotus sapidus* zeigte hierbei die größten Produktausbeuten in allen untersuchten Transformationsansätzen. Dabei wurden die allylischen Oxidationsprodukte (*E*)-Verbenol und Verbenon als Haupttransformationsprodukte identifiziert. Daneben wurden Myrtenol und Myrtenal in geringen Mengen als Reaktionsprodukte einer Oxidation am primären C-Atom in allylischer Position quantifiziert. Als weitere Transformationsprodukte wurden (*E*)-Pinocarveol, (*E*)-Carveol und (*E*)-Sobrerol, vor allem bei der Umsetzung mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* detektiert, die sich aus einem intermediären Pinenepoxid ableiten lassen (**Abb. 3-5**).

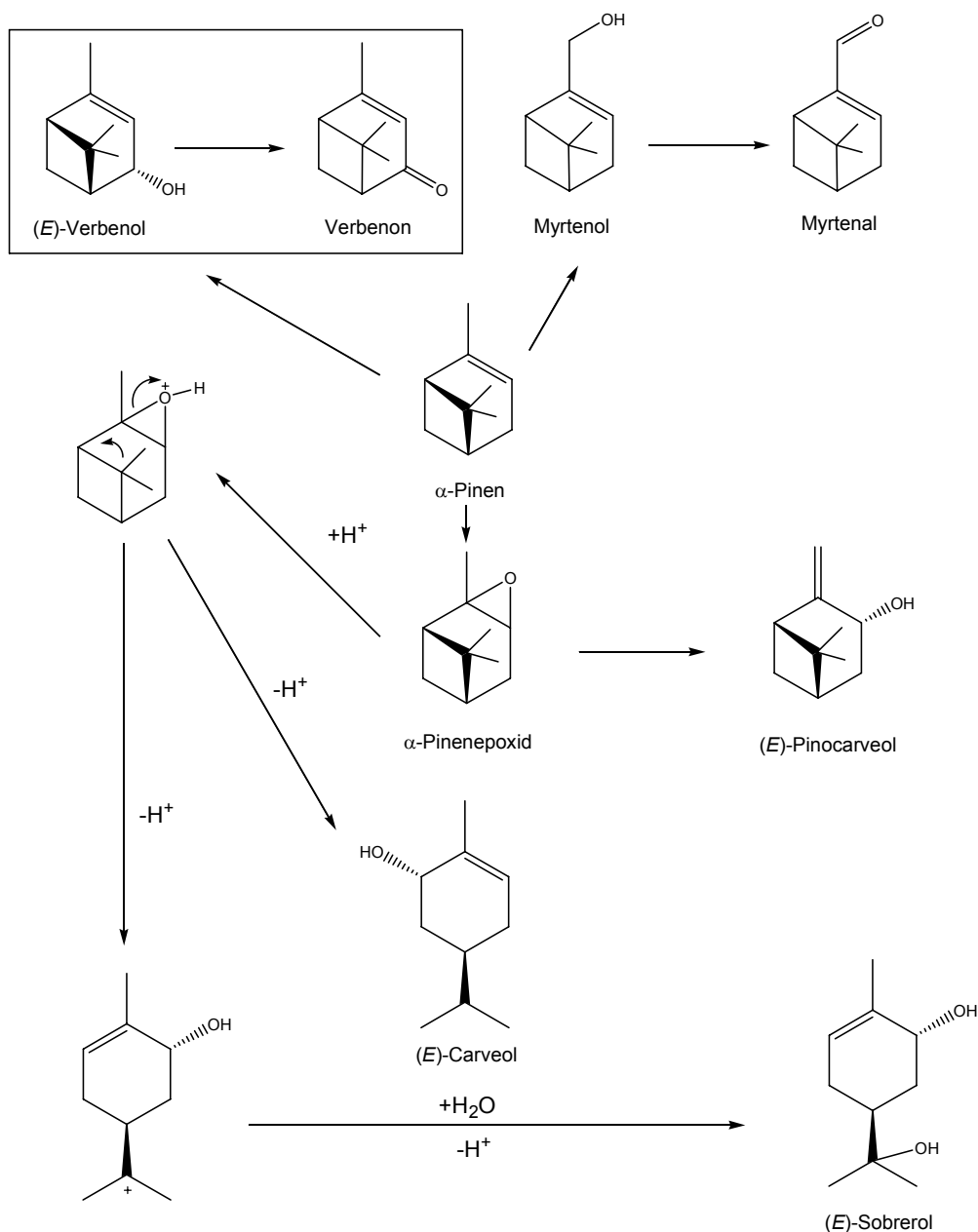


Abb. 3-5 Haupttransformationsprodukte von α -Pinen mit *Pleurotus sapidus* und deren postulierten Bildungswege

Der Ascomyzet *Aspergillus niger* bildete ebenfalls (*E*)-Verbenol, Verbenon und (*E*)-Sobrerol als Haupttransmutationsprodukte (Prema et al., 1962). Wright et al., 1986 isolierten das Bakterium *Serratia marcescens*, welches auch als Hostienkeim bekannt ist, aus Klärschlamm. Bei der Biotransformation des α -Pinsens (siehe 2.1.6 ff) entstanden ebenfalls hauptsächlich die drei genannten Transmutationsprodukte. Die Einführung einer Hydroxylgruppe in das bicyclische System des α -Pinsens führt bei Basidiomyceten überwiegend zu (*E*)-Isomeren. Als Haupttransmutationsprodukt bildete sich nach Zugabe von (+)- und (-)-Enantiomeren des α -Pinsens ausschließlich (*E*)-Verbenol. Diese Reaktion ist somit als regioselektiv anzusehen (Busmann et al., 1994)

Neben der direkten Hydroxylierung ist auch eine Epoxidierung durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen möglich. Das entstehende α -Pinenepoxid wird dabei von Mikroorganismen weiter metabolisiert und führt zu (*E*)-Sobrerol sowie zu (*Z*)- und (*E*)-Carveol.

Studien von Griffith (1987 a, b) zeigten den Abbau von α -Pinen über ein Epoxid als Zwischenprodukt mit einem *Nocardia*-Stamm. Für den Abbau konnte eine isolierte α -Pinenoxidlyase verantwortlich gemacht werden, die eine Öffnung des bicyclischen Ringes und die Bildung einer Aldehydes katalysiert (**Abb. 3-6**).

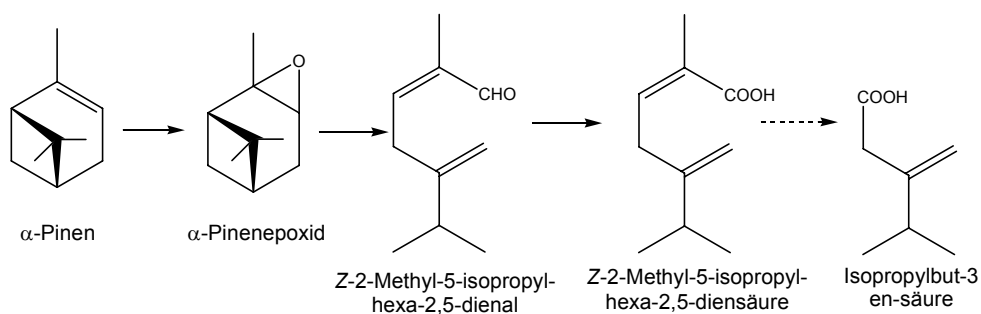


Abb. 3-6 Abbau von α -Pinen durch *Nocardia* spp. (Griffith et al., 1987a)

Der Abbau von α -Pinenepoxid konnte auch bei *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761 gezeigt werden (Zorn et al., 2004). Hauptprodukte waren hier Isonovalal, Novanal, Novalol und Novalonsäure.

Die Biotransformation mit *Botrytis cinera*, einem phytopathogenen Ascomycet, führte zur Bildung von Verbenon als Haupttransmutationsprodukt, während (*E*)-Pinocarveol, 9-Hydroxy- α -Pinen und 4-Hydroxy- α -Pinen-6-on in geringeren Konzentrationen auftraten (Farooq et al., 2002). Interessant ist die Oxyfunktionalisierung an Position 9, da sie an einem nicht-aktivierten Kohlenstoffatom erfolgt, was bei der Biotransformation selten beobachtet wird.

Die Biotransformation von α -Pinen mit einer *Aspergillus* sp. und *Penicillium* sp. brachten eine 15-bzw. 8-fache Erhöhung bei einer UV-induzierten Mutation gegenüber dem Wildtyp. Die Ausbeute an Verbenol betrug hier 23%. Überraschenderweise wurden keine signifikanten Mengen an weiteren Produkten identifiziert. Es wurde keine weitere Dehydrogenase-katalysierte Oxidation zum Verbenon festgestellt, wie eine parallele Dosierung von Verbenol zeigte (Agrawal et al., 1999). In weiteren Untersuchungen wurde eine *Aspergillus niger*-Spezies isoliert, die eine hohe Transformationsaktivität zum Verbenon mit Ausbeuten von 16% zeigte (Agrawal et al., 2000a). Leider wurden keine Angaben zur Ausbeute von Verbenol als Zwischenprodukt gemacht.

Für den Mechanismus der Biotransformation von α -Pinen kommt neben der Hydroxylierung und Epoxidierung durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (mit anschließender Weiteroxidation), auch ein radikalischer oder kationischer Mechanismus über die Bildung von Hydroperoxiden in Frage, wie er bei der Behandlung der Biotransformation von Farnesen diskutiert wird (3.3.2). Dieser Mechanismus über die Bildung eines α -Pinen-Kations wird von Wright et al. (1986) vorgeschlagen.

3.2.3 Erhöhung der Produktausbeute durch Zellkonzentrate und Lyophilisate

Für die Experimente zur Untersuchung auf Cytochrom-P450-Monooxygenaseaktivitäten wurden Zellkonzentrate und Lyophilisate der untersuchten Kulturen angefertigt, um eine Erhöhung der Produktausbeuten zu erreichen.

3.2.3.1 Transformation mit erhöhter Biofeuchtmasse

Die Biotransformation wurde in konzentrierten Kulturen mit einer um den Faktor 20 erhöhten Biomasse durchgeführt. Es zeigten sich durch diesen Schritt deutliche Steigerungen der Transformationsleistung in Bezug auf die Bildung von Verbenol und Verbenon. So zeigte *P. sapidus* eine Vervierfachung der Produktion von (*E*)-Verbenol, während die Oxidation zum Verbenon in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute sogar um den Faktor 6 gesteigert werden konnte. Die Ursachen hierfür können in einer besseren Substratverfügbarkeit durch Adsorption an die Zellmembran des Pilzes liegen. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit und der gegenüber Wasser geringeren Dichte befindet sich das Substrat bei der Submerskultivierung auf der Oberfläche und steht damit zur Transformation nur eingeschränkt zur Verfügung. Das Verhältnis von mg Produkt pro g Trockenmasse wurde in Bezug auf die (*E*)-Verbenolbildung hierbei jedoch nicht gesteigert. Es konnte aber eine höhere Verbenonbildung beobachtet werden.

Konzentrierte Zellkulturen werden häufig bei der Biotransformation mit Bakterien eingesetzt (Watanabe et al., 1998; Choi et al., 1997). Die Biotransformation mit konzentriertem Pilzmyzel ist bislang wenig untersucht worden. Die Produktion von Nootkaton aus Valencen mit konzentrierten Kulturen von *Chaetomium globosum* ist beschrieben. Auch hier konnte eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden, während die Transformationsrate in Bezug auf mg Produkt pro g Trockenmasse hierdurch kaum beeinflusst wurde (Kaspera, 2004). Erhöhte Zelldichten von *Pycnoporus cinnabarinus* zeigten eine effektive Steigerung der Biotransformation von Ferulasäure zu Vanillin (Oddou et al., 1999). Vom Mesokarp der Kokosnuss isolierte Kulturen von *Paecilomyces variotii* zeigten mit konzentrierter Biomasse eine Biotransformation von 4-Hydroxycimtsäure zu 4-Hydroxybenzoesäure mit Ausbeuten von 200 mg L⁻¹ innerhalb von 4 Tagen, während mit klassischen Submerskulturen nur 100 mg L⁻¹ in 8 Tagen erzielt wurden (Sachan et al., 2006) (**Abb. 3-7**).

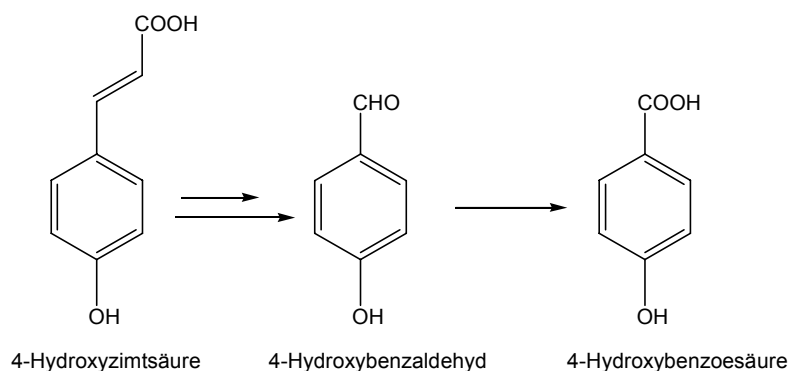


Abb. 3-7 Biotransformation von 4-Hydroxyzimtsäure zu 4-Hydroxybenzoessäure durch *P. variotti* (Sachan et al., 2006)

3.2.3.2 Gefriergetrocknete Kulturen

Ein effizienter Weg zur Konzentration von Biokatalysatoren stellt die Gefrier-trocknung dar. Hierbei wird der Pilzkultur bei niedrigen Temperaturen und hohem Vakuum auf schonendem Wege gefrorenes Wasser (unterhalb des Tripelpunktes) durch Sublimation entzogen (Roempp-online, 2006).

Bei der anschließenden Zerstörung der Zellfragmente durch Verreiben zu einem Pulver sind membrangebundene Enzyme sowie intrazelluläre Bestandteile für das Substrat besser zugänglich als in Ganzzellsystemen, in denen die Zellwand eine natürliche Barriere darstellt. Auch kann das entstandene Produkt nun leichter in das Transformationsmedium abgegeben werden. Das Wachstum der Pilzkultur ist nach der Lyophilisierung beträchtlich gestört (Kaspera, 2004). Enzymsysteme können jedoch noch intakt sein. Dabei ist zu beachten, dass die Biotransformation von α -Pinen innerhalb von kurzer Zeit (20 h) zu einer hohen Produktausbeute von 155 mg L^{-1} (*E*)-Verbenol führte.

Da das Pilzmyzel vor der Lyophilisierung mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen wurde, kommen für die Transformation vom Pilz ins Medium abgegebene Exoenzyme, wie zum Beispiel Peroxidasen nicht in Frage. Auch eine durch Substratzugabe induzierte Produktion von Exoenzymen scheint in diesem kurzen Zeitraum eher unwahrscheinlich. Es muss sich also bei dem für die Transformation verantwortlichen Enzymsystem entweder um ein membrangebundenes, wie z.B. P450-Monooxygenasen, oder intrazellulär zugänglich gemachtes Enzym wie z.B. Lipoxygenasen handeln.

Mit lyophilisiertem Pilzmyzel lassen sich Umsetzungen mit hoher Enantiomerenreinheit erzielen. So konnte mit *Aspergillus oryzae* in Heptan oder Pentadecan eine Veresterung von 2-Phenylpropansäure zum (*S*)-2-Phenylpropan-

säureethylester mit Ausbeuten von 90% erreicht werden, während *Rhizopus oryzae* in Toluol den (*R*)-Ester mit einer Enantiomerenreinheit von 97% produzierte (Gandolfi et al., 2001).

Das lyophilisierte Myzel lässt sich auch mit so genannten „resting cells“ vergleichen, die als ruhende Zellen vorübergehend kein Wachstum, wohl aber noch Enzymaktivität zeigen können. Im Falle der Terpenttransformation könnten die Enzyme nach der Lyophilisierung auf dem Pilzmaterial immobilisiert und so für die Transformation verantwortlich sein. „Resting cells“ von einem *Aspergillus niger*-Stamm transformierten α -Pinen zu Verbenon mit einer molaren Ausbeute von 16,5% (Agrawal und Joseph, 2000 b). Auch andere Monoterpene, z.B. Limonen, wurden zu aromaaktiven Verbindungen umgesetzt (Divyashree et al., 2006).

Der Einsatz von Lyophilisaten führte zu einer beschleunigten Transformation von α -Pinen. Im Fall von *Pleurotus sapidus* konnte dabei eine Verachtfachung der Ausbeute an (*E*)-Verbenol in mg L^{-1} gegenüber der Submerskultivierung und sogar eine um den Faktor 20 höhere Ausbeute an Verbenon erreicht werden. Es wurde jedoch nicht mit allen untersuchten Organismen eine Steigerung der Produktkonzentration erreicht. *Chaetomium globosum* zeigte bei Verwendung der Lyophilisate eine vergleichsweise geringe Transformationsleistung, was schon bei der Biotransformation von Valencen gezeigt wurde (Kaspera, 2004).

3.2.4 Oxidation von (Z)-Verbenol durch *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii war zur Transformation von (Z)-Verbenol zu Verbenon fähig, konnte jedoch selbst durch Hydroxylierung von α -Pinen kaum Verbenol bilden. Für die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen sind verschiedene Reduktasen, wie z.B. eine Alkoholdehydrogenase, die auch in der Leber des Menschen vorkommt, verantwortlich.

Im Fall von *Pleurotus eryngii* kommen prinzipiell mehrere Enzyme in Frage. Zum einen zeigt eine aus dem Kulturüberstand isolierte polyvalente Peroxidase ein hohes Potential zum Abbau von Lignin und Carotinoiden (Ruiz-Dueñas et al., 1999; Zorn et al., 2003a). Hierbei handelt es sich um ein Exoenzym, welches in das Kulturmedium ausgeschieden wird. Neben der Oxidation von phenolischen Verbindungen werden auch nicht-phenolische Verbindungen wie z.B. Veratrylalkohol zu Veratrylaldehyd oxidiert (Bouws, 2007; Pérez-Boada et al., 2005; Harvey et al., 1986). Somit besteht auch hier die Möglichkeit, das (Z)-Verbenol zu Verbenon oxidiert werden kann, auch wenn es sich hierbei nicht um eine aromatische Verbindung handelt.

Aus *Pleurotus eryngii* ist ebenfalls ein System aus Aryl-Alkoholoxidase (AAO; EC 1.1.3.7) und Aryl-Alkoholdehydrogenase (AAD; EC 1.1.1.90) bekannt. Das System ist wichtig für die Produktion von H_2O_2 , das für den oxidativen Abbau von Lignin z.B. durch Peroxidasen benötigt wird. Verschiedene aromatische, aber auch nicht aromatische α,β -ungesättigte primäre Alkohole mit werden von AAO oxidiert. Bei der AAO handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym, während AAD nur intrazellulär lokalisiert wurde (Guillén et al., 1992; Gutiérrez et al., 1994). AAD reduziert den von AAO produzierten Aldehyd wieder zurück zum Alkohol, der dann erneut von AAO zum Aldehyd oxidiert werden kann. In diesem Zyklus entsteht aus der durch AAO-katalysierten Reaktion vom Alkohol zum Aldehyd permanent H_2O_2 (Abb. 3-8).

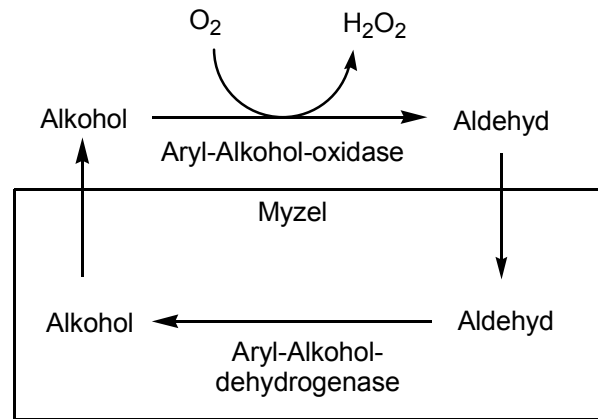


Abb. 3-8 Postulierter Mechanismus für die extrazelluläre Produktion von H_2O_2 durch *P. eryngii* in Anwesenheit von aromatischen Alkoholen und Aldehyden (nach Guillén et al., 1994)

AAD katalysieren auch die Rückreaktion vom Alkohol zum Aldehyd. Oxidationen von allylischen Alkoholen zum entsprechenden Aldehyd mit rekombinaten AAD's aus *E. coli* zeigten eine etwa gleich hohe Umsatzrate im Vergleich zum aromatischen Benzylalkohol. Hier wurden auch terpenoide Substrate wie Geraniol und Nerol oxidiert, jedoch nicht Citronellol. Auch Perillaalkohol wurde oxidiert (Curtis et al., 1999). Durch gezielte Mutation konnte aus einer Benzyl-Alkoholdehydrogenase aus dem Bakterium *Acinetobacter calcoaceticus* eine Perillaalkohol-Dehydrogenase produziert werden. Diese wies eine wesentlich höhere Substratspezifität gegenüber Perillaalkohol auf und konnte diesen zum entsprechenden Aldehyd oxidieren (Gillooly und Fewson, 1998).

Wichtig für die Oxidation scheint also eine allylische Hydroxyfunktion zu sein, wie sie auch beim Verbenol vorkommt. Eine Oxidation durch eine AAD ist also denkbar, obwohl es sich hierbei um einen sekundären Alkohol handelt. Oxidationen der AAD von sekundären Alkoholen sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die Oxidation von (Z)-Verbenol erfolgte sowohl in Submerskultur als auch mit Lyophilisaten. Die Umsetzung mit separiertem Kulturüberstand lieferte deutlich geringere Ausbeuten als das Pilzmyzel (siehe 2.1.10). Es handelt sich hierbei vermutlich um ein intrazelluläres Enzymsystem, das die Oxidation von Verbenol zu Verbenon katalysiert, oder die Konzentration eines Co-Faktors im Überstand begrenzt die Ausbeute.

3.3 Biotransformation von Farnesen

Das verwendete Farnesenisomerengemisch setzte sich aus (*E*)- α -Farnesen und β -Farnesen, sowie geringe Mengen an nicht quantifizierten weiteren Sesquiterpenen zusammen. Die Oxidationsprodukte des Farnesens stellen für die Aromenindustrie interessante Verbindungen dar, unter anderem ließen sich durch terminale Oxidation des Farnesens Sinensale herstellen. Vor allem α -Sinensal ist als Schlüsselaromastoff (character impact compound) von Orangenölen bekannt (Belitz et al., 2001). Untersuchungen von Kaspera (2004) zeigten jedoch keine Bildung von Sinensalen durch Biotransformation mit höheren Pilzen. Auch in eigenen Experimenten wurden keine Sinensale identifiziert. Mit *Chaetomium globosum* wurde aber ein Organismus gefunden, der mit 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen eine aus der Autoxidation des Farnesens in Apfelschalen bekannte Verbindung in Ausbeuten von bis zu 160 mg L⁻¹ produzierte. Diese zeichnet sich durch eine intensive, nach Orangen erinnernde Geruchsnote aus (Kaspera, 2004).

Aus Screeningexperimenten von Kaspera (2004) ging ein weiterer Organismus (LB 2025, identifiziert als *A. niger*) hervor, der ebenfalls Farnesen mit hoher Ausbeute an 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen biotransformierte. Dieser wurde für die vorliegenden Untersuchungen verwendet. Neben der Bildung des 7-(*E*)-Hydroxyfarnesens entstanden auch weitere interessante Verbindungen, die sich durch fruchtige Noten auszeichneten.

3.3.1 Mikrobielle Transformationen von Farnesen

Die mikrobielle Gewinnung von Sinensalvorstufen, wie 12-Hydroxyfarnesen wurde bereits mit *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* und *Pseudomonas* untersucht (Abraham et al., 1992). Die Umsetzung mit β -Farnesen ergab jedoch keine Transformationsprodukte, was auch die eigenen Untersuchungen zeigten (siehe 2.2.4) Es wurde postuliert, dass das konjugierte Diensystem empfindlich gegenüber Luftsauerstoff und Säuren ist, und die Substanz dadurch abgebaut wird. Eine Oxidation an Position 12 ist somit nicht mehr möglich. Um dieses Problem zu beheben, wurde Farnesen mit Schwefeldioxid als Dienophil zum entsprechenden Sulfolen derivatisiert. Hiermit gelang die mikrobielle Hydroxlierung in Position C 12 mit Ausbeuten von bis zu 27% an 12-Hydroxysulfolen (**Abb. 3-9**).

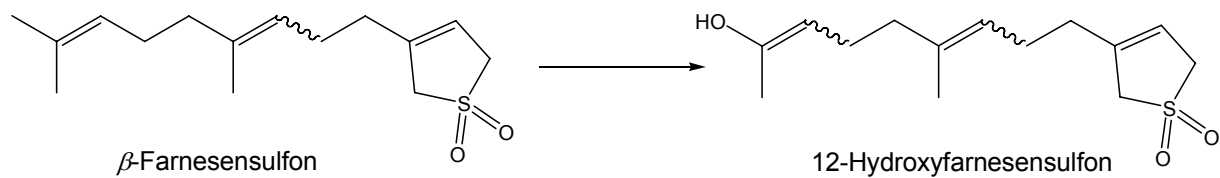


Abb. 3-9 Mikrobielle Oxidation von sulfoniertem β -Farnesen zu 12-Hydroxyfarnesensulfon (Abraham et al., 1992)

Die Einführung einer polaren Funktion in das Farnesenmolekül führt zu einer beschleunigten Weitermetabolisierung. Die Sulfonyl-Gruppe dient hier als eine Art Anker, der aufgrund der besseren Substratverfügbarkeit eine leichtere Reaktion mit dem Farnesenrest ermöglicht (Abraham et al., 1992).

Eine Weitermetabolisierung der monohydroxylierten Verbindungen könnte ein Grund für die starke Abnahme der Transformationsprodukte im Verlaufe der Biotransformation sein (siehe 2.2.3). Diole und Triole des Farnesens wurden bereits bei Biotransformationen mit *Chaetomium globosum* identifiziert (Kaspera, 2004).

Aspergillus niger wurde für die Gewinnung von 12-Hydroxynerodiol aus (*Z*)-/(*E*)-Nerolidol mit Ausbeuten von 9 - 20 mol% verwendet. Die Verbindung gilt als Schlüsselverbindung für die Synthese von α -Sinensal (Hrdlicka et al., 2004; Madyastha und Gurruraja, 1993; Arfmann et al., 1988).

3.3.2 Biotransformation durch *Aspergillus niger* (Isolat von Mango)

Die Transformation von α -Farnesen führte zur Bildung von aromaaktiven Terpenoiden. Dabei vermochten alle untersuchten Organismen als Hauptprodukt 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen zu bilden. Nur *Aspergillus niger* war zur Bildung einer weiteren, geruchlich interessanten Verbindung in der Lage. Diese Verbindung wurde durch Silylierung, GC-MS, sowie durch NMR-spektroskopische Untersuchungen als *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol identifiziert. Hierbei handelt es sich um eine in der Literatur bislang nicht bekannte Verbindung. Die möglichen Bildungswege des 7-(*E*)-Hydroxyfarnesens und des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ols sind in **Abb. 3-10** dargestellt.

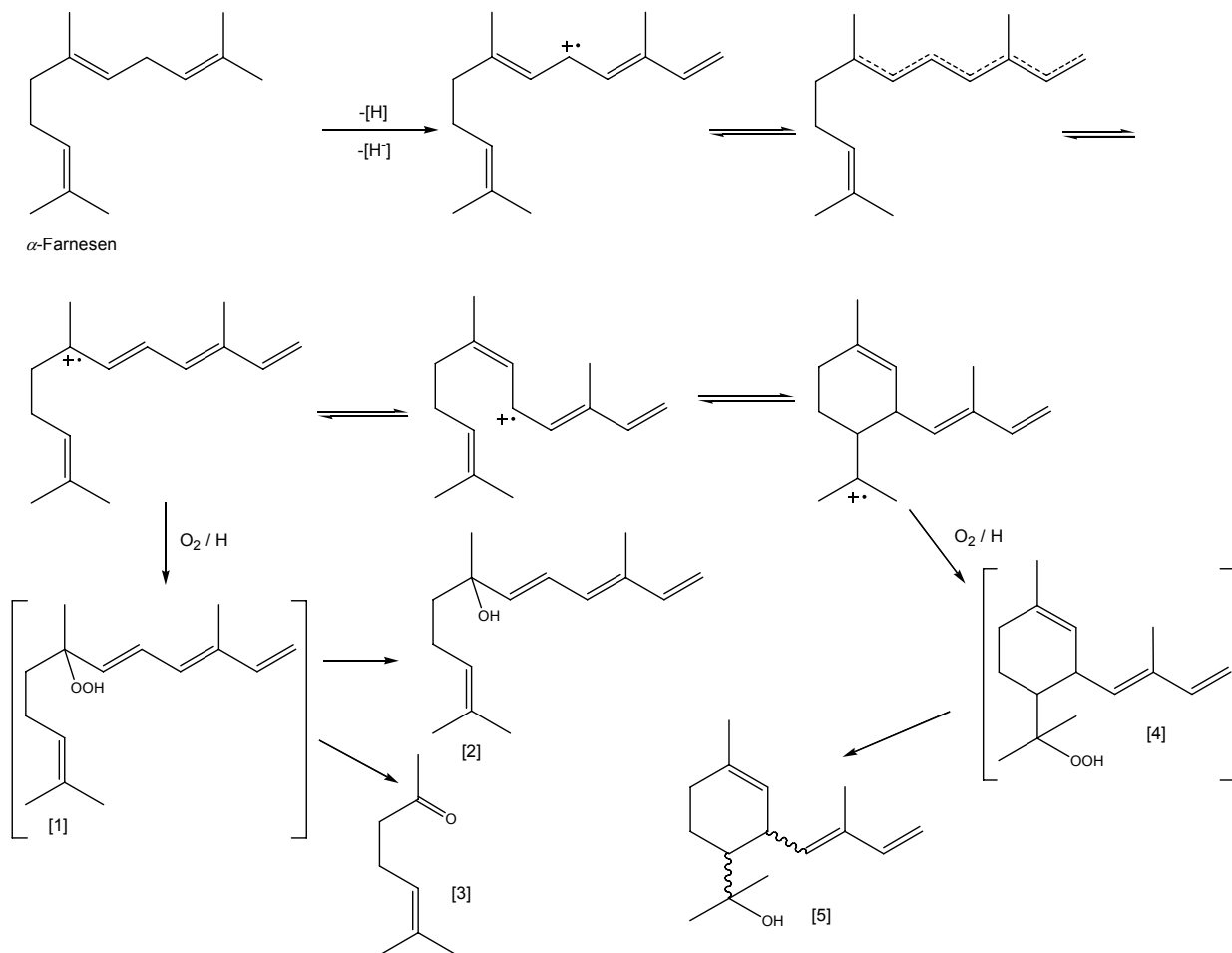


Abb. 3-10: Postulierter Mechanismus der Bildung von 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen und *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol. [1] Farnesen-7-hydroperoxid; [2] 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen; [3] 6-Methyl-5-hepten-5-on; [4] *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol-hydroperoxid; [5] *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol (modifiziert nach Anet, 1969; Fielder et al., 1998). Die Verbindungen [1] und [4] konnten nicht identifiziert werden.

Zunächst kommt es durch Abstraktion eines H-Atoms bzw. Hydrids in der diallylischen Position an C5 zur Bildung eines radikalisch oder kationischen Übergangszustandes. Redoxenzyme aus Pilzen, wie Laccasen können für diese Abstraktion verantwortlich sein. Das gebildete Farnesenradikal bzw. -carbokation wird durch Ladungsverteilung über 7 C-Atome stabilisiert, insbesondere in Position C7 aufgrund des positiven induktiven Effektes von drei Alkylgruppen. Über die Bildung der Hydroperoxide kann es zur Reduktion oder Hydroperoxidspaltung zum 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen oder zur C-C-Spaltung mit Bildung des 6-Methyl-5-hepten-2-ons als Abbauprodukt kommen (Whitaker et al., 2000; Anet, 1972). Die Bildung des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ols kann über eine Umlagerung und (*Z*)-/(*E*)- Isomerisierung mit anschließendem Ringschluss und Verlagerung der Ladung begründet sein. Dieser Übergangszustand ist aufgrund des tertiären Carbokations bzw. Carbonylradikals ebenfalls stabilisiert. Es könnte ebenfalls zur Bildung der Hydroperoxide und anschließender Reduktion zum entsprechenden Alkohol kommen. Hydroperoxide wurden in den Transformationsansätzen jedoch nicht identifiziert. Es ist aber möglich, dass die Bildung der Alkohole in dieser Transformation in einem Schritt abläuft, und die Hydroperoxide aufgrund ihrer Instabilität unmittelbar zu den Endprodukten z.B. durch Hydroperoxidspaltung weiterreagieren.

Interessanterweise wurden keine Hydroxylierungsprodukte an den Positionen C5, C1 und C3 identifiziert. Auch wurden sowohl im chemischen Blindwert als auch in den Transformationsansätzen keine korrespondierenden Hydroperoxide detektiert. Durch Photooxidation von α -Farnesen mit Rose Bengal als Photosensibilisator ergaben sich diese drei allylischen „Alkohole“ mit konjugiertem Diensystem (Spicer et al., 1993). Unter Säurekatalyse konnten die Alkohole in C1, C3 und C5 synthetisiert und identifiziert werden, die innerhalb von sechs Stunden bei 20 °C in THF zum (3-(*Z*)/(*E*))-7-Hydroxyfarnesen reagierten (Fielder et al., 1998). Das ursprüngliche (*E/Z*)-Verhältnis änderte sich bei dieser Umlagerungsreaktion dabei nicht, was zeigt, dass bei dieser Reaktion durch *Aspergillus niger* keine neue Orientierung der Doppelbindungen auftrat. Ein delokalisierte carbokationische Übergangszustand, der hier postuliert wird führt in der Regel immer zu einer Änderung des *E/Z*-Verhältnisses. Hierdurch erklärt sich auch, dass keine cyclischen Produkte während der Autoxidation auftraten, da diese eine Isomerisierung der 6,7-(*E*)-Doppelbindung des α -Farnesens erfordern. Diese Isomerisierung wird offensichtlich durch Enzyme aus *A. niger* katalysiert. Eine ähnliche enzymatische Isomerisierung ist für die Reak-

tion von Geranylpyrophosphat zu cyclischen Terpenen beschrieben worden (Porter et al., 1981; Goodwin, 1974).

Das Enantiomerenverhältnis des *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ols ist im Falle der Biotransformation durch *A. niger* nicht zu einem Enantiomer hin verschoben. Alle untersuchten Alkohole waren racemische Gemische. Ähnliche unspezifische Biotransformationen zeigte *Pleurotus sapidus*, der enantiomerenreines (*R*)-(+)-Limonen zu den beiden möglichen Carvonen über die vier Carveol-Stereoisomere transformiert (Kaspera et al., 2005).

Bei der Biotransformation von β -Farnesen wurden keine nicht auch im Blindwert detektierbaren Transformationsprodukte identifiziert. Vermutlich ist hier eine Bildung der Transformationsprodukte aufgrund der nicht vorhandenen diallylischen Position in C5 und der damit fehlenden Stabilisierung des Carbokations über 7-C-Atome nicht möglich.

Die Oxidation von Farnesen wurde bislang intensiv im Zusammenhang mit der Lagerung von Früchten, insbesondere von Äpfeln erforscht. Farnesen als natürlicher Bestandteil von Apfelschalen kann durch Kontakt mit Luftsauerstoff leicht oxidiert werden. 7-(*E*)-Hydroxyfarnesen ist hier ein Hauptprodukt der Autoxidation und wird für Bräunung der Schale sowie im weiteren Verlauf für die Lyse der äußeren hyperdermalen Zellen verantwortlich gemacht, was zur Schwarzfärbung der Schale führt. Diese Reaktion findet schon bei niedrigen Temperaturen statt und läuft anschließend bei Raumtemperatur wesentlich schneller ab. Die Bildung von 6-Methyl-5-hepten-2-on als Spaltprodukt des Farnesen-7-hydroperoxides wurde bereits postuliert (Anet, 1972). Aktuellere Studien zeigen aber auch eine mögliche Bildung dieses geruchlich interessanten Ketons durch die Autoxidation des 7-(*E*)-Hydroxyfarnesens und anderer konjugierter Trienole (CT) nach wenigen Stunden (Whitaker et al., 2000). Die Bildung konnte durch den Einsatz von Radikalfängern wie BHT und DPA um mehr als 97% reduziert werden. 6-Methyl-5-hepten-2-on soll ebenfalls eine Rolle bei der Schädigung der Apfelschalen spielen (Rudell et al., 2005). Das Keton wurde in den Transformationsansätzen dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen. Dieser Abbau könnte neben der weiteren Oxyfunktionalisierung der monohydroxylierten Verbindungen ein weiterer Grund für geringeren Konzentrationen der Transformationsprodukte nach 48 bzw. 72 Stunden sein.

3.3.3 *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol - ein neuer Naturstoff

Der Ascomyzet *A. niger* generierte als einziger der eingesetzten Organismen *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol.

Eine strukturell ähnliche Verbindung wurde aus dem Holz von *Humbertia madagascariensis* Lamark., dem einzigen auf Madagaskar heimischer Vertreter (so genanntes monotypisches Taxon) aus der zu den Windengewächsen gehörenden Unterfamilie der *Humbertioideae* isoliert. Ein etherischer Extrakt zeigte nach Entfernung des Lignins und Destillation eine hydroxylierte Verbindung sowie zwei Dehydrierungsprodukte eines Sesquiterpens.

Aufgrund des Familiennamens wurde die Verbindung als „Humbertiol“ bezeichnet und mit C₁₅H₂₆O als Summenformel angegeben (Raulais et al., 1962). Spätere Untersuchungen zur genauen Struktur ergaben dann *p*-Mentha-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol, die der neuen Verbindung bis auf die fehlende Doppelbindung im Ring und die stereochemische Orientierung der 7,8-Doppelbindung gleicht (Raulais, 1963 und Raulais et al., 1964) (**Abb. 3-11**).

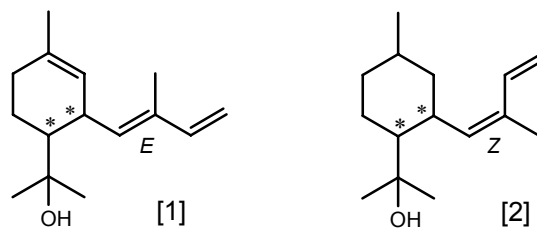


Abb. 3-11 Struktur von *p*-Menth-1-en-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol [1] im Vergleich zu *p*-Mentha-3-[2-methyl-1,3-butadienyl]-8-ol („Humbertiol“) [2]

Eine gleichermaßen strukturverwandte Verbindung, die aus einem substituierten α -Terpineolgerüst besteht, wurde aus der gelben Passionsfrucht (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Maracuja) mittels Vakuum-Headspace isoliert. Hierbei handelt es sich um zwei (*E*)-Enantiomere (P1, P2) des *p*-Menth-1-en-3-[1-propenyl]-8-ols (Werkhoff et al., 1998) (**Abb. 3-12**).

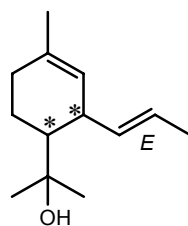


Abb. 3-12 Struktur des 3-[(*E*)-1-Propenyl]- α -terpineols (P1, P2)

Hierbei wurde angenommen, dass sich diese Verbindung vom Pseudoionon ableitet, indem nach enzymatischer Reduktion und darauf folgendem Ringschluss über ein intermediäres Carbokation anschließend Wasser addiert wird (**Abb. 3-13**).

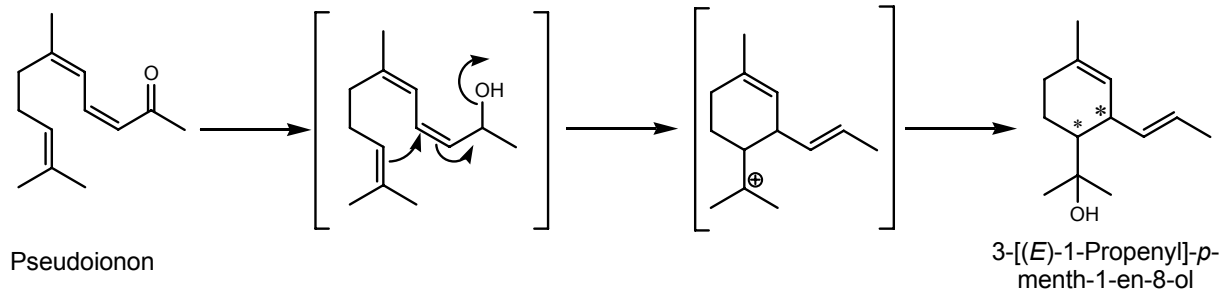


Abb. 3-13 Postulierte Bildung des 3-[(*E*)-1-Propenyl]- α -terpineols ausgehend von Pseudoionon (nach Werkhoff et al., 1998)

3.4 Spaltung von Carotinoiden durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*

In einem umfangreichen Screening wurden mehrere Basidiomyceten auf die Fähigkeit zum β,β -Carotinabbau getestet. *Marasmius scorodonius* zeigte dabei eine effektive Spaltung des eingesetzten Substrates (Langhoff, 2002; Zorn et al., 2003a). Verantwortlich hierfür sind zwei Peroxidasen, deren Isolierung und Charakterisierung bereits durchgeführt wurde (Scheibner, 2006; Hülsdau, 2007). Die Umsetzung mit anderen Carotinoiden sollte die Substratspezifität der Peroxidasen untersuchen sowie die Bildung aromaaktiver Verbindungen und deren Vorstufen zeigen.

3.4.1 Auswahl der zur Spaltung eingesetzten Substrate

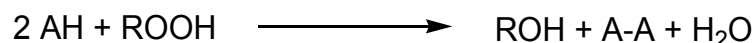
Carotinoide gehören zur Gruppe der Tetraterpene und sind ubiquitär verbreitet. Bis heute sind über 600 verschiedene natürlich vorkommende Verbindungen bekannt. Carotinoide kommen vor allem in Plastiden von Blättern vor, sind aber auch in Bakterien, Algen und in Pilzen zu finden. Daneben spielen sie eine wichtige Rolle als Aromastoff-Vorstufen. Für die Untersuchungen wurden daher unterschiedliche Carotinoide (**Abb. 2-30**) ausgewählt, um die Spaltung einer möglichst großen Bandbreite darzustellen. Aus β,β -Carotin mit zwei Cyclohexenylringen sind β -Ionon, Dihydroactinidiolid und β -Cyclocitral als Aromastoffe direkt zugänglich. Die Spaltung des acyclischen Lycopins liefert die aromaaktiven Spaltprodukte Pseudoionon, 6-Methyl-5-hepten-2-on und Geranial (Lewinsohn et al., 2005). Lutein und Zeaxanthin sind als Isomere in C3 bzw. in C3'-Position hydroxyliert und liefern 3-Hydroxy- β -ionon, bzw. 3-Hydroxy- α -ionon, sowie 3-Hydroxy- β -cyclocitral, die alle Vorstufen für weitere Aromastoffe, wie z.B. im Fall des 3-Hydroxy- β -cyclocitrals für Safranal darstellen (Kanakakis et al., 2004). Violaxanthin weist neben dieser Hydroxylierung zusätzlich noch eine Epoxidierung in Position C5, C6 bzw. C5', C6' auf. Die Spaltung führt zum 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid, das ebenfalls eine Aromavorstufe, zum Beispiel im Tabak darstellt (Wahlberg et al., 2002). Neoxanthin weist ein kumuliertes Doppelbindungssystem in Position C7, C8 auf. Die Spaltung führt zum Grashüpfer-Keton das als Vorstufe zur chemosynthetischen Herstellung von Damascenon dienen kann (Bezman et al., 2005).

Die eingesetzten Apocarotinale stellen primäre Produkte des β,β -Carotin-Abbaus dar. Sie weisen nur noch einen Cyclohexenylring auf. Die Spaltung führt zu den gleichen Aromastoffen wie die β,β -Carotinspaltung. Die enzymatische Umsetzung der Apocarotinale sollte zudem zeigen, dass Spaltprodukte des β,β -Carotinabbaus weiter metabolisiert werden können.

3.4.2 Aufgaben und Funktion von Peroxidasen in höheren Pilzen

Peroxidasen (E.C.1.11.1) gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen. Sie sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. Einige sind nach ihrem Vorkommen, wie z.B. die Meerrettichperoxidase, oder nach ihrem Substrat, wie die Ligninperoxidase benannt. Die meisten Peroxidasen sind Häm-Enzyme mit einem Eisenprotoporphyrinring als prosthetische Gruppe. Daneben sind Peroxidasen mit anderen nicht eisenhaltigen aktiven Zentren, wie z.B. Manganperoxidasen, Gluthathionperoxidasen, die Selen enthalten, und Flavinperoxidasen bekannt.

Peroxidasen oxidieren mit Wasserstoffperoxid oder auch Alkylhydroperoxiden (ROOH) eine ganze Reihe von Substraten (AH) nach folgendem Reaktionsprinzip (Adam et al., 1999):



Die typische Hämperoxidase-Reaktion besteht aus einem Redoxprozess mit drei charakteristischen Reaktionsschritten. Zunächst kommt es zu einer Addition von H_2O_2 an das Fe(III) durch Übertragung von zwei Elektronen und der Bildung eines Eisen-Oxo-Derivates, das aus einem Fe(IV)=O und einem π -Radikalkation besteht (Verbindung I). Das Substrat AH wird nun durch die Übertragung eines Elektrons oxidiert und Verbindung I zum Fe(IV)=O (Verbindung II) reduziert, wobei eine Regeneration des Fe(III) -Komplexes stattfindet (Stiborová et al., 2000). Der Mechanismus ist in (**Abb. 3-14**) zusammengefasst.

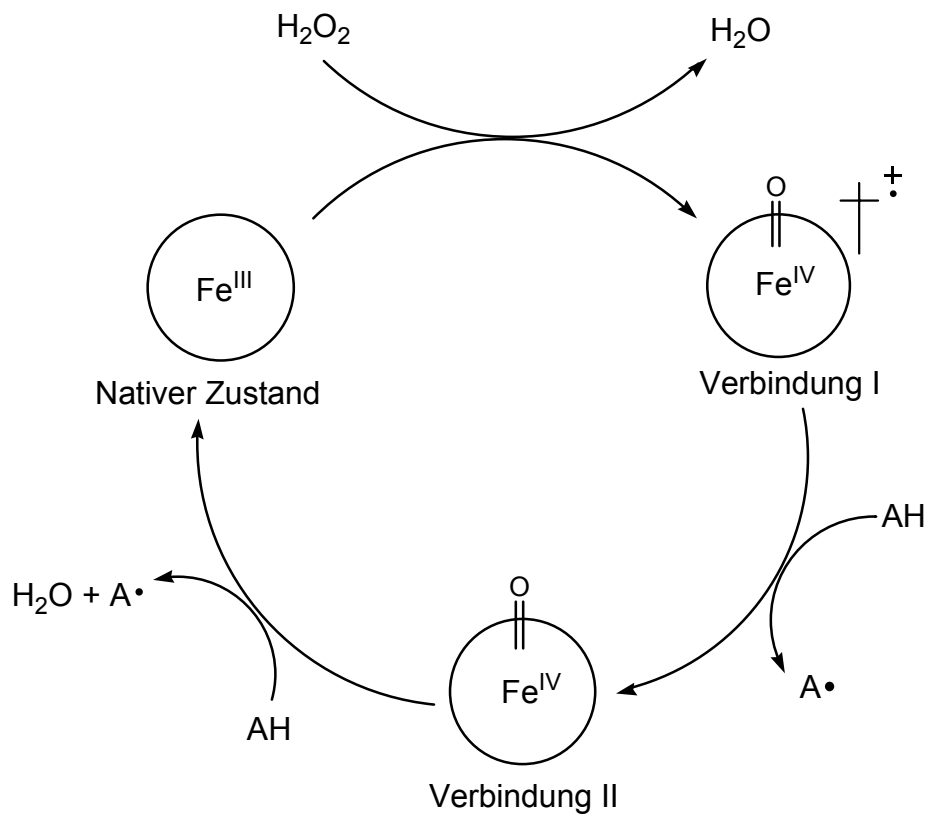


Abb. 3-14 Reaktionsmechanismus von Peroxidasen (AH= reduziertes Substrat); (Adam et al., 1999 mod.)

Bei den Peroxidasen aus Basidiomyceten spielen zwei Enzymsysteme eine wichtige Rolle. Ligninperoxidasen (LIP) katalysieren als Exoenzyme von Weißfäulepilzen in Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation von aromatischen nicht-phenolischen Verbindungen durch Ein-Elektron-Oxidation und generieren Aryl-Radikalkationen (Conesa et al., 2002). So wird die Oxidation von Benzylalkoholen, die Spaltung von C-C und C-O-Bindungen, und die Öffnung von aromatischen Ringsystemen katalysiert (Gold and Alic, 1993).

Manganperoxidasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle beim Abbau von Lignin. Dabei werden Mn²⁺-Ionen zu Mn³⁺-Ionen oxidiert und als Chelat-Komplex mit organischen Säuren wie Oxalsäure und Malonsäure, die ebenfalls von Pilzen ausgeschieden werden, stabilisiert (Glenn et al., 1986). Mangan (III) kann als starkes Oxidationsmittel phenolische Gruppen des Lignins zu Phenoxyradikalen oxidieren und somit den Abbau des Lignins einleiten.

Der Abbau von Carotinoiden durch Peroxidasen aus Pilzen wurde erstmals durch *Pleurotus eryngii* gezeigt (Langhoff, 2002). Hierbei handelt es sich um eine polyvalente Peroxidase (VP), die in ihren katalytischen Eigenschaften zwischen einer Ligninperoxidase und Manganperoxidase einzustufen ist.

Diese Peroxidase kann phenolische Verbindungen zum einen direkt, wie Ligninperoxidasen, oder auch über die Oxidation von Mn (II) zu Mn (III), wie Manganperoxidasen oxidieren (Ruiz-Duenas et al., 1999). Die Spaltung von Carotinoiden erfolgte in diesem Fall ohne den Zusatz von Wasserstoffperoxid (Zorn et al. 2003a).

Die Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* zeigen Homologien mit einer entfärbenden („Dye-decolorizing“) Peroxidase (DyP) aus dem Basidiomycet *Thanatephorus cucumeris*. Diese Peroxidase besitzt keine Homologie zu den bekannten Ligninperoxidasen bzw. Manganperoxidasen, aber ligninolytische Eigenschaften und kann synthetische Farbstoffe nach Zugabe von H₂O₂ entfärben (Kim und Shoda, 1999; Sato et al., 2004). Eine Homologie besteht ebenfalls zu einer H₂O₂-abhängigen Polyphenoloxidase aus *Termitomyces albuminosus* (Johjima et al., 2003).

3.4.3 Selektiv carotinoidspaltende Enzyme

Die Spaltung von Carotinoiden kann durch Co-Oxidation, Photooxidation und thermische Degradation erfolgen. Hierbei entstehen in der Regel viele unspezifische Spaltprodukte in geringer Ausbeute. Für selektive Carotinoid-spaltungen werden spezifische Enzyme benötigt. Die Spaltung kann zentral (C15, C15') oder dezentral, bevorzugt in Position 7,8 (7',8') und 9,10 (9',10') erfolgen.

3.4.3.1 Selektiv carotinoidspaltende Monooxygenasen

Eine Spaltung von β,β -Carotin durch eine β -Carotin-15-15'-Monooxygenase (EC 1.14.99.36) aus der Darmschleimhaut von Hühnern führte zur selektiven Bildung von zwei Äquivalenten des C₂₀-Apocarotinals Retinal (Leuenberger et al., 2001). Retinal wirkt als prosthetische Gruppe des Rhodopsins, dem Sehpigment der Stäbchen, und spielt eine wichtige Rolle beim Sehvorgang.

Zunächst findet eine Epoxidierung der zentralen Doppelbindung durch Luftsauerstoff statt. Anschließend kommt es über eine nichtselektive Ringöffnung durch Wasser zur Bildung eines Diols und anschließender Spaltung zu den Retinalen. Durch Isotopenmarkierung des Sauerstoffs und des Wassers wurde gezeigt, dass es sich nicht um eine zuvor postulierte Dioxygenase handelt, da jeweils ein Sauerstoffmolekül aus dem Wasser und aus dem Luftsauerstoff eingebaut wurde. Eine Dioxygenase hätte nur den Luftsauerstoff eingebaut (**Abb. 3-15**).

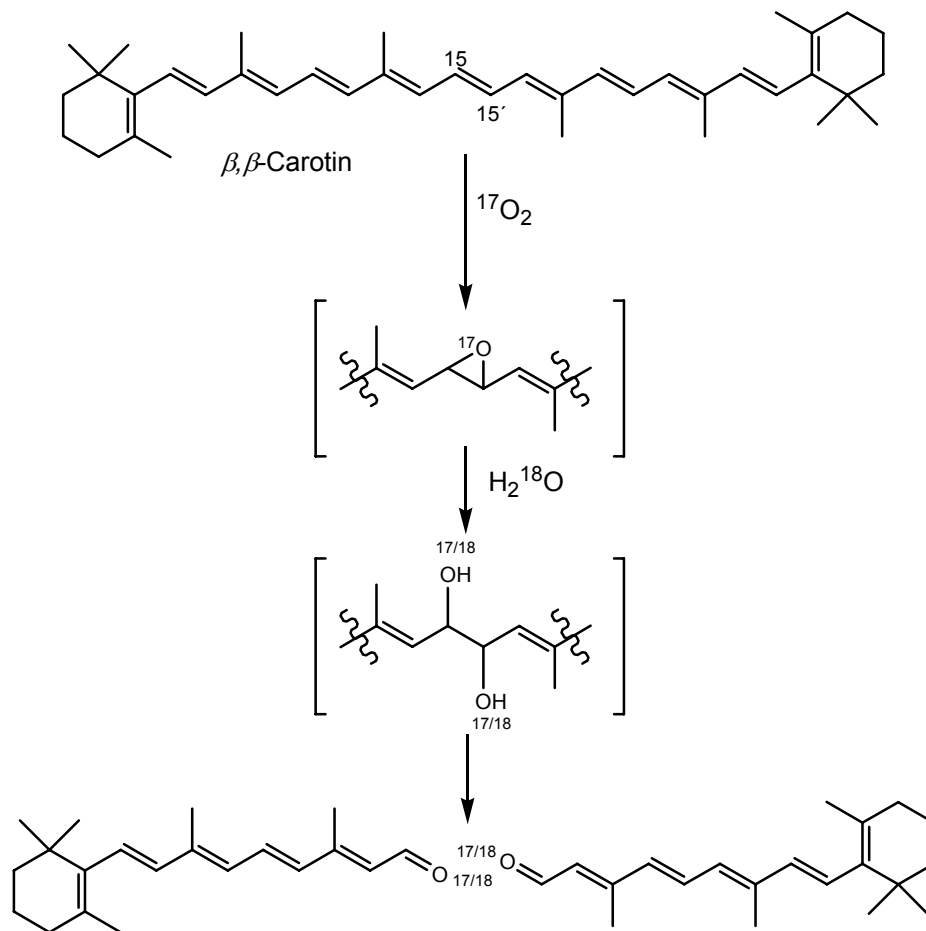


Abb. 3-15 Postulierter Reaktionsmechanismus der zentralen Spaltung von β,β -Carotin durch die β -Carotin-15,15'-Monoxygenase (nach Leuenberger et al., 2001)

Das Enzym zeigt eine hohe Substratspezifität für β,β -Carotin. Für die Spaltung war zumindest ein β -Ionon-Ring notwendig. Hieraus ergab sich jeweils ein Molekül Retinal. Cryptoxanthin und 3-Oxochinenon wurden ebenso gespalten wie α -Carotin, dies jedoch nicht vollständig. Zeaxanthin war jedoch kein Substrat und wurde nicht gespalten. Auch die 15-(Z)-Form führte im Gegensatz zur *all*-(E)-Form nicht zur Bildung von Retinal. Ebenso wurde das Fehlen der Doppelbindung in Position C15 oder das Vorhandensein einer Dreifachbindung nicht toleriert. Nicht vorhandene Methylgruppen in Position C13 bzw. C13' führten ebenfalls zu einem starken Verlust an Enzymaktivität (Wirtz et al., 2001).

Eine humane rekombinante β -Carotin-15-15'-Monoxygenase spaltet ebenso β,β -Carotin und Cryptoxanthin, während Zeaxanthin und Lycopin nicht gespalten werden (Lindqvist et al., 2002).

3.4.3.2 Selektiv carotinoidspaltende Dioxygenasen

Dioxygenasen spalten Carotinoide selektiv an unterschiedlichen Positionen des Polyengerüsts. Eine ganze Reihe von pflanzlichen Enzymen sind mittlerweile isoliert und charakterisiert worden.

Die Spaltung von Carotinoiden in Position 7,8 (7',8') führt zur Bildung von zwei C₁₀-Aldehyden und einem C₂₀-Dialdehyd. Eine Zeaxanthin-spaltende Dioxygenase (CsZCD) ist aus Safran (*Crocus sativus*) isoliert worden. Die selektive Spaltung führt zur Bildung von Crocetin-Dialdehyd (C₂₀) und 2 Molekülen 3-Hydroxy- β -Cyclocitral (C₁₀). Crocetin-Dialdehyd wird durch eine Aldehyd-oxidoreduktase zum Crocetin oxidiert und anschließend mit Mono- oder Disacchariden zum Crocin verestert (Bouvier et al., 2003a) (**Abb. 3-16**).

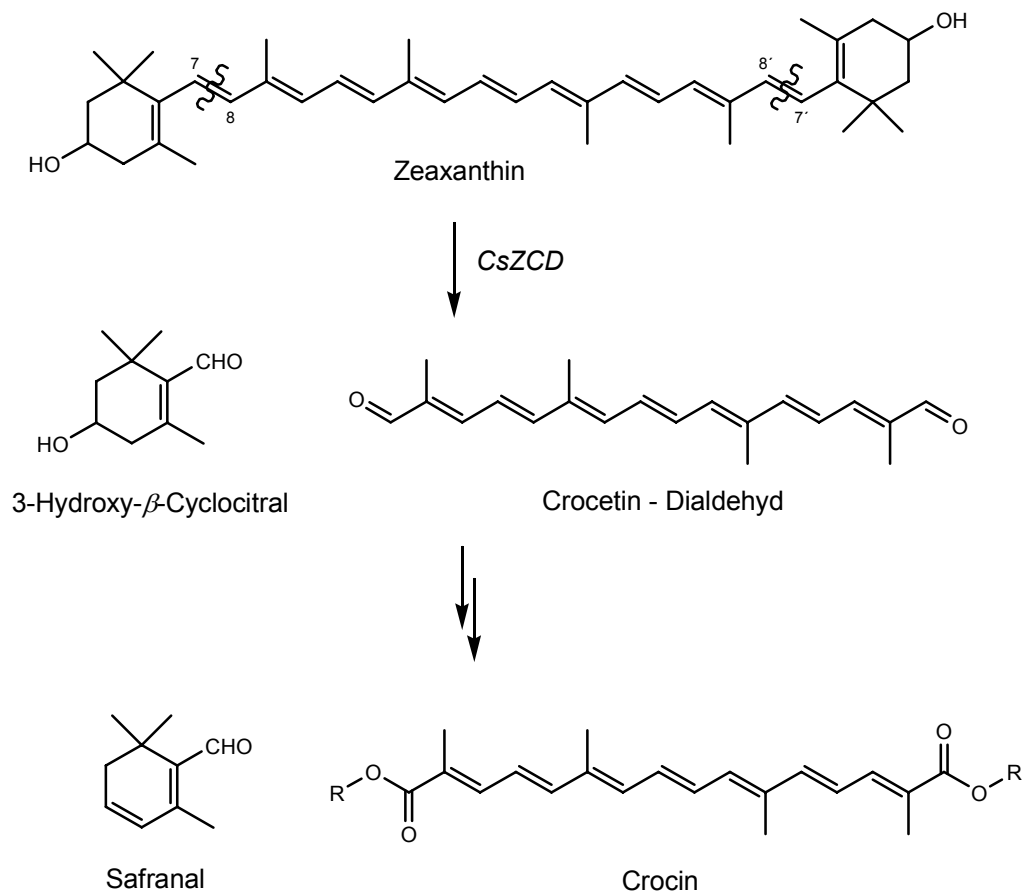


Abb. 3-16 Selektive Spaltung von Zeaxanthin durch CsZCD aus Safran

Auch eine isolierte potentielle Dioxygenase aus dem Cyanobakterium *Microcystis* war zur selektiven Spaltung der 7,8 und 7',8' - Bindung in der Lage. Hier wurden β,β -Carotin und Zeaxanthin zu Crocetin-Dialdehyd und β -Cyclocitral bzw. 3-Hydroxy- β -Cyclocitral gespalten, während andere Verbindungen, wie Myxoxanthophyll oder

Echinenon, die nur ein β -Ionon-Gerüst enthalten, nicht gespalten wurden (Jüttner und Höflacher, 1985).

Eine aus Mais isolierte Dioxygenase katalysierte die oxidative Spaltung von 9-(Z)-Violaxanthin und 9-(Z)-Neoxanthin in Position 11,12 zu Xanthoxin (C_{15}) und dem entsprechenden C_{25} -Apocarotinal (Schwartz et al., 1997; Tan et al., 1997). Xanthoxin wird sukzessive zu Abscisinsäure weiteroxidiert, die als Wachstumsregulator in Pflanzen eine wichtige biologische Funktion hat. Die spezifische Spaltung führte zu dem Namen 9-(Z)-Epoxy-Carotenoid-Dioxygenase (*NCED*), da die entsprechenden *all-E*-Isomere nicht gespalten wurden. Eine Epoxyfunktion scheint aber nicht unbedingt erforderlich zu sein, da auch 9-(Z)-Zeaxanthin gespalten wurde (Schwartz et al., 2003) (**Abb. 3-17**).

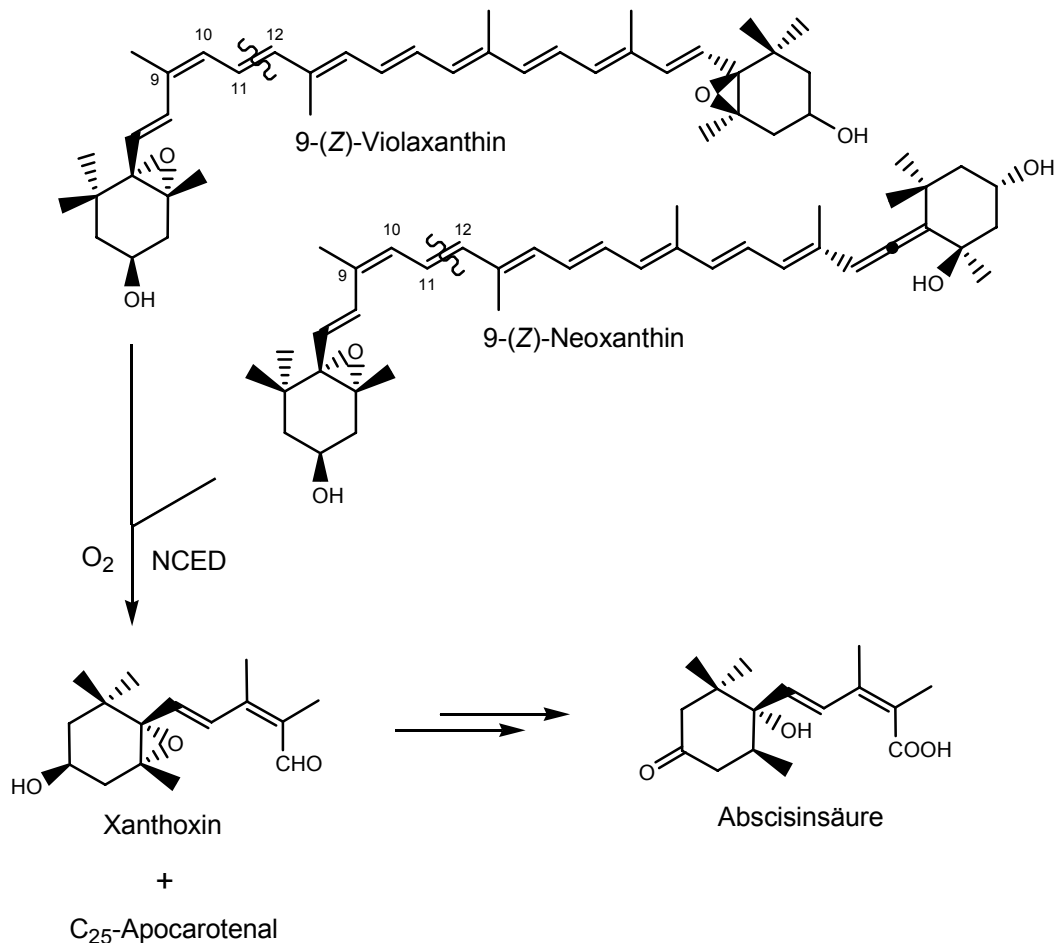


Abb. 3-17 Selektive Spaltung von 9 (Z)-Violaxanthin und Neoxanthin durch *NCED*

Mittlerweile sind eine ganze Reihe von 9-(Z)-Epoxy-Carotenoid-Dioxygenasen in Pflanzen identifiziert worden. Sie wurden u.a. in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), der Tomate (*Lycopersum esculentum*) und Avocado (*Persea*

americana Mill. cv. Lula) identifiziert (Tan et al., 2003 und Joseph et al., 2001; Burbidge et al., 1999; Chernys und Zeevaart, 2000).

Die selektive Spaltung der 9,10 (9',10')-Doppelbindung führt zur Bildung von C₁₃-Norisoprenoiden und einem Molekül C₁₄-Dialdehyd. Die physiologische Wirkung dieser Apocarotinale ist noch nicht bekannt, jedoch sind die Spaltprodukte direkte Aromastoffe oder deren Vorstufen (Winterhalter und Rouseff, 2002).

Die erste hierfür verantwortliche β,β -Carotin-9,10-Dioxygenase wurde aus der Maus kloniert und sie katalysierte die oxidative Spaltung von β,β -Carotin zu β -Ionon und dem komplementären C₂₇-Fragment β -Apo-10'-carotinal. Daneben wurde auch Lycopin gespalten (Kiefer et al., 2001).

Ein rekombinantes Protein (*AtCCD7*) aus *Arabidopsis thaliana* katalysiert die Reaktion zu den gleichen Produkten. Andere Carotinoide wie Lycopin, Lutein oder Violaxanthin wurden nicht umgesetzt (Schwartz et al., 2004). Ein weiteres carotinoid-spaltendes Enzym (*AtCCD1*) konnte, in *E. coli* exprimiert, dagegen diese Carotinoide sowie Lutein und Neoxanthin, selektiv zu zwei C₁₃-Norisoprenoiden und dem C₁₄-Dialdehyd spalten. Dabei wurde bei der Umsetzung mit Neoxanthin sowohl das C₂₇-Epoxyapocarotinal, als auch das C₂₇-Spaltprodukt mit der kumulierten Doppelbindung identifiziert (Schwartz et al., 2001). Aktuelle Studien zeigen, dass β -Apo-8'-carotinal ein noch besseres Substrat für *AtCCD1* ist, was sich in 12-16 - fach höheren molaren Ausbeuten an β -Ionon im Gegensatz zu β,β -Carotin widerspiegelt (Schmidt et al., 2006).

Ähnliche Enzyme wurden auch aus Crocus (*Crocus sativus*), Petunie (*Petunia hybrida*), Tomate (*Lycopersum esculentum*) und aus der Weintraube (*Vitis vinifera*) isoliert (Bouvier et al., 2003a; Simkin et al., 2004a und b; Mathieu et al., 2005).

Aus dem Annattostrauch (*Bixa orellana*) wurde eine Lycopin-spaltende 5,6(5',6')-Dioxygenase isoliert, die, in *E. coli* exprimiert, Lycopin zu zwei Molekülen 6-Methyl-5-hepten-2-on und Bixin-Aldehyd spaltete (Bouvier et al., 2003b). Bixin-Aldehyd ist eine Vorstufe zur Synthese von Norbixin und Bixin, 6-Methyl-5-hepten-2-on ist eine wichtige Komponente des Tomatenaromas (Buttery et al., 1990) (**Abb. 3-18**).

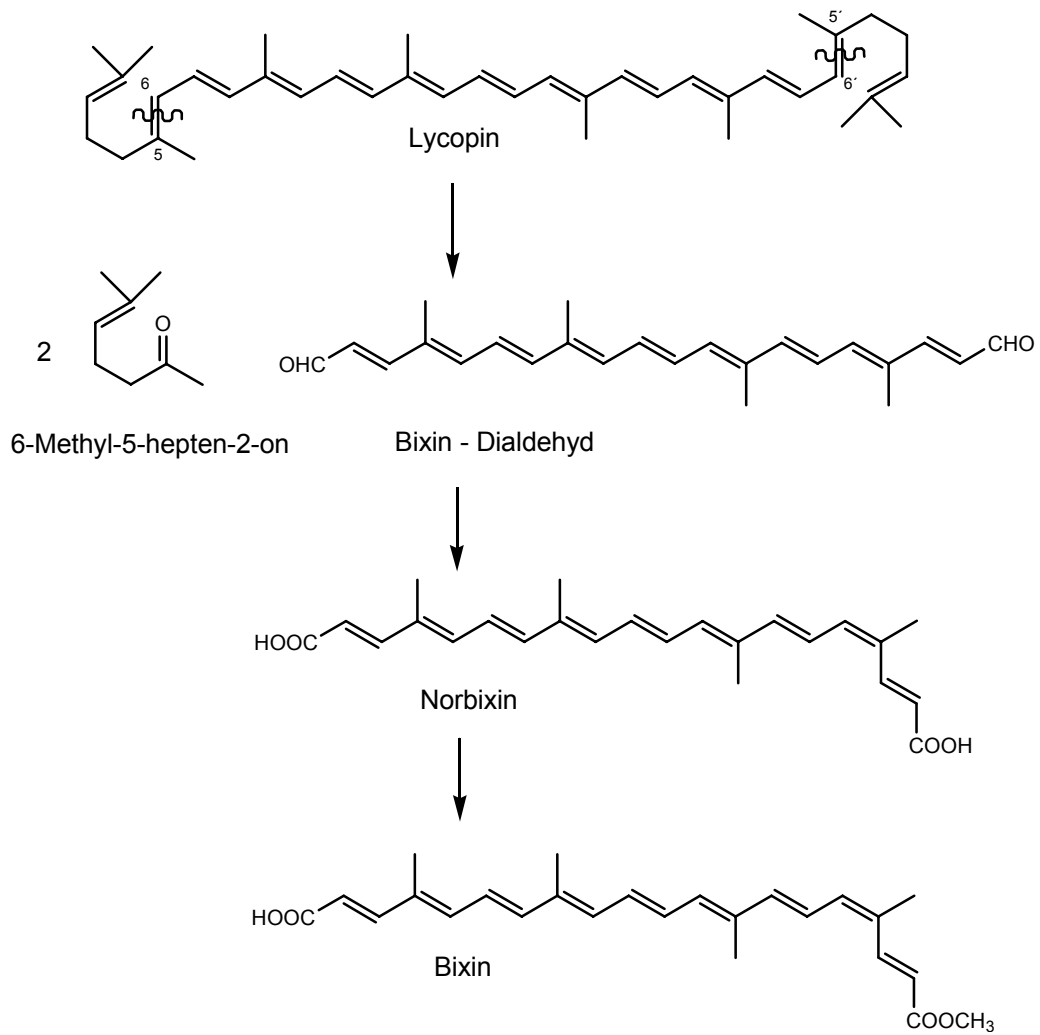


Abb. 3-18 Selektive Spaltung von Lycopin durch die Lycopin-5,6(5',6')-Dioxygenase aus *Bixa orellana* zum Bixin-Dialdehyd als Vorstufe von Bixin

3.4.3.2 Apocarotinoid-spaltende Enzyme

Mittlerweile sind auch Enzyme bekannt, die nicht nur Tetraterpene spalten, sondern auch deren primären Abbauprodukte, die Apocarotinale, weiter abbauen. Ein Enzym (*AtCCD8*) aus *Arabidopsis thaliana* zeigte nach Coexpression mit dem β,β -Carotin spaltenden Enzym *AtCCD7* in *E. coli* keine Bildung des C_{27} -Spaltproduktes. Das Enzym spaltete in Position C 13,14 und bildete β -Apo-13-Carotinon sowie ein C_9 -Dialdehyd (Schwartz et al., 2004) (**Abb. 3-19**).

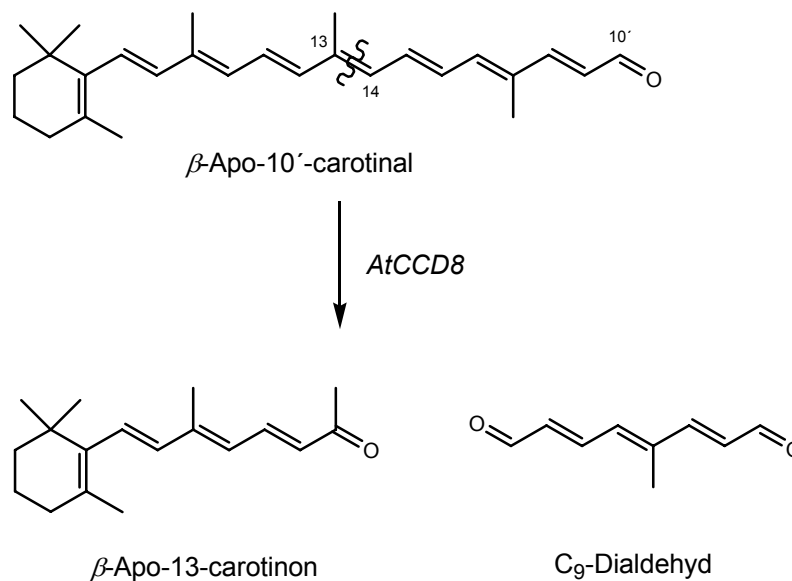


Abb. 3-19 Spaltung von β -Apo-10'-carotinal durch *AtCCD8*

Eine carotinoidspaltende Oxygenase (*Diox1*) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 war zur Spaltung unterschiedlicher Apocarotinale in der Lage, β,β -Carotin wurde dagegen nicht gespalten. Das C_{30} -Apocarotinal β -Apo-8'-carotinal wurde zu Retinal und 2,6-Dimethyl-octa-2,4,6-trien-dial umgesetzt. Auch andere Verbindungen, wie Apo-8'-lycopenal, (3*R*)-Hydroxy- β -Apo-8'-carotinal, β -Apo-8'-Carotinol und 4-Oxo- β -Apo-8'-carotinol wurden gespalten. Die oxidative Spaltung fand spezifisch in Position 15,15' des Polyengerüsts statt, was zur Bildung eines C_{20} -Aldehyds und des entsprechenden Dialdehyds führte. Die Dioxygenase spaltete alle Apocarotinale mit unterschiedlicher Kettenlänge wie β -Apo-4'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal und auch die korrespondierenden Alkohole. Bevorzugt waren langkettige Verbindungen wie das β -Apo-8'-carotinal und β -Apo-10'-carotinal. Es wurden nur all-(*E*)-Verbindungen, nicht jedoch die entsprechenden (*Z*)-Isomere konvertiert (Ruch et al., 2005).

3.4.3.3 Carotinoidspaltung durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*

Alle zur Spaltung eingesetzten Carotinoide und Apocarotinoide wurden von den Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* effektiv abgebaut. β,β -Carotin wurde dabei nach 180 min zu 90% degradiert. Um auch Zwischenprodukte des enzymatischen Abbaus zu identifizieren, wurde der Abbau nach 60 min gestoppt (2.3.4).

Die Spaltung führte zur Bildung von C₁₃-Norisoprenoiden wie β -Ionon, β -Ionon-5,6-epoxid, 3-Hydroxy- β -ionon, 3-Hydroxy- α -ionon und 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid.

Mit Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral und 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon aus der Spaltung von β,β -Carotin waren direkt aromaaktive Verbindungen zugänglich. Aus der Spaltung des Lycopins wurden 6-Methyl-5-hepten-2-on und Geranial identifiziert. Pseudoionon als C₁₃-Norisoprenoid aus der Spaltung der C₉-C₁₀-Bindung konnte nicht detektiert werden. Das Grashüpferketon, das aus der symmetrischen Spaltung des Neoxanthins als zweites Produkt der oxidativen Spaltung in Position 9,10 entstehen sollte, wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Aus dem Abbau der Apocarotinale β -Apo-8'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal wurden die gleichen flüchtigen Spaltprodukte, die bereits aus dem β,β -Carotin-Abbau bekannt waren, identifiziert, was den weiteren Abbau primärer Spaltprodukte belegt.

Neben den flüchtigen Verbindungen wurden auch nichtflüchtige Apocarotinale sowie Monoepoxide des β,β -Carotins identifiziert. Als Hauptprodukte waren hier β -Apo-10'-carotinal, β -Apo-12'-carotinal und β -Apo-14'-carotinal sowie β -Carotin-5,6-epoxid sowie ein postuliertes β -Carotin-5,8-epoxid nachzuweisen. Der Abbau von Lutein, Zeaxanthin, Neoxanthin und Violaxanthin ergab Spaltprodukte in Position 10', 12' und 14', also hydroxylierte bzw. hydroxylierte und epoxidierte Verbindungen analog zu denen des β,β -Carotinabbaus.

Als Abbauprodukte der Apocarotinale wurden neben den in 5,6-Position epoxidierten Verbindungen im Falle des β -Apo-8'-carotinals auch der C17- und C20-Dialdehyd identifiziert.

Im Gegensatz zu den hochspezifischen Mono- und Dioxygenasen sind die Peroxidasen in Bezug auf das Substrat und die jeweilige Spaltung relativ unspezifisch. Alle eingesetzten Substrate wurden akzeptiert und eine Reihe unterschiedlicher flüchtiger und nicht-flüchtiger Abbauprodukte identifiziert.

Für die oxidative Spaltung durch *Marasmius scorodonius* ist mit den Peroxidasen eine völlig andere Art von Enzym mit einer geringen Substratspezifität verantwortlich. Die extrazellulären Peroxidasen sollen in erster Linie komplexe Moleküle spalten und Kohlenstoffbausteine zur Energiegewinnung des Pilzes liefern.

Das Produktspektrum ist dem der Autoxidation ähnlich. Parallel mitgeführte Kontrollwerte mit desaktivierter Enzymlösung zeigten jedoch deutlich geringere Gehalte an Spaltprodukten.

Die nichtselektive Oxidation von β,β -Carotin führt zu einer Vielzahl an Spaltprodukten. Interessant ist hierbei die Entwicklung des Produktspektrums. Zunächst finden sich epoxidierte Verbindungen, wie β -Carotin-5,6-epoxid, β -Carotin-5,8-epoxid und die entsprechenden Diepoxide. Zudem finden sich u.a. β -Ionon, β -Apo-14'-carotinal, β -Apo-12'-carotinal und Dihydroactinidiolid. Die epoxidierten Verbindungen, sowie die längerkettigen Apocarotinale wurden jedoch bei längerer Reaktionszeit weiter abgebaut (Mordi et al., 1993). Ähnliche Ergebnisse lieferte auch ein auf einem Ruthenium-Tetramesitylporphyrin-Katalysator basierendes Enzymmodell. Hier wurden sämtliche aus der β,β -Carotinspaltung zugänglichen Apocarotinale sowie teilweise 5,6 bzw. 5,8 - epoxidierte Spaltprodukte identifiziert. Zudem wurden einige Apocarotindiale identifiziert (Caris-Veyrat et al., 2001 und 2003).

Ein möglicher Reaktionsweg zur Bildung von β -Ionon, β -Ionon-5,6-epoxid und Dihydroactinidiolid aus β,β -Carotin wurde mit einem System aus Xanthin-Oxidase und Acetaldehyd beschrieben. Hier wird von einem radikal-induzierten Weg über die Bildung eines Carotinylnradikals ausgegangen (Bossler et al., 1995).

Durch Abstraktion eines H-Atoms der Methylgruppe in allylischer Position kommt es zur Bildung eines resonanzstabilisierten Radikals. Durch Reaktion mit Sauerstoff bildet sich ein Hydroperoxid und nach anschließender Hock-Spaltung entstehen zwei Apocarotinale (Zorn et al., 2003a) (**Abb. 3-20**).

Theoretisch ist diese Reaktion an 9,10 - und 9',10' - Position möglich, und so die Bildung von zwei Molekülen β -Ionon vorstellbar. Eine Weiteroxidation des primären C_{27} - Aldehyds ist somit denkbar, wie die eigenen Ergebnisse der Spaltung der C_{30} - und C_{25} - Apocarotinale belegen.

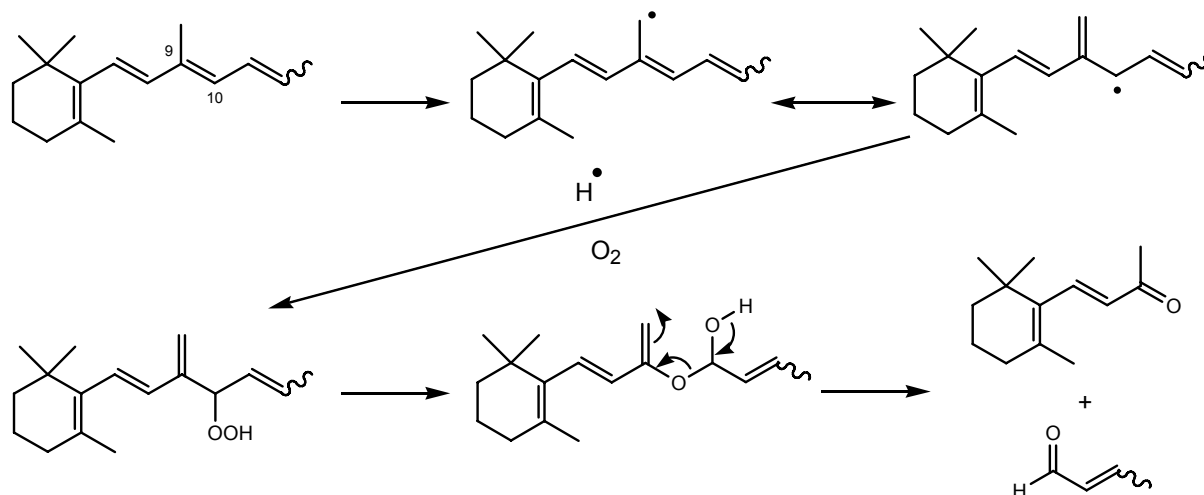


Abb. 3-20 Möglicher Bildungsweg von β -Ionon aus der oxidativen Spaltung von β,β -Carotin (Zorn et al., 2003a)

Die Bildung von β -Ionon-5,6-epoxid ist direkt aus der Spaltung des β -Carotin-5,6-epoxids oder durch Epoxidierung des β -Ionons vorstellbar. Die Verbindung kann dann als Vorstufe für Dihydroactinidiolid dienen, das aber auch aus der Spaltung des β -Carotin-5,8-epoxids direkt entstehen kann (Bossler et al., 1995). Für einen radikalischen Mechanismus spricht die Bildung eines das racemischen Gemischs von Dihydroactinidiolid.

Theoretisch wäre auch ein co-oxidativer Mechanismus denkbar. Bei der Verwendung von Tween 80, wird Ölsäure hydrolytisch freigesetzt. Bei der Oxidation der Ölsäure könnten Radikale freigesetzt werden, die dann die Carotinoide spalten. Mit gereinigtem Enzym wurden jedoch die gleichen Spaltprodukte identifiziert wie mit Kulturüberstand. Auch zeigte die enzymatische Spaltung unter Verwendung des Emulgators Triton-X-100 keine Änderung des Produktspektrums, was eine direkte Spaltung durch die Peroxidasen bestätigt.

Durch Spaltung von Lycopin entstanden die aromaaktiven Verbindungen 6-Methyl-5-hepten-2-on und Geranial. Diese Verbindungen zählen zu den Hauptaromastoffen der Tomate (Lewinsohn et al., 2005). Sie sind auch aus dem thermischen Abbau von Lycopin bekannt (Kanasawud et al., 1990). Pseudoionon war

jedoch nicht detektierbar. Auch konnten nicht-flüchtige Verbindungen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Möglicherweise führt die Spaltung hier zur Bildung kurzkettiger, leicht flüchtiger Metabolite.

Aus dem Abbau des β -Apo-8'-carotinals wurde durch Spaltung der C9-C10-Bindung der C17-Dialdehyd identifiziert. Dieser Dialdehyd wurde ebenfalls aus der Spaltung mit einer vermeintlichen Carotinase aus *Arabidopsis thaliana* detektiert und durch Markierungsexperimente das Enzym als Dioxygenase identifiziert (Schmidt et al., 2006). Bei der Spaltung von Neoxanthin wurde kein Grashüpferketon detektiert. Lediglich 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid war in den Transformationsansätzen nachweisbar. Die kumulierte Doppelbindung ist wahrscheinlich für die Inhibierung der oxidativen Spaltung in C₉-C₁₀ - Position verantwortlich.

3.4.4 Apocarotinale als Vorstufen von Aromastoffen

Bei der Spaltung von Lutein wurde 3-Hydroxy- α -ionon, von Zeaxanthin und Lutein 3-Hydroxy- β -ionon, sowie 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid von Violaxanthin und Neoxanthin gebildet. Diese Verbindungen sind wichtige Vorstufen für weitere Aromastoffe. Sie kommen meist glykosidisch gebunden in vielen Pflanzen vor. In der Sternfrucht (*Averrhoa carambola* L.), Nektarinen (*Prunus perica* L. Cv. Springbright) und anderen Früchten der Gattung *Prunus* wurden 3-Hydroxy- β -ionon und 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid identifiziert (Winterhalter und Schreier, 1995; Aubert et al., 2003). Sie finden sich zudem in Tabak. 3-Hydroxy- α -ionon und das Grashüpferketon wurden im Tabak jedoch nicht identifiziert. Sie unterliegen wahrscheinlich einer weiteren Metabolisierung (Wahlberg, 2002).

Zur Gewinnung von Aromastoffen aus den genannten Vorstufen sind teilweise enzymatische und / oder säurekatalysierte Schritte wie Hydrolyse, Oxidationen, Dehydrogenierung, Eliminierung und Umlagerungen notwendig.

3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid wird als Precursor für die Bildung von Megastigma-7-en-5,9-diol-3,6-epoxid postuliert. Die Verbindung zeichnet sich durch eine 3,6-Epoxidbrücke aus, die bei Megastigmanen selten vorkommt. Der Geruch wird als schwach heuartig beschrieben. Zusammen mit 5,8-Epoxi-6-megastigman-3,9-diol wurde es aus der Behandlung des 3-Hydroxy- β -ionol-5,6-epoxids mit schwacher Säure erhalten. Beide Verbindungen kommen im Tabak vor. Das 5,8-Epoxid kann in einer weiteren Reaktion durch oxidative Spaltung zum Loliolid transformiert werden (Wahlberg, 2002) (**Abb. 3-21**).

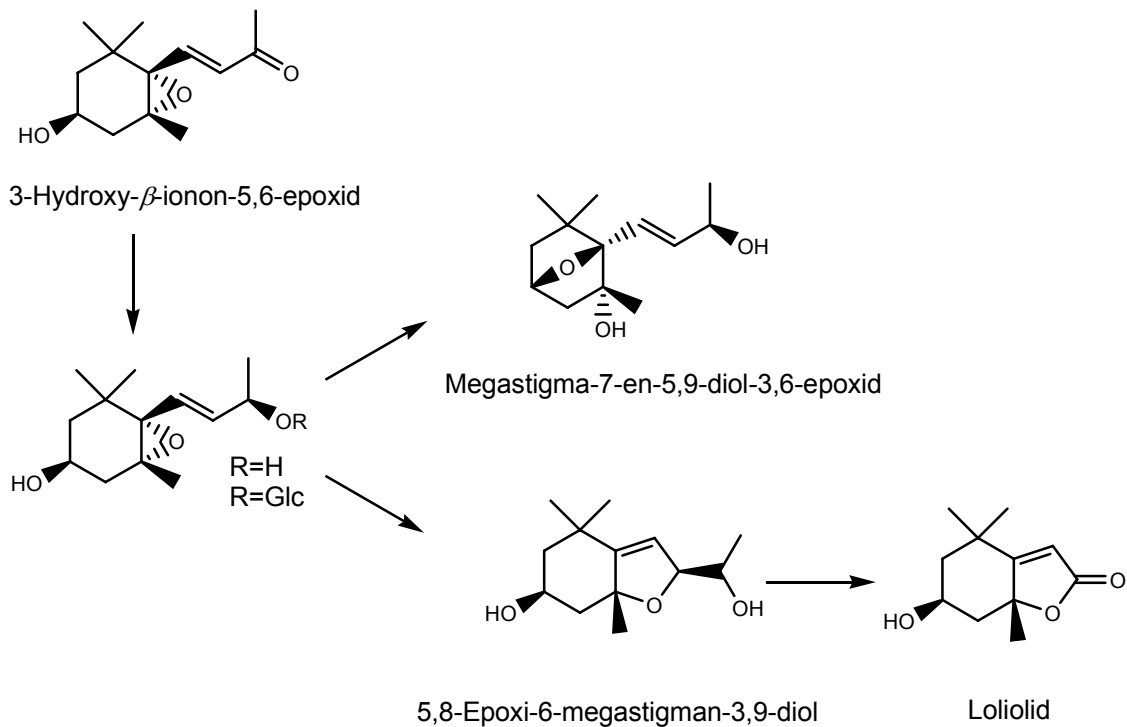


Abb. 3-21 Postulierter Biosyntheseweg des 3,6-Epoxids und 5,8-Epoxids sowie des Loliolids aus 3-Hydroxy- β -ionon-5,6-epoxid in Tabak (Wahlberg, 2002)

3-Hydroxy- α -ionon ist im Tabak als primäres Spaltprodukt bislang nicht nachgewiesen worden. Man geht hier von einer direkten Weitermetabolisierung aus. Mögliche Produkte könnten die vier Isomere des Megastigma-4,6,8-trien-3-ons sein, die als wichtigste Komponenten des Tabakaromas gelten. Zunächst kommt es zu einer Oxidation des 3-Hydroxy- α -ionons zu 3-Oxo- α -ionon, das anschließend zum 3-Oxo- α -ionol reduziert wird. Dies und das entsprechende Glykosid isomerisieren zum 3-Oxo-retro- α -ionol, das durch Dehydrierung zu den Megastigma-4,6,8-trien-3-on - Isomeren führt (Wahlberg, 2002) (**Abb. 3-22**).

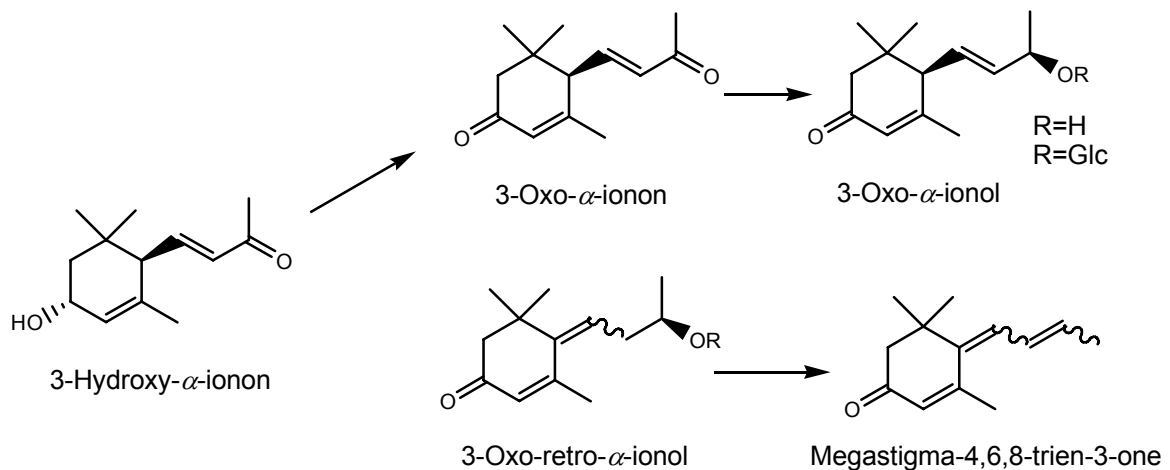


Abb. 3-22 Mögliche Bildung der Isomeren des Megastigma-4,6,8-ons aus 3-Hydroxy- α -ionon in Tabak (Wahlberg, 2002).

4 Ausblick

Bei der Biotransformation von α -Pinen zeigte *Pleurotus sapidus* in allen drei Transformationsansätzen die höchsten Ausbeuten an Verbenol und Verbenon. Die Verwendung höherer Zellkonzentrationen führte zu einem erhöhten Produktumsatz. Durch lyophilisiertes Pilzmyzel konnte eine wesentlich beschleunigte Transformation aufgezeigt werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um membrangebundene, intrazelluläre Enzyme. Die Enzymisolierung und Charakterisierung ist im Moment Gegenstand weiterer Arbeiten. Einige Cytochrom-P450-Monooxygenasen cDNAs aus *Pleurotus sapidus* sind bereits isoliert worden, ebenso eine für die Reaktion benötigte Reduktase (Bouws et al., 2006). Aufgrund der Vielzahl an möglichen P450-Monooxygenasen ist es wichtig, das für die Oxyfunktionalisierung von α -Pinen verantwortliche Enzymsystem herauszufinden. Dies könnte dann durch Überexpression in *E. coli* oder *Pichia pastoris* zur Produktion der Biokatalysatoren verwendet werden. Diese könnten dann zur Produktion von Verbenol / Verbenon verwendet werden.

Für eine Arylalkoholreduktase aus *Pleurotus eryngii* sind bereits Reinigungsprotokolle bekannt. Durch die komplette Reinigung des Enzyms könnte man die Oxidation von Verbenol belegen.

Durch die Verwendung beider Enzyme ließe sich dann ein biokatalysierter zweistufiger Prozess entwickeln, der für die Oxyfunktionalisierung von α -Pinen, aber auch anderer Terpenen eingesetzt werden kann.

Die Farnesenbiotransformation durch *Aspergillus niger* führte zur Bildung einer bislang in der Literatur nicht erwähnten Verbindung. Interessant sind hier die für diese Transformation verantwortlichen Enzyme, da sie diese Reaktion als einzige durchführen. Falls diese Enzyme unter Aktivitätserhalt isoliert werden können ist eine Identifizierung neben der Biotransformation interessant. Durch entsprechende Prozessoptimierungen ließe sich dann noch die Produktausbeute des neuen Naturstoffs erhöhen.

Die Spaltung der Carotinoide durch Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius* führte zu einer Reihe aromaaktiver Verbindungen sowie zu deren Vorstufen. Es wurden ebenfalls eine Reihe nicht-flüchtige Spaltprodukte identifiziert.

Die Überexpression der entsprechenden Gensequenzen in *Pichia pastoris* ist im Moment Gegenstand weiterführender Arbeiten. Wenn dies gelingt, ist eine vermehrte und einfachere Enzymproduktion und Isolierung möglich.

Dadurch könnten dann auch größere Mengen an Carotinoiden umgesetzt werden und einige unbekannte Verbindungen zur genauen Strukturermittlung mittels NMR untersucht werden.

Für den Einsatz der Peroxidasen sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. So würde ein Einsatz in Waschmitteln zur Fleckentfernung von Kleidungsstücken in Frage kommen. Auch in der Textilindustrie wäre die Entfärbung von farbstoffhaltigen Abwässern durch den Einsatz der Peroxidasen denkbar. Durch das Vorkommen in einem Speisepilz ist aus lebensmittelrechtlicher Sicht auch die Bleichung von Mehl zur Herstellung heller Brote eine Option.

5. Material und Methoden

5.1 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in **Tab. 5-1 und 5-2** aufgeführt. Es handelt sich hierbei sowohl um kommerziell erhältliche als auch um am Institut isolierte Stämme.

5.1.1 Kommerziell erhältliche Mikroorganismen

Die angegebenen Organismen wurden von folgenden Quellen bezogen:

- Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
- Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, NL

Tab. 5-1 Eingesetzte kommerzielle Mikroorganismen

Organismus	Stamm-Nr.	Substrate	Transformationsansatz
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266	α -Pinen	Submerskultur, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Pleurotus eryngii</i>	CBS 458.79	α -Pinen Farnesen	Submerskultur, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Chaetomium globosum</i>	DSMZ 1962	α -Pinen	Submerskultur, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Thelebolus canninus</i>	CBS 710.69	Farnesen	konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Marasmius scorodonius</i>	CBS 137.83	Farnesen Carotinoide, Apocarotinoide	Lyophilisate Kulturüberstand

5.1.2 Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate)

Die verwendeten Mikroorganismen aus **Tab. 5-2** wurden aus Früchten und Gewürzen isoliert (Brauer 2004). Der Organismus mit der Abkürzung LB 2025 wurde vom Lab. Bioaromas/FEA-UNICAMP, Universität Campinas, Brasilien aus Mango isoliert und zur Verfügung gestellt.

Tab. 5-2 Isolierte Mikroorganismen

Organismus	Stamm-Nr.	Substrate	Experimenteller Ansatz
<i>Penicillium solitum</i>	Isolat LCI	α -Pinen Farnesen	Submerskultur, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Stemphylium botryosum</i>	Isolat LCI	α -Pinen Farnesen	Submerskultur, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Aspergillus niger sp.</i>	LB 2025	Farnesen	konzentrierte Kulturen

5.2 Chemikalien

5.2.1 Bestandteile der Kulturmedien

Tab. 5-3 Bestandteile der Kulturmedien

Substanz	Qualität	Hersteller
Agar-Agar	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA, Darmstadt
L-Asparagin-Monohydrat	99%	Merck KGaA
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	> 98%	Fluka, Seelze
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	99%	J T Baker, Deventer, NL
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	-	Riedel-de Haën, Seelze
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
Glycerol	> 98%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl (37%)	reinst	Riedel-de Haën
KCl	reinst	Riedel-de Haën
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
KH_2PO_4	f. d. Mikrobiologie	Merck KGaA
NaOH	p.a.	Riedel-de Haën
$\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	chem rein DAB 7	Riedel-de Haën
Titriplex III	puriss., p.a.	Merck KGaA

5.2.2 Standardsubstanzen und Substrate

Tab. 5-4 Standardsubstanzen und Substrate

Substanz	Reinheit	Lieferant
β -Apo-8'-carotinal	-	BASF, Ludwigshafen
β -Apo-12'-carotinal	-	BASF
β,β -Carotin	> 97%	Fluka
BHT	99%	Fluka
β -Ionon	95%	Fluka
(-)-Borneol	puriss. > 99%	Fluka
(-)-Carveol, (Z)/(E) – Gemisch	Isom. 97%	Aldrich
Farnesen	Isomerengemisch > 70%	R C Treatt Ltd, Bury St. Edmunds, UK
(E)- β -Farnesen	95%	Promochem, Wesel
Farnesol	Isomerengemisch 95%	Aldrich
(+)-Fenchol	puriss. > 97,5%	Fluka
Lycopin	-	DSM, Delft, NL
(-)-Myrtenal	purum > 95%	Fluka
(-)-(Z)-Myrtenol	puriss. > 99%	Fluka
(\pm)- α -Pinen	purum 96%	Sigma
(-)-(E)-Pinocarveol	purum 98%	Fluka
(+)- α -Terpineol	puriss. 99%	Fluka
Thymol	> 99%	Fluka
(+)-(Z)-Verbenol	95%	Fluka
(-)-Verbenon	puriss. > 99%	Fluka
Zeaxanthin	-	DSM

5.2.3 Sonstige Chemikalien

Tab. 5-5 Sonstige Chemikalien

Substanz	Reinheit	Lieferant
BSTFA (Bis[trimethylsilyl]-trifluoracetamid)	-	Sigma
BSTFA + 1% TMSI (Trimethylchlorsilan)	-	Fluka
Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm)	Säulenchromatogr.	Merck KGaA
MOPS (4-[N-Morpholino]butansulfonsäure)	99,5%	Sigma
Natriumacetat	99%	Merck KGaA
Natriumchlorid	> 99,5%	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	98-105%	Merck KGaA
Natriumsulfat	98%	Carl Roth GmbH
Triton X-100	k.A.	Sigma
Tween 80	k.A.	Riedel-de Haën
Lignin	organosolv	Sigma-Aldrich
Acrylamid	purum, 2xkrist.	Carl Roth GmbH
N,N'-Methylenbisacrylamid	2xkrist.	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat, APS	>98%	Carl Roth GmbH
1,4 Dithiothreitol, DTT	f. d. Biochemie	Merck KGaA
TRIS-hydrochlorid	>99%	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat	>99%	Carl Roth GmbH
TEMED	99%	Carl Roth GmbH
Essigsäure	>99,8%	Fluka
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	>99,5%	Merck
Formaldehyd, 37%	f. d. Molekularbiol.	Sigma-Aldrich
Silbernitrat	chem rein, Ph. Eur.	Degussa-Hüls AG, Frankfurt
Sinensal Ex Orange 20/10a	k. A.	R C Treatt
Wasserstoffperoxid, 30%	purris.	Merck KGaA

5.2.4 Lösungsmittel

Es sind nur die häufig verwendeten Lösungsmittel aufgeführt. Selten benutzte Lösungsmittel und Chemikalien werden bei der jeweiligen Anwendung spezifiziert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Gebrauch redestilliert und (genau wie Fassware) über eine Füllkörperkolonne destillativ gereinigt. Die Redestillate wurden nach Reinheitsüberprüfung erneut eingesetzt. Diethylether wurde vor Gebrauch frisch destilliert und lichtgeschützt mit KOH stabilisiert.

Tab. 5-6 Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Lieferant	Verwendung
Aceton	redest.	Carl Roth GmbH	Reinigung, Extraktion
Acetonitril	99,8%, HPLC	Promochem	HPLC
Dichlormethan	redest.	Hochschullieferung	Extraktion
Dichlormethan	99,8%, HPLC	Sigma-Aldrich	HPLC
Diethylether	redest.	Carl Roth GmbH	Extraktion, Säulenchromatographie
Ethanol, vergällt	99%	Kraul & Wilkening & Stelling, Hannover	Desinfektion
Ethanol, unvergällt	96%	Kraul & Wilkening & Stelling	Emulsionsbrechung
Ethanol	99,9%	Merck KGaA	FPLC
Ethylacetat	98%	Carl Roth GmbH	HPLC
Ethylacetat	redest.	Carl Roth GmbH	Extraktion
n-Hexan	99,8%, HPLC	Carl Roth GmbH	HPLC
Methanol	redest.	BASF	Extraktion, Verseifung
Methanol	99,8%, HPLC	J. T. Baker	HPLC
Pentan	redest.	Carl Roth GmbH	Extraktion, Säulenchromatographie
Petrolether	reinst	Merck KGaA	Photometrie
Chloroform-d ₃	99,8%	Sigma-Aldrich	NMR-Lösungsmittel

5.2.5 Gase

Die Luft für den Kompressor wurde durch Ansaugen über einen Staubfilter der Raumluft entnommen, nach Kompression getrocknet und zusätzlich über eine 5x30 cm Silicagelsäule geleitet.

Tab. 5-7 Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendung
Druckluft	getrocknet	Schneider, Reutlingen	Detektorgas, Hilfsgas
Helium	5.0	Westfalen, Münster	Trägergas GC-MS
Stickstoff	5.0	Westfalen	Spülgas, Schutzgas
Wasserstoff	5.0	Westfalen	Trägergas, Detektorgas
Methan	5.0	Linde, Höllriegelskreuth	Stoßgas GC-MS (CI-Modus)

5.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den folgenden Kapiteln spezifiziert.

5.3.1 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Tab. 5-8 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Varioklav 75S	H&P, Oberschleißheim
Autoklav, Bioreaktor	5075 ELV	Systec, Wettenberg
Brutschrank	UM 500	Memmert, Schwabach
Destillationskolonne	Vigreux	LAT, Garbsen
Gefriertruhe	GT36	Bauknecht, Schondorf
Eissystem	ACM 35 Scotsman	Frimont, Mailand, IT
Laborbrenner	Gasprofi 2, WDL Tec	Wartewig, Arenshausen
Lichtmikroskop	Will H-500	Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	LAMS-1003	IDL GmbH&Co.KG, Nidderau

Tab. 5-8 Fortsetzung

pH-Meter	Ultra Basic UB5	Denver Instruments, Göttingen
Schüttler	Infors HAT, AJ 112	Infors, Einsbach
Steril-Werkbank	CA-RE 4	Clean-Air, Hilden
Superfreezer	VX 350 Series 2	Jouan GmbH, Fernwald
Ultraschallbad	Sonorex 510 H	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax	TP 18/10, 170 W	IKA, Staufen
Umlaufkühler	FC 600 W	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus, Osterode
Zentrifuge	Sorval RT7 Plus	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus
Rotationsverdampfer	Laborata 4002	Heidolph, Rust
E-Pure-Wasser	D4632S	Barnsted, Leverkusen
SPE- Vakuumentraktionsgerät	Supelco - Visiprep	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

5.3.2 Bioreaktor

Tab. 5-9 Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach

Kulturgefäß:	2 L - Füllvolumen
pH-Elektrode:	Schott Steamline SL 80-225 pH (Schott AG, Mainz)
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 ⁻¹ ; 0,1 vvm bei 2,5 L Füllvolumen

5.4 Kultivierung von Transformationskulturen

5.4.1 Kulturmedien

Die Medienbestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 300 mL (100 mL Füllmenge) oder 500 mL-Erlenmeyerkolben (200 mL Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.4.1.1 SNL-H-Standardnährmedium (nach Sprecher und Hanssen, 1982)

D-(+)-Glucose-Monohydrat	30 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ x H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹

Spurenelementlösung

FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,4 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 0,5 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt.

5.4.1.2 SNL-H-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem Medium nach 5.4.1.1 zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Sterilisieren zugegeben.

5.4.1.3 SNL-H-Agar mit β,β -Carotin

200 mg β,β -Carotin und 20 g Tween 80 wurden in ca. 100 mL Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 100 mL Wasser aufgenommen. Reste des Lösungsmittels wurden bei 200 mbar abrotiert und die Lösung anschließend noch 15 min bei 250 rpm weiter emulgiert. SNL-H-Agar wurde nach 5.4.1.1 und 5.4.1.2 hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde die β,β -Carotin-Lösung in den noch ca. 50 °C heißen SNL-H-Agar sterilfiltriert.

5.4.2 Kulturführung

5.4.2.1 Stammkultivierung

Aus den von kommerziellen Anbietern gelieferten Stämmen wurden jeweils zwei Stammkulturen auf Agarplatten mit SNL-H-Agar Medium angelegt. Hierbei wurde eine Agarplatte mit einem quadratischen Agarstück (ca. 0,5 x 0,5 cm) beimpft und bei 24 °C im Brutschank kultiviert. (Taubert et al. 2000) Nach Bewachsen der Agarplatte wurde die Kultur bei 4 °C gelagert. Die Stammkulturen wurden mindestens alle 6 Monate nach dem gleichen Verfahren erneuert.

5.4.2.2 Homogenisieren von Kulturen

Die Homogenisierung von Myzel aus Agarplatten oder flüssigem Kulturmedium erfolgte im sterilen Kulturmedium mit einem vorab hitzesterilisierten Ultra-Turrax Homogenisator für ca. 10 s bei niedrigster Drehgeschwindigkeit.

5.4.2.3 Vorkulturen

Von der auf Kulturplatten geführten Stammkultur wurden myzelbewachsene Agarstücke (ca. 1 x 1 cm) mit einem sterilen Spatel in einen mit 100 mL SNL-H-Medium gefüllten 300 mL-Erlenmeyerkolben überführt, homogenisiert und je nach Organismus bis zu 7 Tage im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

5.4.2.4 Hauptkulturen

Pro 100 mL SNL-H-Medium wurden 10 mL der Vorkultur nach Homogenisieren unter sterilen Bedingungen in das Transformationsmedium pipettiert. Die Kultivierung erfolgte soweit nicht anders angegeben, in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit 200 mL SNL-H-Medium bei 24 °C und 150 rpm.

5.4.2.5 Glucosearme Kulturführung

Für die Umsetzung von α -Pinen wurde die Biotransformation in Submers- und Biokonzentraten mit SNL-H-Medium mit einem verminderten Glucosegehalt von 1% (10 g L^{-1}) durchgeführt.

5.4.2.6 Kulturführung im Bioreaktor

Für die Biotransformation von α -Pinen wurden zur Vergleichbarkeit größere Mengen an Zellmasse benötigt. Die Produktion erfolgte daher in einem 2 L-Bioreaktor.

Zur Gewinnung großer Mengen an Kulturüberstand von *Marasmius scorodoni* zur Spaltung der Carotinoide wurde die Kultivierung ebenfalls im Bioreaktor durchgeführt.

- Produktion von Biomasse

Für die Produktion von Biomasse wurden 1,8 L SNL-H-Medium mit 200 mL einer homogenisierten Vorkultur inokuliert. Je nach verwendetem Organismus wurde die Produktion nach 3-5 Tagen gestoppt und der Inhalt des Bioreaktors unter sterilen Bedingungen durch ein Leinentuch filtriert und so das Medium abgetrennt. Das erhaltene Pilzmyzel wurde mit 2 x 400 mL steriler 0,9%iger Kochsalzlösung (w/v) gewaschen und für weitere Experimente verwendet.

- Gewinnung des Kulturüberstandes von *Marasmius scorodoni*

1,8 L SNL-H-Medium wurden mit 200 mL einer homogenisierten Vorkultur von *Marasmius scorodoni* versetzt und 20 mL einer Ligninsuspension (1,8 g in 70%igem Ethanol) hinzugefügt. Die Bildung der Peroxidasen durch tägliche Probenahme überprüft. Bei einer Aktivität von etwa $0,6 \text{ mU mL}^{-1}$ wurde die Produktion gestoppt und das Pilzmyzel durch Zentrifugation bei 10.000 rpm ($15.764 \times g$) abgetrennt.

5.4.3 Herstellung von Lyophilisaten

Die Herstellung von lyophilisiertem Pilzmyzel erfolgte aus den gewonnenen Biomassen der jeweiligen Bioreaktoransätze (5.4.2.6). Hierzu wurden 50 g Biofeuchtmasse in ein steriles 250 mL-Becherglas eingewogen, mit Alufolie abgedeckt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gefriertrocknung (Anlage Finaqua Lyovac GT2) erfolgte bei Raumtemperatur und 2×10^{-5} bar für 2-4 Tage. Die Lyophilisate wurden

anschließend zerkleinert, in Falcon tubes abgefüllt und die erhaltene Ausbeute bestimmt.

5.4.4 Herstellung der konzentrierten Kulturen (Farnesendosierung)

Für die Herstellung der Biokonzentrate zur Biotransformation von Farnesen wurde das Medium einer drei Tage alten Hauptkultur durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm ($15.264 \times g$) abgetrennt und die verbliebene Zellmasse (ca. 33 g Feuchtmasse) in einen sterilen 300 mL-Erlenmeyerkolben überführt, der anschließend mit frischem SNL-H-Medium auf ein Volumen von 50 mL aufgefüllt und bei 200 rpm und 24 °C inkubiert wurde.

5.5 Dosierung von Transformationssubstraten

5.5.1 Dosierung von α -Pinen

5.5.1.1 Submerskultur

Für die Umsetzung in Submerskultur wurde 1 mmol (140 mg, 161 μ L) α -Pinen zu 100 mL SNL-H-Medium (1% Glucose) und 5 g Biofeuchtmasse des Bioreaktoransatzes (5.4.2.6) nach 24-stündigem Schütteln bei 150 rpm dosiert und 48 Stunden transformiert.

5.5.1.2 Konzentrierte Kulturen

Für die Umsetzung mit konzentrierten Kulturen wurden 1 mmol (140 mg, 161 μ L) α -Pinen zu 50 g Biofeuchtmasse des Bioreaktoransatzes (5.4.2.6) und 50 mL SNL-H-Medium (1% Glucose) nach 24 Stunden Schütteln bei 150 rpm dosiert und für 48 Stunden transformiert.

5.5.1.3 Lyophilisate

500 mg Lyophilisat (5.4.3) wurden mit 15 mL 0,1 M MOPS-Puffer (2,09 g 100 mL⁻¹ eingestellt mit 0,1 M NaOH auf pH 7) versetzt und eine Stunde rehydratisiert. Anschließend wurde 1 mmol (140 mg, 161 μ L) α -Pinen zugegeben und für 20 Stunden transformiert.

5.5.1.4 Kontrollwerte

Die Kontrollwerte wurden analog zum entsprechenden Biotransformationsversuch durchgeführt, wobei zwischen einem chemischem Blindwert ohne Myzel und einem Blindwert mit autoklaviertem Pilzmyzel unterschieden wurde. Beide wurden analog zu den jeweiligen Transformationsansätzen mit gleicher Substratdosierung mitgeführt und analysiert.

5.5.2 Dosierung von (Z) - Verbenol (*Pleurotus eryngii*)

5.5.2.1 Submerskultur

1,6 g (Z)-Verbenol wurden in 10 mL Ethanol gelöst und anschließend 1 mL (10 mM) dieser Lösung zu einer Submerskultur von *Pleurotus eryngii* gegeben, die nach 5.5.1.1 hergestellt wurde. Die Zugabe erfolgte nach 24-stündigem Schütteln des Pilzmyzels im Nährmedium. Die Transformationsdauer betrug 48 Stunden. Die Aufarbeitung erfolgte nach 5.7.1 bzw. 5.7.2.

5.5.2.2 Transformation mit Kulturüberstand und Myzel

Für die Transformation wurde zunächst das Myzel von *Pleurotus eryngii* durch Zentrifugation bei 4.000 rpm (3.313 x g) abgetrennt. Das Pilzmyzel wurde mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen und die verbliebene Feuchtmasse (ca. 50 g) mit 50 mL frischem SNL-H-Medium auf 100 mL aufgefüllt. 0,25 mL der nach 5.5.2.1 hergestellten ethanolischen Lösung von (Z)-Verbenol (2,5 mM, 40 mg) wurden zu jeweils 100 mL des Kulturüberstandes und des Pilzmyzels gegeben.

5.5.2.3 Transformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel

Die Transformation wurde analog zu 5.5.1.3 durchgeführt. Zu 50 mg Lyophilisat wurden 2 mL MOPS-Puffer hinzugefügt und eine Stunde rehydratisiert. Anschließend wurden 10 µL der ethanolischen (Z)-Verbenol-Lösung (5 mM, 1,54 mg) hinzugefügt und die Transformation für 20, bzw. 42 Stunden durchgeführt und nach 5.7.4 extrahiert.

5.5.3 Dosierung von Farnesen

5.5.3.1 Konzentrierte Kulturen

Die Umsetzung wurde mit den Biokonzentraten nach 5.4.4 durchgeführt. 0,5% (v/v) (25 mM, 218 µL) Farnesenisomerengemisch wurden nach einer Stunde Schütteln bei 150 rpm zudosiert und die Transformation für 24 Stunden durchgeführt.

5.5.3.2 Lyophilisate (Mikroansätze)

Die Umsetzung erfolgte durch Zugabe von 27,4 mM (10 µL) Farnesenisomerengemisch zu 50 mg Lyophilisat (5.4.3) in 1,5 mL MOPS-Puffer nach einstündiger Rehydratisierung. Die Transformationsdauer betrug 24 Stunden.

5.6. Bestimmung von Kulturparametern

5.6.1 Feuchtmasse

Die Bestimmung der Feuchtmasse erfolgte aus dem Bioreaktoransatz (5.4.2.6). Die Biofeuchtmasse wurde nach Abtrennung des Mediums durch Filtration durch ein Leinentuch nach 5 min Wartezeit durch Auswiegen bestimmt.

5.6.2 Trockenmasse nach Gefriertrocknung

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte aus 50 g eingesetzter Biofeuchtmasse, die nach Gefriertrocknung (5.4.3) zerkleinert und entsprechend ausgewogen wurden.

5.6.3 Glucosegehalt

- Schnellmethode (Teststäbchen):

Die Durchführung erfolgte mittels Diabur-Test[®] 5000 von Roche Diagnostics, Mannheim, nach Herstelleranweisung.

5.6.4 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Kulturmedien und Puffer wurde mit einem täglich kalibrierten pH-Meter bestimmt.

5.6.5 Prüfung auf Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wurde mit einem Analysestäbchen 1.10011.0001 (Merck) nachgewiesen.

5.6.6 Prüfung auf Kontamination

Eine Überprüfung erfolgte zunächst durch Beobachtung des Kulturwachstums. Hefen und Bakterien sorgen durch ihr schnelleres Wachstum für eine Trübung des Kulturmediums. Die Kulturen wurden im Falle einer vermuteten Kontamination unter dem Mikroskop untersucht.

5.7 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

5.7.1 Extraktion von Kulturüberständen

Nach beendeter Transformation wurde die Biomasse durch Zentrifugation bei 4.000 rpm ($3.313 \times g$, 10 min) vom Kulturüberstand abgetrennt. Der Überstand wurde je dreimal mit 50 mL Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch (1:1,12) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei einer Badtemperatur von 40 °C eingeeengt. Der erhaltene Extrakt wurde mittels GC und GC-MS untersucht.

5.7.2 Extraktion der Biofeuchtmasse

Die nach 5.7.1 abgetrennte Biofeuchtmasse wurde dreimal mit je 50 mL Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch extrahiert. Zur Phasentrennung erfolgte bei Emulsionsbildung ein Zusatz von NaCl. Die Zellmasse wurde dabei mit einem Glasstab verrieben. Die vereinigten Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, mit den Extrakten der Kulturüberstände vereinigt und gemeinsam an der Vigreux-Kolonnen bei 40 °C eingeeengt.

5.7.3 Extraktion von Lyophilisaten

Die Extraktion der 15 mL- Ansätze mit lyophilisierten Kulturen erfolgte analog 5.7.1 und 5.7.2 unter Verwendung von 30 mL Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch.

5.7.4 Extraktion des gesamten experimentellen Ansatzes (Farnesen)

Die Extraktion erfolgte im Fall der Farnesenbiotransformation komplett mit Myzel. Dazu wurde die Kultur nach beendeter Transformation in einem 250 mL-Scheidetrichter dreimal mit je 50 mL Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch extrahiert. Die Proben wurden bei Emulsionsbildung bei 4.000 rpm ($3.313 \times g$) zentrifugiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet.

5.7.5 Mikroextraktion

Die Mikroextraktion des 1,5 mL-Ansatzes erfolgte in einem 4 mL-Vial. Hierzu wurde nach erfolgter Umsetzung mit internem Standard (α -Pinen: 60 μ g BHT; Farnesen: 150 μ g Thymol) und 2 mL Pentan/Ether- Lösungsmittelgemisch versetzt. Die Proben wurden 5 min per Hand geschüttelt und anschließend bei 4.000 rpm ($3.313 \times g$) zentrifugiert. Der Überstand wurde über Natriumsulfat getrocknet und direkt on-column injiziert.

5.8 Chromatographie

5.8.1 Bestimmung von Geruchsaktivitäten und Geruchsschwellen

Die Geruchsqualitäten und Schwellenwerte im Verdünnungsmedium Luft wurden mittels GC-O in Anlehnung an die Arbeiten von Christoph (1983) bestimmt.

Bei der Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion (GC-O, 5.8.4.4) 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. Der Sniffport ist auf 250 °C beheizt, um ein vorzeitiges Kondensieren der Substanzen zu verhindern. Die Säule mündet am Ende in einen mit Teflonband abgedichteten Glastrichter.

Jede der zu untersuchenden Substanzen wurde von vier Testpersonen bezüglich ihrer Geruchsqualität und ihres Geruchsschwellenwertes beurteilt. Dabei wurde als Erkennungsschwelle die Konzentration einer Substanz festgelegt, bei der ihre charakteristischen Geruchseigenschaften für mindestens die Hälfte der Testpersonen noch eindeutig erkennbar waren.

Die Erkennungsschwellen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{c \cdot V}{2}$$

M = Reizmenge, die am Sniffausgang eluiert [ng]

c = Konzentration der Lösung [ng μL^{-1}]

V = Einspritzvolumen [μL]

5.8.2 Silylierung für die Gaschromatographie

Zur Silylierung wurden 80 μL der in Pentan/Ether gelösten Probe mit 20 μL BSTFA (mit 1% Trimethylchlorsilan) versetzt und hydroxylierte Verbindungen über Nacht silyliert.

5.8.3 Probenaufreinigung an Kieselgel

Zur Probenaufreinigung wurden leere Mikro-Extraktionskartuschen (J.T. Baker, Bakerbond SPE 7121-06) mit Kieselgel 60 (60-200 mesh, Merck, eingestellt mit 4% Wasser auf Aktivitätsstufe 4) befüllt und mit Pentan equilibriert. Nach Aufgabe der konzentrierten Probelösung in Pentan wurde mit folgendem Lösungsmittelgradienten eluiert und die erhaltenen Fraktionen mittels GC-FID bzw. HPLC-DAD untersucht:
100% Pentan → 80:20 → 60:40 → 40:60 → 20:80 → 100% Diethylether

5.8.4 Kapillargaschromatographie

5.8.4.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)

Tab. 5-10 GC-FID (on-column)

Gaschromatograph	Fisons GC 8000 Series
Injektor	Cold on column
Trennsäule	J&W Innowax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 250 °C
Detektorgase	H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trägergas	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluss 3,5 mL min ⁻¹
Datenaufnahme	ChromCard (CE Instruments) Version 1.21
Temperaturprogramme	α-Pinen: 40 °C (3 min), 3 °C min ⁻¹ - 240 °C (10 min) Farnesen: 40 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ - 160 °C, 3 °C min ⁻¹ - 200 °C, 5 °C min ⁻¹ - 240 °C (10 min)

5.8.4.2 HRGC mit Split-Splitless-Injektion und FID für silylierte Proben und Carotinoidabbau

Tab. 5-11 GC-FID (split-splitless)

Gaschromatograph	Fisons GC 8000 Series
Injektor	Split-Splitless (Splitverhältnis 1:20), 230 °C, Splitöffnung nach 1 min
Trennsäule	J&W DB 5, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 300 °C
Detektorgase	H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trärgas	H ₂ , Vordruck: 50 kPa, Fluss: 2,5 mL min ⁻¹
Datenaufnahme	ChromCard (CE Instruments) Version 1.21
Temperaturprogramme	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 280°C (10 min)

5.8.4.3 HRGC mit On-Column-Injektion zur chiralen Trennung

Tab. 5-12 GC mit chiraler Trennsäule

Gaschromatograph	Siemens Sichromat 1-4 Doppelofen
Injektor	PTV, 50 °C, 0,5 min-150 °C min ⁻¹ , 230 °C, 1 min
Trennsäule (linker Ofen)	CW 20 M, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (M&N)
Trennsäule (rechter Ofen)	CycloSil-B (25 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke Trennphase: 30% Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-butyl)- β-cyclodextrin in DB-1701 (J&W)
Detektor	FID, 250 °C
Detektorgase	H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trärgas	H ₂ , Vordruck: 50 kPa, Fluss: 2,5 mL min ⁻¹
Datenaufnahme	Chromatopac C-R5A Integrator (Shimadzu)
Temperaturprogramme	Linker Ofen: 40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 230°C (10 min) Rechter Ofen: 40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 100 °C (10 min), 1 °C min ⁻¹ 220 °C

5.8.4.4 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktometrischer Detektion (GC-O)

Tab. 5-13 GC mit olfaktometrischer Detektion

Gaschromatograph	Satochrom
Injektor	Cold on column, 40 °C
Trennsäule	SolGelWax20, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (SGE)
Detektor	FID, 250 °C; Sniff-Port 250 °C
Detektorgase	H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trägergas	H ₂ , Vordruck: 50 kPa, Fluss: 3,3 mL min ⁻¹
Datenaufnahme	ChromCard (CE Instruments) Version 1.21
Temperaturprogramme	40 °C (3 min), 3 °C min ⁻¹ -250 °C (10 min)

5.8.4.5 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)

Tab. 5-14 GC-MS mit polarer Säule

Gaschromatograph	GC 8000 (Fisons)
Injektor	Cold on column, 40 °C
Trennsäule	ZB-Wax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Phenomenex)
Detektor	MD 800 (Fisons)
Trägergas	He, Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,1 mL min ⁻¹
Temperaturen	Ionenquelle: 200 °C, Interface: 230 °C, Quadrupol: 100 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich	m/z 33-300
Datenaufnahme	Xcalibur Version 1.19 (Thermo)
Temperaturprogramme	Siehe GC-FID (5.8.4.1)

Tab. 5-15 GC-MS mit unpolarer Säule

Gaschromatograph	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor	Cold on column, 40 °C
Trennsäule	ZB-5ms, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Phenomenex)
Detektor	Mass Spectrometer 5989 (Hewlett-Packard)
Trärgas	He, Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,3 mL min ⁻¹
Temperaturen	Ionenquelle: 250 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol: 100 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich	m/z 33-500
Datenaufnahme	MS HP-UX Chem Station, B06.01 Software
Temperaturprogramme	Siehe GC-FID (5.8.4.2)

5.8.4.6 Präparative Gaschromatographie

Tab. 5-17 Präparative Gaschromatographie

Gaschromatograph	HP 5890 Series II (Hewlett-Packard) mit MCS (Gerstel)
Injektor	KAS-3 Kaltaufgabesystem (Gerstel), 40 °C
Autosampler	HP 7673 (Hewlett-Packard)
Fraktionssammler	PFS (Gerstel)
Trennsäule 1	CW 20 M, 3 m x 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (M&N)
Trennsäule 2	CW 20 M, 25 m x 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (M&N)
Detektoren	Vor-/Hauptdetektor: 250 °C
Gase und Fluss	Trärgas: H ₂ ; Fluss: 5 mL min ⁻¹ Gegengase 1 und 2: H ₂ : 1 mL min ⁻¹
Detektorgase	H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Temperaturen	Transferleitung: 250 °C, Verteiler: 250 °C, Fallen: 0 °C
Temperaturprogramm	70 °C (2 min), 5° C min ⁻¹ - 220 °C (10 min)
	Transferleitung: 250 °C, Verteiler: 250 °C, Fallen: 0 °C

5.8.4.7 Berechnung der Kovats - Indizes

Die Kovats - Indizes wurden nach folgender Formel berechnet:

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

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

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

A = Analyt

t' = Netto-Retentionszeit = Retentionszeit t - Totzeit t₀

Die Alkanreihe enthielt alle Alkane von C₁₀ bis C₂₈.

5.8.4.8 Berechnung des Enantiomerenüberschusses ee

Der Enantiomerenüberschuss wurde berechnet nach:

$$ee (\%) = 100 \cdot \frac{Area_1 - Area_2}{Area_1 + Area_2}$$

wobei:

Area₁ = Peakfläche des überwiegend vorliegenden Enantiomers.

Area₂ = Peakfläche des mit geringerem Anteil vorkommenden Enantiomers

5.8.5 Hochleistungsflüssigchromatographie

5.8.5.1 HPLC-DAD

Tab. 5-18 HPLC-DAD

Pumpe	Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump
Degasser	Jasco DG-980-50 3-line Degasser
Gradientenformer	Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Injektionsventil	Rheodyne RH 7725 mit 20 µL Probenschleife
Säule	Macherey-Nagel Nucleosil 250/4, CC 100-5-RP-18 Nautilus mit Vorsäule
Fließmittel	Wasser/Acetonitril (0 - 4 min 50/50; 4 - 20 min 0/100; 20 - 60 min 0/100; -80 min 100% Methanol
Diodenarraydetektor	Shimadzu SPD-M6A Photodiodenarraydetektor Wellenlängen 380 - 550 nm
Datenauswertung	Shimadzu Class-M10A (Version 1.64A)

5.8.5.2 Semipräparative HPLC

Tab. 5-19 Semipräparative HPLC

Pumpe	Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump
Degasser	Shadex Degas KT-37-3-line Degasser
Dynamischer Hochdruckmischer	Jasco HD-250-450 Ternary Gradient Unit
Flussrate	7,5 mL min ⁻¹
Injektionsventil	Rheodyne RH 7725i mit 2 mL Probenschleife
Säule	Macherey-Nagel Nucleosil 250/16, CC 100-5-RP-18
Fließmittel	A: Methanol/Wasser; B: Ethylacetat (0 min 75% A; 25 min 65% A; 35 min 100% B; 46 min 75% A
Detektor	UV-1570 (Jasco), 450 nm
Datenauswertung	Borwin Chromatographie Software (Version 1.20)

5.8.5.3 HPLC-MS (Kopplung mit Massenspektrometer)**Tab. 5-20** HPLC-MS-Kopplung

LCMS System	Shimadzu, LCMS-QP8000 α
Degasser	Shimadzu DGU-12A
Gradientenformer	LC-10AD/LC-10ATVP
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Injektionsventil	Rheodyne RH 7725i mit 20 μ L Probenschleife
Säule	Macherey-Nagel Nucleosil 250/4, CC 100-5-RP-18 Nautilus
Fließmittel	siehe 5.8.5.1
Detektor (UV)	Shimadzu SPD-10AvP, 450 nm
Massenspektrometer	Shimadzu LCMS-QP8000 α ; APCI-positiv-Modus
Datenauswertung	Shimadzu LCMS Solution (Version 2.04Su1)

5.9 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

FPLC-System:	Biologic Duo Flow Chromatography System (Bio-Rad) mit Fraktionssammler Modell 2128
Datenaufnahme:	Biologic Duo Flow Workstation
Detektionswellenlänge:	280 nm

5.9.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Tab. 5-21 Enzymaufreinigung mittels IEX

Säule	Pharmazia Biotech, 18,1 mL
Füllmaterial	Q-Sepharose High Performance (Pharmazia Biotech) Bindungskapazität: 70 mg mL ⁻¹
Elutionsprogramm	1. NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6): 20 mL 2. Injektion der Probe über Pumpe B, Port 4: 20 mL 3. 200 mL NaAc-Puffer(0,05 M; pH 6): 200 mL 4. Linearer Gradient von 0% → 100% NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6) + 1 M NaCl: 320 mL 5. NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6) + 2 M NaCl: 40 mL 6. NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6): 60 mL
Flussrate	3 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße	5 mL

5.9.2 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Tab. 5-22 Enzymaufreinigung mittels GFC

Säule	Pharmazia Biotech, 24 mL
Füllmaterial	Superdex 200 HR 10 / 30, Trennbereich 10 - 600 kDa
Elutionsprogramm	1. NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6): 5 mL 2. Injektion der Probe über 200 µL-Schleife mit NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6) 3. 50 mL NaAc-Puffer (0,05 M; pH 6)
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße	0,5 -1 mL

5.10 UV/VIS-Spektroskopie

Photometer:	Perkin Elmer Lambda 12 mit temperierbarem Küvettenhalter
Datenaufnahme:	UV Win Lab (Version 2.0)
Küvetten:	Hellma Quarzküvetten, 2 mL, Schichtdicke 1 cm Halbmikroküvetten (PS), 1 mL, Schichtdicke 1 cm

5.11 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektrometer:	BRUKER Avance DRX-500
Lösungsmittel:	CDCl ₃
¹ H-NMR:	500 MHz
¹³ C-NMR:	125 MHz
Messverfahren:	¹ H, ¹³ C, ¹ H, ¹ H-COSY, ¹ H- ¹³ C-HMQC und HMBC

5.12 Enzymreinigung

5.12.1 Aktivitätsbestimmung

5.12.1.1 Herstellung einer wässrigen β,β -Carotininlösung

In einem 250 mL-Rundkolben wurden 5 mg β,β -Carotin und 500 mg Tween 80 in ca. 50 mL Dichlormethan gelöst. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden 40 mL Wasser hinzugefügt. Reste des Lösungsmittels wurden am Rotationsverdampfer in 200 mbar Schritten von 800 mbar bis 200 mbar bei 40 °C abgezogen und die Lösung noch 20 Minuten unter einem Stickstoffstrom abgeblasen, um letzte Lösungsmittelreste zu entfernen. Die Lösung wurde nach Membranfiltration (0,45 μ m Porengröße, PET, Carl Roth GmbH) auf ein Volumen von 50 mL aufgefüllt, und vor der weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter Ausschluss von Licht statt.

5.12.1.2 Herstellung von Natriumacetat-Puffer

Zur Herstellung des Puffers wurden 0,1 M bzw. 1 M Stammlösungen von Natriumacetat und Essigsäure hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurde durch Mischen der gewünschte pH-Wert und anschließend durch Verdünnung mit Wasser die Zielkonzentration eingestellt (LAB Tools, Tabellen für das Labor, Merck, W. 280011/1200).

5.12.1.3 Enzymtest

1,5 mL der enzymhaltigen Probelösung wurden in eine Quarzküvette pipettiert und 5 min bei 27 °C im Photometer vortemperiert. Nach Zugabe von 100 μ L der β,β -Carotin-Lösung (5.12.1.1) wurde die Abnahme der Extinktion bei 450 nm über einen Zeitraum von 15 min aufgenommen. Bei Bedarf wurde die Enzymlösung so lange mit NaAc-Puffer verdünnt, bis eine lineare Abnahme der Extinktion erreicht war.

Die Aktivität A berechnet sich nach:

$$A [\text{mUmL}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_g}{V_p \cdot c \cdot \varepsilon} \times 1000$$

ΔE = Abnahme der Extinktion pro Minute

V_g = Gesamtvolumen [mL] (hier: 1,6 mL)

V_p = Probevolumen [mL] (hier: 1,5 mL)

d = Schichtdicke der Küvette [cm] (hier: 1 cm)

ε = molarer Extinktionskoeffizient von β, β -Carotin in Wasser
(experimentell bestimmt: $95000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 450 nm)

5.12.2 Konzentrierung von Kulturüberstand aus *Marasmius scorodoni* mittels VivaFlow 200

Der nach 5.4.2.7 gewonnene Kulturüberstand wurde in drei Portionen von je 500 mL aufgeteilt. Das Medium wurde mit einer VivaFlow 200-Einheit mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa durch eine Hydrosart-Membran konzentriert. Etwa 50 mL der konzentrierten Lösung wurden auf je 2 mL Eppendorfgefäße verteilt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.12.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach dem „DC Protein Assay“ (Biorad), der aus zwei Lösungen bestand. Lösung A ist eine alkalische Kupfertartrat-Lösung, Lösung B ein verdünntes Folin-Reagenz (Biorad, München). Der Test basiert auf einer von Lowry entwickelten Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes unter Verwendung eines Folin-Phenol-Komplexes (Lowry et al., 1951; Peterson, 1979). Der Anwendungsbereich liegt im Bereich zwischen $0,2 - 1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Höher konzentrierte Proben wurden entsprechend mit E-Pure-Wasser verdünnt. 20 μL Probelösung wurden mit 100 μL Reagenz A direkt in Halbmikroküvetten versetzt und gemischt, anschließend erfolgte die Zugabe von 800 μL Reagenz B. Nach dem sofortigen Durchmischen wurde die Probe nach 15 min Wartezeit bei 750 nm gegen Wasser gemessen. Als Kontrollwert wurde E-Pure-Wasser verwendet. Aus Standardproteinlösungen ($0,2 - 1,2 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde eine Kalibriergerade erstellt. Über die Geradengleichung wurde der Gehalt der eingesetzten Probelösung berechnet.

5.12.4 Enzymreinigung mittels IEX (Scheibner, 2006, mod.)

Zur Reinigung wurden die konzentrierten Kulturüberstände (5.12.2) verwendet. 10,5 mL Kulturüberstand wurden nach Zentrifugation mit dem gleichen Volumen an NaAc-Puffer (0,05 M, pH 6) verdünnt. Die Reinigung erfolgte mit dem Laufprogramm nach 5.10.1. Es wurden Fraktionen zu je 5 mL gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden in 2 mL-Eppendorfgefäße aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden für die weitere Aufreinigung mittels GFC bei -70 °C gelagert.

5.12.5 Enzymreinigung mittels GFC (Scheibner, 2006, mod.)

Vor der Reinigung wurden die vereinigten aktiven IEX-Fraktionen mittels Viva-Spin-R-15-Einheiten (Ausschlussgröße 10 kDa) konzentriert. Die Injektion erfolgte über eine 200 µL-Probenschleife. Die Reinigung wurde mit dem Laufprogramm nach 5.10.2 durchgeführt. Es wurden 0,5 mL-Fraktionen gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und für die Umsetzung verwendet.

5.12.6 Bestimmung der Enzymkinetik für MSP2

Für die Enzymkinetik wurde eine β,β -Carotin-Lösung (5.12.1.1) mit einer Konzentration von 1,0 g L⁻¹ verwendet. Die Umsetzung erfolgte in auf 27 °C temperierten Küvetten mit Rührer. Als Puffer wurde 50 mM Natriumacetat/Essigsäure pH 3,5 verwendet. 200 µL der gereinigten Enzymfraktionen F18 und MSP2 wurden zusammen mit Puffer und Substrat auf ein Gesamtvolumen von 1,6 mL aufgefüllt. Zusätzlich wurde 1 µL einer 20 mM Wasserstoffperoxid - Lösung hinzugefügt. Variiert wurde die Menge an Substrat und Puffer, so dass sich eine Substratkonzentration von 3,5 - 380 µM ergab. Die Umsetzung erfolgte für 30 min. Für die photometrische Messung wurde die Probelösung zu Beginn und nach 30 min entsprechend so lange verdünnt, bis sie sich im linearen Messbereich befand. Für das Lineweaver-Burk-Diagramm wurden die Kehrwerte der Substratkonzentration gegen die Kehrwerte des Substratumsatzes in 30 min aufgetragen.

5.12.7 Überprüfung der Reinigung mittels SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

5.12.7.1 Lösungen für die SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine wurden 12%ige SDS-Trenngele hergestellt.

Für das SDS-Gel wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS): 400 g L⁻¹ E - Pure - Wasser

Lower-Tris, 4x:

Tris base: 181,7 g L⁻¹

SDS: 4,0 g L⁻¹ E - Pure - Wasser

pH 8,8

Upper-Tris, 4x:

Tris base: 60,55 g L⁻¹

SDS: 4,0 g L⁻¹ E - Pure - Wasser

pH 6,8

Zusammensetzung Auftragspuffer:

0,1 M Tris-HCl pH 6,0

0,2 M DTT

4% SDS

2 g L⁻¹ Bromphenolblau

20% Glycerol

Tab. 5-23 Zusammensetzung der 12%igen SDS-Gele (Herstellung für 2 Gele)

Trenngel	
E-Pure-Wasser	3,62 mL
Lower Tris	3,00 mL
Acrylamid (40%) in H ₂ O	3,51 mL
Bisacrylamid (2%) in H ₂ O	1,87 mL
APS	30 µL
TEMED	15 µL

Tab. 5-23 Fortsetzung

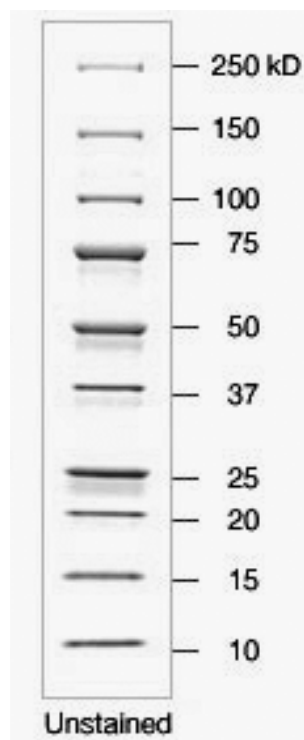
Sammelgel 6%ig	
E-Pure-Wasser	1,578 mL
Upper Tris	750 μ L
Acrylamid (40%) in H ₂ O	438 μ L
Bisacrylamid (2%) in H ₂ O	234 μ L
APS	15 μ L
TEMED	6 μ L

Für die Probenvorbereitung wurden 20 μ L der jeweiligen Enzymfraktion mit 20 μ L Auftragspuffer versetzt und bei 95 °C 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und für die Trennung aufbewahrt.

15 μ L dieser Lösung wurden direkt auf das Sammelgel gegeben. An Standard wurden jeweils 1 und 2 μ L aufgetragen. Die Stromstärke zur Trennung betrug konstant 20 mA.

Proteinstandard (Precision Plus Protein Unstained Standard, Biorad, München)

Molekulargewichte:



5.12.7.2 Silberfärbung

Für die Silberfärbung (modifiziert nach Blum et al., 1987) wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung I:	50%	Methanol
	12%	Essigsäure
	0,5 mL L ⁻¹	Formaldehyd (37%)
Lösung II:	30%	Ethanol
Lösung III:	0,2 g L ⁻¹	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
Lösung IV:	2 g L ⁻¹	AgNO ₃
	0,75 mL L ⁻¹	Formaldehyd (37%)
Lösung V:	60 g L ⁻¹	Na ₂ CO ₃
	0,5 mL L ⁻¹	Formaldehyd (37%)
	10 mg L ⁻¹	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
Lösung VI:	10%	Methanol
	12%	Essigsäure

Lösung III - V sind jeweils frisch herzustellen.

Durchführung

1. Gel 20 min in Lösung I fixieren
2. Zweimal 10 min in Lösung II waschen
3. 1 min in Lösung III inkubieren
4. Dreimal 20 s in E-Pure-Wasser waschen
5. Gel 20 min in Lösung IV imprägnieren
6. Zweimal 20 s in E-Pure-Wasser waschen
7. Entwicklung des Gels in Lösung V bis Proteinbanden gut sichtbar sind
8. Färbung abrechen durch Inkubation in Lösung VI für 10 min
9. Mit E-Pure-Wasser zweimal 5 min waschen

5.13 Isolierung von Carotinoiden

Die Isolierung der nicht kommerziell erhältlichen Substrate erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Veddeler (2004).

5.13.1 Extraktionen

5.13.1.1 Spinat

250 g Spinat wurden mit 250 mL Aceton / gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung im Verhältnis 4:1 im Mixer (GT 800, Fa. Rotor AG, Berlin) 5 min zerkleinert. Der feste Rückstand wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und zweimal bis zur fast vollständigen Entfärbung mit 250 mL des Aceton / NaHCO₃-Gemisches extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (500 mbar, 40 °C) entfernt. Der wässrige Rückstand wurde unter Zugabe von Natriumchlorid dreimal mit je 100 mL peroxidfreiem Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (900 mbar, 40 °C) weitgehend entfernt. Reste des Lösungsmittels wurden mit Stickstoff abgeblasen. Der enthaltene Spinatextrakt wurde unter Stickstoff bei -18 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt.

5.13.1.2 Gewinnung von Lutein aus *Tagetes sp.* (Oleoresin)

10 g der Luteinester wurden in einen Rundkolben eingewogen und mit 50 mL Diethylether versetzt. Nach Zugabe von 10%iger methanolischer KOH-Lösung wurde über Nacht verseift. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser versetzt und extrahiert, bis die Lösung neutral reagierte. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Reste des Lösungsmittels wurden unter Stickstoffstrom entfernt. Die vollständige Esterhydrolyse wurde mittels HPLC (5.8.5.1) überprüft. Der Luteinextrakt wurde bei -18 °C für die weitere Verwendung unter Stickstoff aufbewahrt.

5.13.2 Isolierung von Carotinoiden mittels semipräparativer HPLC

5.13.2.1 Isolierung von Neoxanthin und Violaxanthin

250 mg des nach 5.13.1.1 hergestellten Spinatextraktes wurden in 20 mL Methanol gelöst und zur Abtrennung von nicht gelösten Bestandteilen filtriert (Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). 2 mL dieser Lösung wurden in die semipräparative HPLC (5.8.5.2) injiziert. Die Fraktionen von 6 Läufen wurden vereint und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (200 mbar, 40 °C) eingeeengt. Die Lösungsmittelreste wurden mit Stickstoff abgeblasen, und der Extrakt für die weitere Verwendung bei -18 °C unter Stickstoff gelagert.

5.13.3 Identifizierung und Quantifizierung der eingesetzten Carotinoide

5.13.3.1 UV/VIS-Spektrometrie

Für die Identifizierung der Carotinoide wurden die jeweiligen Substanzen in 1 mL des in der Literatur (Britton et al., 1995) für die spektralphotometrische Identifizierung angegebenen Lösungsmittels gelöst. Von dem jeweiligen Carotinoid wurde ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 350 - 700 nm aufgenommen.

Für die Quantifizierung der Carotinoide wurde das entsprechende Carotinoid in dem für die spektralphotometrische Quantifizierung angegebenen Lösungsmittel aufgenommen. Die Ausbeuten von Neoxanthin und Violaxanthin aus Spinat (siehe 2.3.1.1) wurden mit den Werten der Literatur verglichen und stimmen gut überein (Müller, 1997; Kidmose et al., 2001). Die Extinktion der Probelösung wurde bei der in der Literatur angegebenen Wellenlänge gemessen (**Tab. 5-24**).

Tab. 5-24 Lösungsmittel, Wellenlängen und molare Extinktionskoeffizienten für die spektralphotometrische Quantifizierung der Carotinoide (Britton et al., 1995)

Carotinoid	Lösungsmittel	λ [nm]	ϵ_{mol} [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Lutein	Ethanol	445	144.800
Lycopin	Petrolether	470	184.900
Neoxanthin	Ethanol	438	148.200
Violaxanthin	Ethanol	440	153.000
Zeaxanthin	Ethanol	450	140.900

Die Konzentration c berechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = \frac{E}{d \cdot \varepsilon} \quad [\text{mol L}^{-1}]$$

- E = Extinktion der Probelösung
 d = Schichtdicke der Küvette [1 cm]
 ε = molarer Extinktionskoeffizient des jeweiligen Carotinoids in
entsprechendem Lösungsmittel [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

5.14 Umsetzung der Carotinoide

5.14.1 Herstellung der Carotinoidlösungen

Die Herstellung der jeweiligen wässrigen Carotinoidlösung erfolgte nach photometrischer Quantifizierung beim entsprechenden Absorptionsmaximum des jeweiligen Carotinoids (ca. $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) im verwendeten Lösungsmittel (siehe **Tab. 5-24**). Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff entfernt und der Rückstand mit 0,5% (m/v) Tween 80 und 10 mL Dichlormethan versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach (5.12.1.1). Die emulgierten Lösungen wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung zur Umsetzung eingesetzt.

5.14.2 Umsetzung mit konzentriertem Kulturüberstand vom *Marasmius scorodonius*

Zur Umsetzung wurden die mittels Bioreaktor (5.4.2.7) produzierten und mittels Vivaflow 200 (5.12.2) konzentrierten Kulturüberstände eingesetzt, deren Aktivität nach (5.12.1.3) bestimmt wurde. Pro Ansatz wurde eine Enzymmenge mit einer Aktivität von 12 mU verwendet (je nach Aktivität zwischen 1,8 und 3,9 mL). Die Enzymlösung wurde in 50 mL-Erlenmeyerkolben zusammen mit der jeweiligen Carotinoidlösung gegeben und mit Puffer (50 mM NaAc, pH 5) auf ein Volumen von 15 mL aufgefüllt. Die Gefäße wurden mit perforierter Alufolie abgedeckt und bei 27 °C und 150 rpm für 60 min umgesetzt. Es wurde jeweils ein Kontrollwert mit deaktivierter Enzymlösung (100 °C; 20 min) mitgeführt. Die Aktivität des verwendeten Enzymüberstandes wurde mit einer β,β -Carotinlösung überprüft.

5.14.3 Umsetzung der aufgereinigten Enzymfraktionen MSP1 und MSP2

Die Umsetzung der aufgereinigten Enzymfraktionen erfolgte mit ca. 300 µg β,β -Carotin in 15 mL 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 3,5. Die Umsetzung erfolgte für 2 Stunden. Den Proben wurden 5 µL 20 mM H_2O_2 - Lösung als Cosubstrat hinzugefügt. Parallel wurde ein Kontrollwert ohne Enzymlösung mitgeführt.

5.14.4 Umsetzung von β,β -Carotin mit Triton X 100 anstelle von Tween 80

Die Herstellung erfolgte nach (5.12.1.1) unter Verwendung von Triton X-100 als Emulgator. Die Umsetzung erfolgte analog 5.14.2 unter Verwendung von 3 mL β,β -Carotin-Lösung. Die Probenaufarbeitung erfolgte nach 5.14.5.

5.14.5 Produktisolierung mittels C_{18} -Festphasen-Mikroextraktion

Für die Produktisolierung wurden mit 1 g C_{18} -Material gefüllte Säulen (Chromabond C18, 730-005.250, Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Säulen wurden nach Herstellervorschrift mit 2 mL Methanol konditioniert und anschließend mit 5 mL Wasser für die wässrige Probe vorbereitet. Die zu extrahierenden Probelösungen wurden vollständig auf je eine Säule aufgegeben. Die Säule wurde anschließend mit 3 x 5 mL Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Zur Entfernung eventuell noch vorhandener Wasserreste wurde zunächst mit 200 µL Methanol und anschließend mit 5 mL Pentan / Diethylether (1:1,12) eluiert. Das Eluat wurde zur Entfernung von Wasserresten mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Zugabe von 20 µL des Standards α -Terpineol (1,42 mM; 21,8 mg 100 mL⁻¹) wurde die Lösung mittels Vigreux-Kolonnen auf ein Volumen von 200 µL eingeeengt. Die Analytik erfolgte mittels GC-FID, GC-MS, HPLC-DAD und HPLC-MS.

5.14.6 Bestimmung von wässrigen Extinktionskoeffizienten

Zur direkten Quantifizierung des Abbaus wurden für die jeweiligen Verbindungen Extinktionskoeffizienten in wässriger Lösung bestimmt. Dazu wurde eine wässrige emulgierte Lösung mit dem jeweiligen Substrat (nach 5.12.1.1) in unterschiedlicher Konzentration photometrisch am zuvor bestimmten Absorptionsmaximum gemessen und die erhaltene Extinktion graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Über einen Standard wurde der tatsächliche Gehalt mittels HPLC (5.8.5.1) über Referenzstandards quantifiziert und so der molare Extinktionskoeffizient bestimmt.

5.14.7 Quantifizierung des Abbaus mittels UV-VIS-Spektroskopie

Die Messung erfolgte zu Beginn und am Ende des Experimentes direkt aus der wässrigen Lösung. Hierzu wurden 200 μL Probelösung zu 1,4 mL NaAc-Puffer (0,05 M; pH 5) gegeben und die Lösung beim jeweiligen Absorptionsmaximum gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über den zuvor berechneten Extinktionskoeffizienten. (5.13.4.1)

Für Neoxanthin und Violaxanthin erfolgte die Quantifizierung über HPLC (5.8.5.1), da aufgrund der geringen Mengen keine Extinktionskoeffizienten in wässriger Lösung bestimmt werden konnten. Die photometrische Messung wurde hier bei 450 nm durchgeführt.

5.14.8 Quantifizierung des Abbaus mittels HPLC

Die Probelösung wurde nach 5.14.5 extrahiert und auf ein Volumen von ca. 200 μL konzentriert. 20 μL hiervon wurden mittels HPLC analysiert. Die Quantifizierung erfolgte soweit vorhanden über Messung externer Standardsubstanzen. Für β,β -Carotin und Lutein wurde eine Kalibrierreihe aufgenommen. Alle anderen Verbindungen wurden über eine Einpunktkalibrierung quantifiziert.

5.14.9 Probenreinigung zur Identifizierung nicht-flüchtiger Produkte mittels HPLC-MS

Die konzentrierten Probenextrakte aus 5.14.5 wurden nach 5.8.3 gereinigt, und die erhaltenen Fraktionen mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchungen (DC-Alufolien F254, Merck, Fließmittel: Pentan/Diethylether 1:1,12) auf das Vorhandensein von Spaltprodukten untersucht. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt wurden mittels HPLC - MS (5.8.5.3) untersucht.

5.15 Entsorgungshinweise

Biologisches Material

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 40 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 die weitgehende Wiederverwendung destillativ gereingter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenierter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet, oder nur die unbedingt nötigen Mengen benutzt. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

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

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

6 Anhang

6.1 Massenspektren aus der Biotransformation von Farnesen mit *A. niger*

BH55KG5+6#1476-1479 RT: 26.60-26.65 AV: 4 SB: 23 26.42-26.55, 26.69-26.90 NL: 4.89E4
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [33.00-300.00]

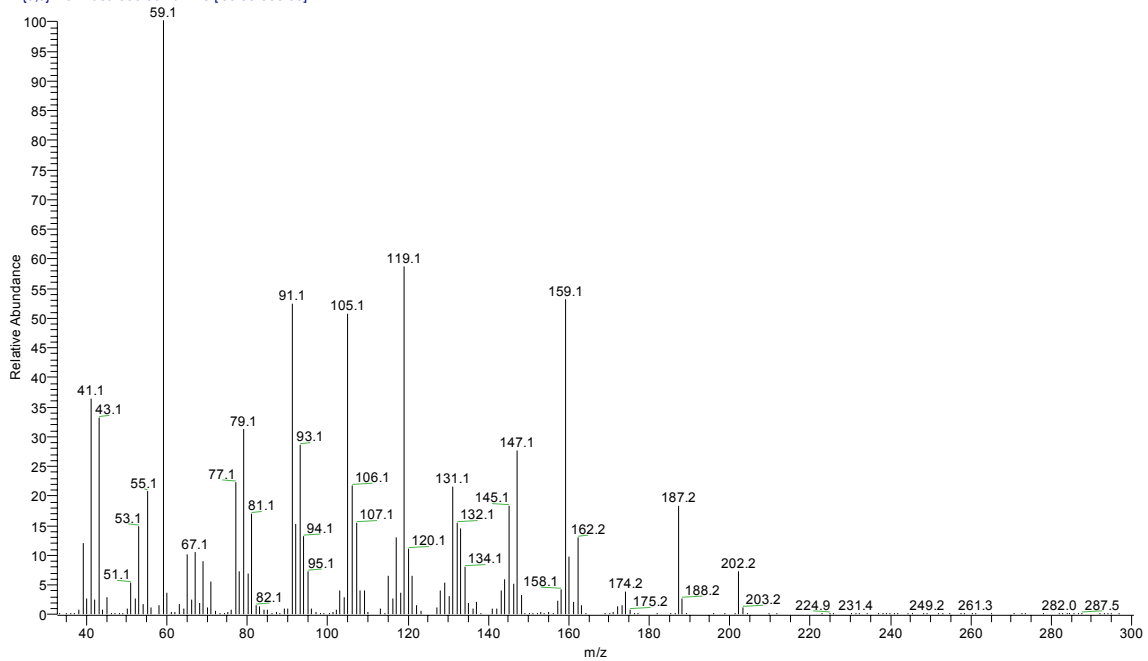


Abb. 6-1 Massenspektrum der Verbindung [1a]

BH55KG5+6#1525-1530 RT: 27.42-27.50 AV: 6 SB: 57 26.99-27.35, 27.60-28.15 NL: 1.58E5
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [33.00-300.00]

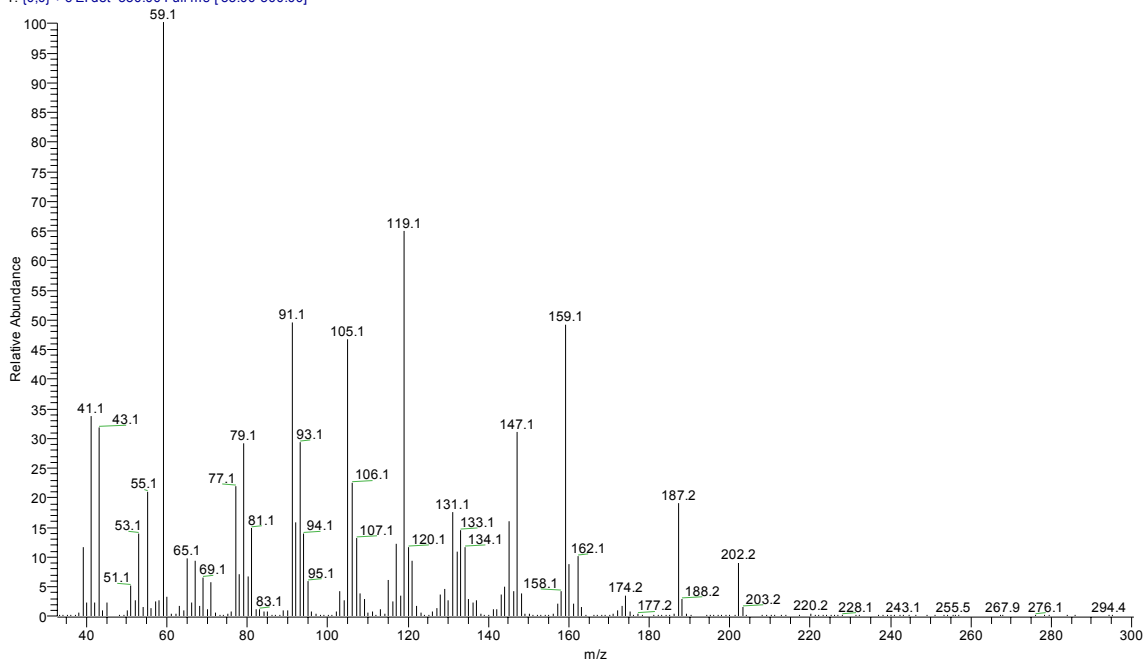


Abb. 6-2 Massenspektrum der Verbindung [1b]

BH55KG5+6#1745-1749 RT: 31.09-31.15 AV: 5 SB: 62 30.35-31.04, 31.20-31.52 NL: 9.50E4
T: (0,0) + c EI det=350.00 Full ms [33.00-300.00]

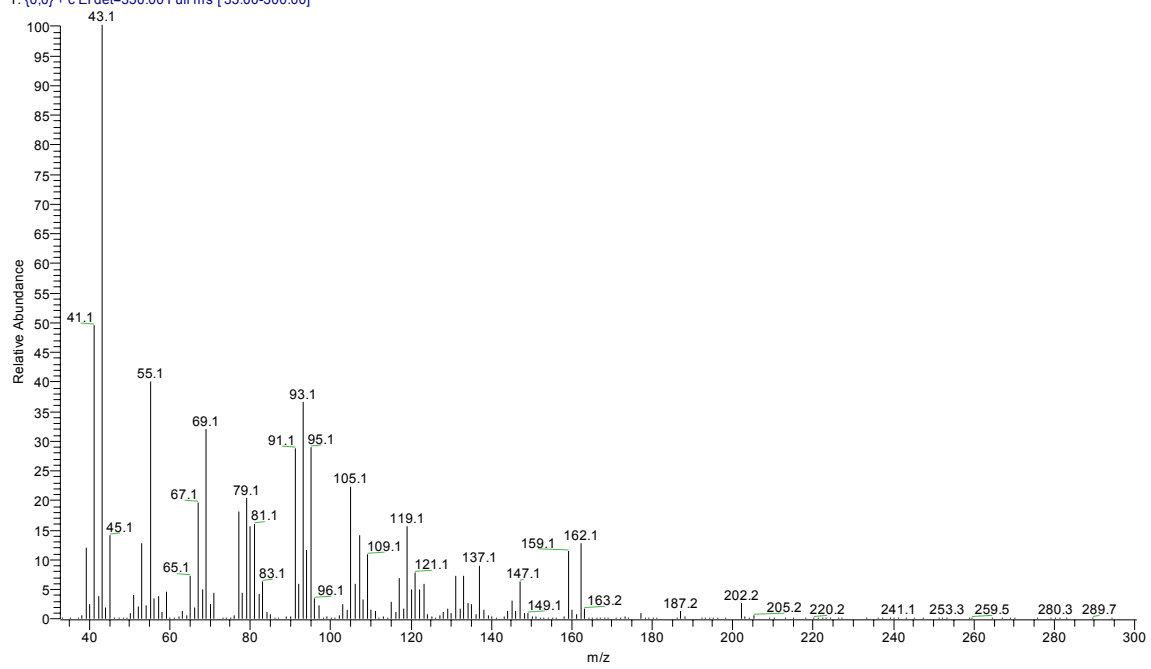


Abb. 6-3 Massenspektrum von 3-(Z)-7-Hydroxyfarnesen

6.2 UV/Vis-Absorptionsspektren der Spaltprodukte des β,β -Carotins

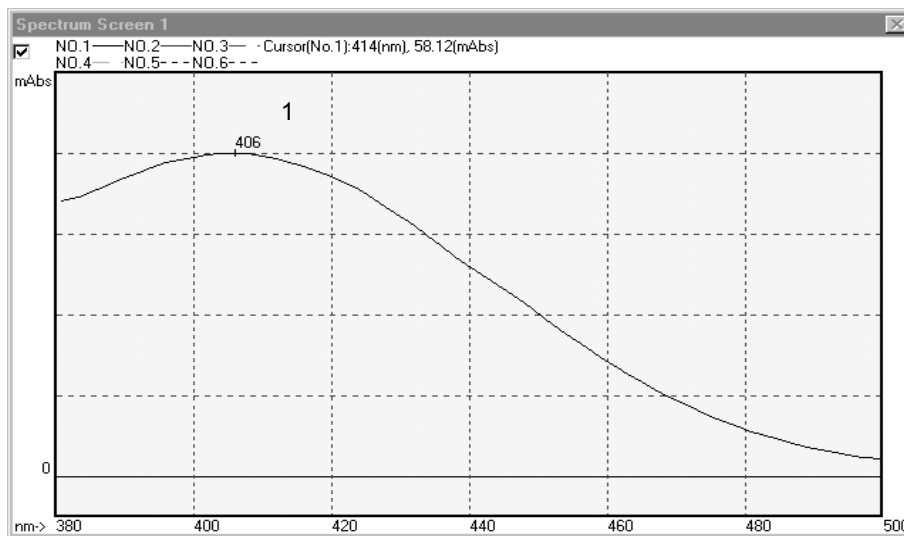


Abb. 6-4 UV-Vis-Spektrum von β -Apo-14'-carotinal (21,32 min) in Acetonitril (100%)

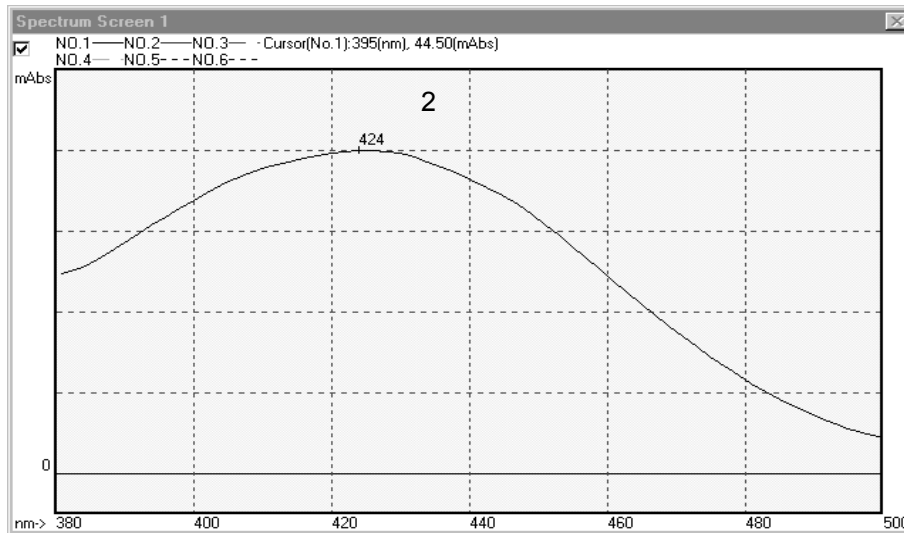


Abb. 6-5 UV-Vis-Spektrum von β -Apo-12'-carotinal (23,54 min) in Acetonitril (100%)

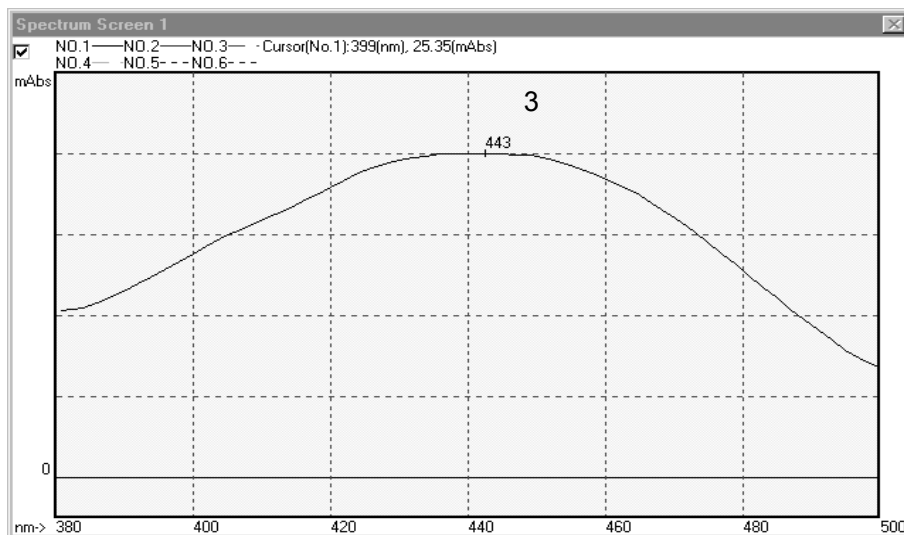


Abb. 6-6 UV-Vis-Spektrum des β -Apo-10'-carotinals (24,39 min) in Acetonitril (100%)

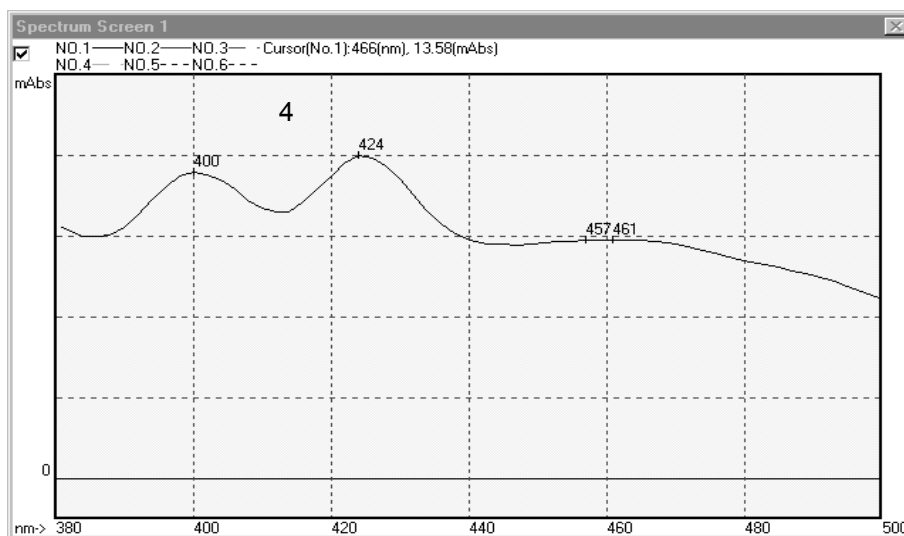


Abb. 6-7 UV-Vis-Spektrum der unbekanntes Verbindung 4 (26,13 min) in Acetonitril (100%)

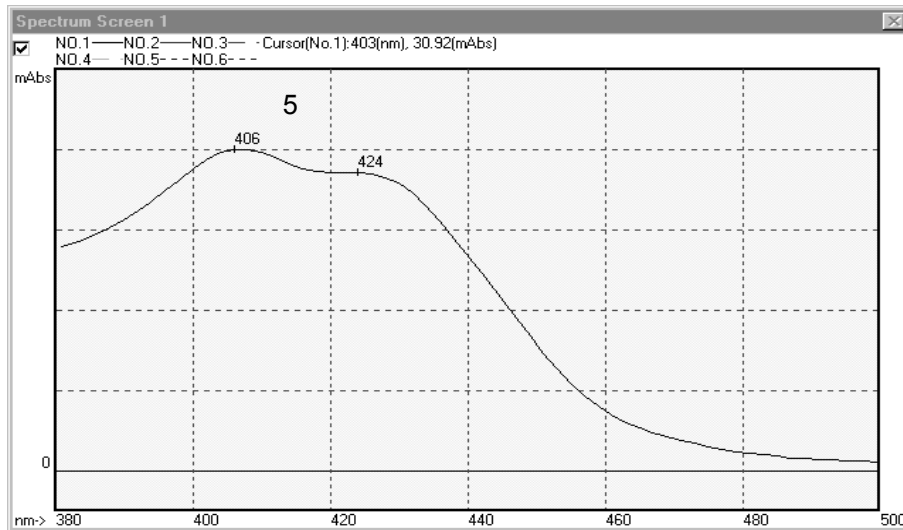


Abb. 6-8 UV-Vis-Spektrum des postulierten β -Carotin-5,8-epoxids (32,99 min) in Acetonitril (100%)

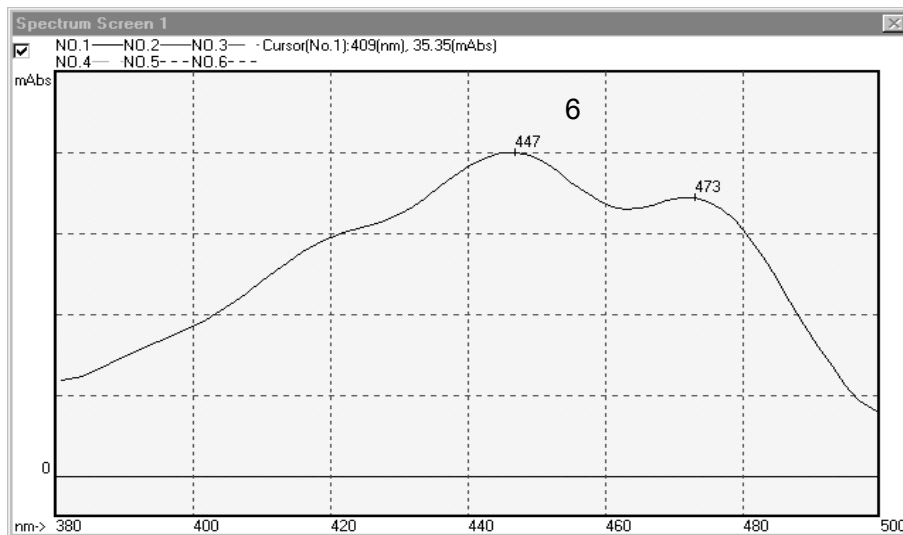


Abb. 6-9 UV-Vis-Spektrum des β -Carotin-5,6-epoxids in Acetonitril (100%)

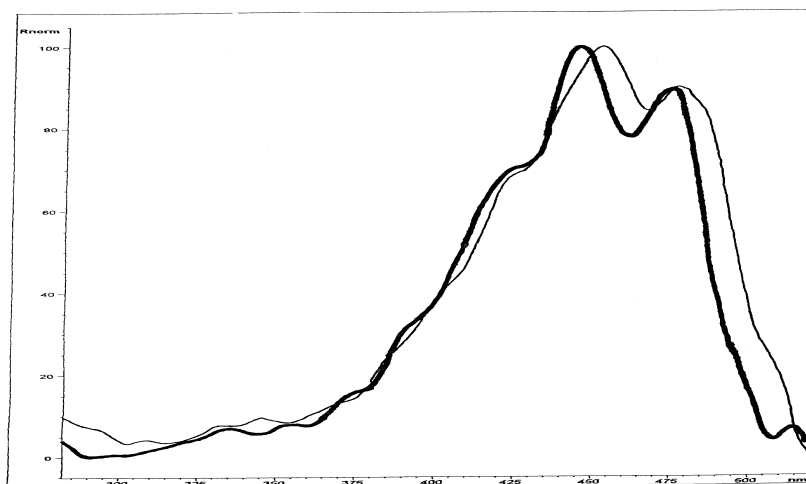


Abb. 6-10 UV-Vis-Spektrum von β -Carotin-5,6-epoxid (dicke schwarze Linie) im Vergleich zu β,β -Carotin (Caris-Veyrat et al., 2001)

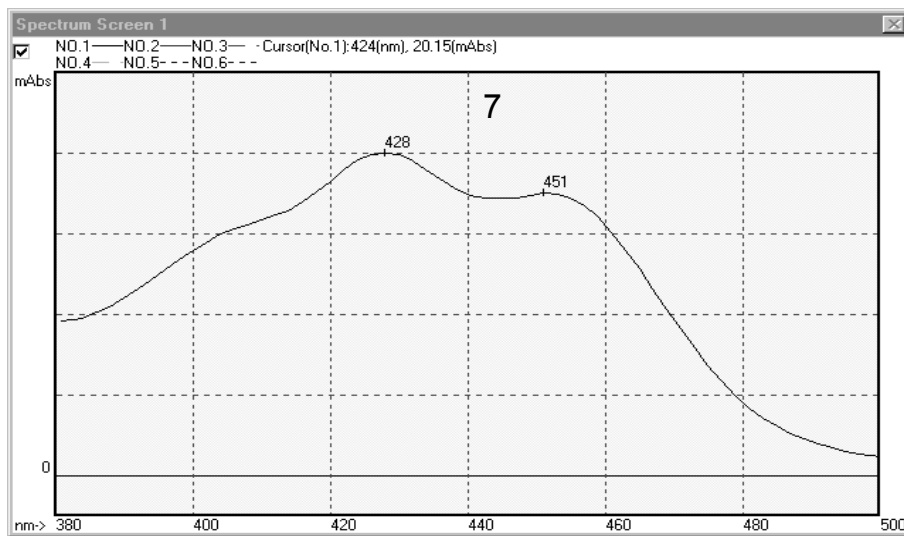


Abb. 6-11 UV-Vis-Spektrum der unbekanntes Verbindung 7

7 Literaturverzeichnis

1. Abraham WR, Arfmann HA, Giersch W (1992) Microbial Hydroxylation of Precursors of Sinensal. *Z Naturforsch* 47c:851-858
2. Adam W, Lazarus M, Saha-Möller CR, Weichold O, Hoch U, Häring D, Schreier P (1999) Biotransformations with Peroxidases. In Scheper T (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Vol. 63, Springer-Verlag Berlin, S. 73-108
3. Agrawal R, Deepika NU, Joseph R (1999) Strain Improvement of *Aspergillus Sp.* and *Penicillium Sp.* by Induced Mutarotation for Biotransformation of α -Pinene to Verbenol. *Biotechnol Bioeng* 64:249-252
4. Agrawal R, Joseph R (2000a) Optimization of conditions for the biotransformation of α -pinene to verbenone by a *penicillium sp.*
5. Agrawal R, Joseph R (2000 b) Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Chem* 53:335-337
6. Anet EFLJ (1969) Autoxidation of α -Farnesene. *Aust J Chem* 22:2403-2410
7. Anet EFLJ (1972) Superficial scald, a functional disorder of stored apples. VIII. Volatile products from the autoxidation of α -farnesene. *J Sci Food Agric* 23:605-608
8. Arfmann HA, Abraham WA, Kieslich K (1988) Microbial ω -hydroxylation of (*E*)-nerodiol and structurally related sesquiterpenoids. *Biocatalysis* 2:59-67
9. Aromenverordnung vom 02.05.2006 (BGBl. I S. 1127)
10. Aubert C, Ambid C, Baumes R, Günata Z (2003) Investigation of Bound Aroma Constituents of Yellow-Fleshed Nectarines (*Prunus persica* L. Cv. Springbright). Changes in Bound Aroma Profile during Maturation. *J Agric Food Chem* 51:6280-6286
11. Barrero JM, Piquas P, Gonzales-Guzman M, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* 56:2071-2083
12. Bauer K, Garbe D, Surburg H (2001) *Common Fragrance and Flavor Materials*. Fourth Edition, Wiley-VCH Weinheim p. 216
13. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2001) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag Berlin
14. Bell SG, Chen X, Sowden RJ, Xu F, Williams JN, Wong LL, Rao Z (2003) Molecular Recognition in (+)- α -Pinene Oxidation by Cytochrome P450_{cam}. *J Am Chem Soc* 125:705-714

15. Bellussi L, Macmi G, Bucella MG, Cacchi R (1990) Evaluation of the efficacy and safety of sobrerol granules in patients suffering from chronic rhinosinusitis. *J Int Med Res* 8:454-459
16. Berger RG, Krings U, Zorn H (2002) Biotechnological flavour generation. In Taylor AJ (Ed.) *Food Flavour Technology*, Sheffield Academic Press Ltd Sheffield, UK, chapter 3, p. 60-104
17. Berger RG, Zorn H (2004) Flavors and Fragrances. In Tkacz JS, Lange L (Eds.) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York p. 341-358
18. Bezman Y, Bilkis I, Winterhalter P, Fleischmann P, Rouseff RL, Baldermann S, Naim M (2005) Thermal Oxidation of 9'-*(Z)*-Neoxanthin in a Model System Containing Peroxyacetic Acid Leads to the Potent Odorant β -Damascenone. *J Agric Food Chem* 53:9199-9206
19. Bhattacharyya P, Prema BR, Kulkarni BD, Pradhan SK (1960) Microbial transformation of terpenes: hydroxylation of α -pinene. *Nature* 187:689-690
20. Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
21. Bohlmann F, Zdero C, King RM, Robinson H (1984) Phenylethylamides from *Critoniella acuminata*. *Planta medica* 50:187-188
22. Bonnländer B (2002) Isolierung, Charakterisierung und Synthese von Aromavorläufern aus Wein, Dillkraut und Lindenblüten. Dissertation Technische Universität Carlo-Wilhemina Braunschweig
23. Bosser A, Paplorey E, Belin JM (1995) A simple way to (\pm)-Dihydroactinidiolide from β -ionone Related to the Enzymatic Co-oxidation of β -Carotene in Aqueous Solution. *Biotechnol Prog* 11:689-692
24. Bouvier F, Dogbo O, Camera B (2003b) Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto) *Science* 300:2089-2091
25. Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camera B (2003) Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids Identification of the Carotenoid Dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* Genes Involved in Crocus Secondary Metabolite Biogenesis. *The Plant Cell* 15:47-62
26. Bouws H (2007) Dissertation in Vorbereitung
27. Bouws H, Berger RG, Zorn H (2006) Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Pleurotus sapidus* zur biotechnologischen Oxyfunktionalisierung von α -Pinen. *Lebensmittelchemie* 60:64
28. Brauer B (2004) Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen. Dissertation Universität Hannover

29. Breitmeier E (2005) Terpene, Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone. 2. vollst. überarb. und erw. Aufl. Wiley-VCH Weinheim
30. Britton G (1995) UV/VIS spectroscopy. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Eds.) Carotenoids-Volume 1b: spectroscopy. Kap. 2 S.13-62 Birkhäuser Verlag Basel
31. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1998) Carotenoids Volume 3, Biosynthesis and Metabolism. Birkhäuser Verlag Basel
32. Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. Plant J 17:427-431
33. Busmann D (1994) Oxyfunktionalisierung und Katabolyse von Terpen-Kohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten. Dissertation Universität Hannover
34. Busmann D, Berger RG (1994) Oxyfunctionalization of α - and β -pinene by selected basidiomycetes. Z Naturforsch C: Biosci 49c:545-552
35. Buttery RG, Teranishi R, Ling LC Turnbaugh JG (1990) Quantitative and Sensory Studies on Tomato Paste Volatiles. J Agric Food Chem 38:336-340
36. Caris-Veyrat C, Amiot MJ, Ramasseul R, Marchon JC (2001) Mild oxidative cleavage of β,β -carotene by dioxygen induced by a ruthenium porphyrin catalyst: characterization of products and of some possible intermediates. New J Chem 25:203-206
37. Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M, Böhm V (2003) Cleavage Products of Lycopene Produced by in Vitro Oxidations: Characterization and Mechanisms of Formation. J Agric Food Chem 51:7318-7325
38. de Carvalho CCCR, da Fonseca MR (2006) Biotransformations of terpenes. Biotechnol Adv 24:134-142
39. Chernys JT, Zeevaart JAD (2000) Characterization of the 9-*cis*-Epoxy-carotenoid Dioxygenase Gene family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado. Plant Physiol 124:343-354
40. Choi WJ, Lee EY, Cho MH, Choi YC (1997) Enhanced production of *cis, cis* muconate in a cell-recycle bioreactor. J Ferment Bioeng 84:70-76
41. Christoph N (1983) Die Anwendung der gaschromatographischen Sniffing-Technik zur Bestimmung von Geruchsschwellen und Aromawerten. Dissertation Technische Universität München
42. Clark BC, Chamblee TS (1992) Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavours. Charalambous G (Ed) Off-flavors in foods and beverages, Elsevier Science Publishers Amsterdam, p. 229
43. Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. J Biotechnol 93:143-158

44. Curtis AJ, Shirk MC, Fall R (1999) Allylic or Benzylic Stabilization is Essential for Catalysis by Bacterial Benzyl Alcohol Dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun* 259:220-223
45. Davis EM, Croteau R (2000) Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. In *Topics in Current Chemistry*. Volume 209, Springer-Verlag Berlin
46. Divyashree MS, George J, Agrawal R (2006) Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *J Food Sci Tech Mys* 43:73-76
47. Duque C, Osorio C, Morales A (2002) C13-Norisoprenoids in the aroma of Columbian tropical fruits. In: Winterhalter P Rouseff RL (Eds.) *Carotenoid-derived aroma compounds*. ACS Symp. Ser. Vol. 802, American Chemical Society Washington DC, Kap.14: S.194-205
48. Farooq A, Tahara S, Choudhary I, Rahman A, Ahmed Z, Başar KHC, Demirci F (2002) Biotransformation of (-)- α -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Z Naturforsch* 57(c):303-306
49. Fielder S, Rowan DD, Sherburn MS (1998) Synthesis of Sesquiterpene Polyene Hydroperoxides By Regio- And Stereoselective Transportation Reactions. *Tetrahedron* 54:12907-12922
50. Fleischmann P Watanabe N Winterhalter P (2003) Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry* 63:131-137
51. Fleischmann P, Studer K Winterhalter P (2002) Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from the quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J Agric Food Chem* 50:1677-1680
52. Gandolfi R, Gualandris R, Zanchi C, Molinari F (2001) Resolution of (RS)-2-phenylpropanoic acid by enantioselective esterification with dry microbial cells in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetr* 12:501-504
53. Gillooly DJ, Fewson CA (1998) Production of a perillyl alcohol dehydrogenase by site-directed mutagenesis of a benzyl alcohol dehydrogenase. *Biotechnol Lett* 20:325-327
54. Glenn JK, Akileswaran L, Gold MH (1986) Mn(II) Oxidation is the Principal Function of the Extracellular Mn-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 251:688-696
55. Gold MH, Alic M (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrytosporium*. *Microbiol Rev* 57:605-622
56. Goodwin TW (1974) Biogenesis of Terpenes and Steroids. In Ansell MF (Ed.) *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds 11c Supplement*, Elsevier, Amsterdam
57. Griffiths ET, Bociek SM, Harries PC, Jeffcoat R, Sissons DJ, Trudgill PW (1987a) Bacterial metabolism of α -pinene - pathway from α -pinene oxid to acyclic metabolites in *Nocardia* strain p18.3. *J. Bacteriol* 169:4972-4979

58. Griffiths ET, Harries PC, Jeffcoat R, Trudgill PW (1987b) Purification and properties of α -pinene oxide - lyase from *Nocardia* sp. Strain P18.3. *J Bacteriol* 169:4980-4983
59. Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 209:603-611
60. Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ, Evans CS (1994) Hydrogen-peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:465-470
61. Gutiérrez A, Caramelo L, Prieto A, Martínez MJ, Martínez AT (1994) Anisaldehyde Production and Aryl-Alcohol Oxidase and Dehydrogenase Activities in Ligninolytic Fungi of the Genus *Pleurotus*. *Appl Environ Microbiol* 60:1783-1788
62. Harvey PJ, Schoemaker HE, Palmer JM (1986) Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 195:242-246
63. Hesse M, Meier H, Zeeh B *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart (2005)
64. Hrdlicka PJ, Sørensen AB, Poulsen BR, Ruijter GJG, Visser J, Iversen JJJ (2004) Characterization of Nerodiol Biotransformation Based on Indirect On-Line Estimation of Biomass Concentration and Physiological State in batch Cultures of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Prog* 20:368-376
65. Hülsdau B (2007) Dissertation in Vorbereitung
66. Ichinose H, Wariishi H, Hanaka H (2002a) Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:658-664
67. Ichinose H, Wariishi H, Hanaka H (2002b) Identification of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete, *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:97-105
68. Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-(Z)-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27:325-333
69. Johjima T, Ohkuma M, Kudo T (2003) Isolation and cDNA cloning of a novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:220-225
70. Jüttner F, Höflacher B (1985) Evidence of β -carotene 7,8 (7',8') oxygenase (β -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. *Arch Microbiol* 141:337-343

71. Kanakis CD, Daferera DJ, Tarantilis PA Polissiou MG (2004) Qualitative Determination of Volatile Compounds and Quantitative Evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *J Agric Food Chem* 52:4515-4521
72. Kanasawud P, Crouzet JC (1990) Mechanism of Formation of volatile Compounds by Thermal Degradation of Carotenoids in Aqueous Medium. 2. Lycopene Degradation *J Agric Food Chem* 38:1238-1242
73. Kaspera R (2004) Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse. Dissertation Universität Hannover
74. Kaspera R, Krings U, Pescheck M, Sell D, Schrader J, Berger RG (2005) Regio- and stereoselektive fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Z Naturforsch* 60c:459-466
75. Kato-Noguchi H, Kosemura S, Yamamura S, Hasegawa K (1993) A growth inhibitor, *R*-(-)-3-Hydroxy- β -Ionone, from light-grown shoots of a dwarf cultivar of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 33:553-555
76. Kidmose U, Knuthsen P, Edelebos M, Justensen U, Hegelund E (2001) Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes after deep frozen storage *J Sci Food Agric* 81:918-923
77. Kiefer C, Hessel S, Lampert JM Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, von Lintig J (2001) Identification and Characterization of a Mammalian Enzyme Catalysing the Asymmetric Oxidative Cleavage of Provitamin A. *J Biol Chem* 276:14110-14116
78. Kim SJ, Shoda M (1999) Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Appl Environ Microbiol* 65:1029-1035
79. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weis N, Weingand H (1988) Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests. In Schreier P (Ed.) *Bioflavour '87*, Walter de Gruyter Berlin, S. 287-299
80. Kodjoyan N, Bergague JL A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. Edition du Laboratoire Flaveur (1996)
81. Krings U, Brauer B, Kaspera R, Berger RG (2005) Biotransformation of α -terpinene using *Stemphylium botryosum* (Wallroth) yields *p*-mentha-1,4-dien-9-ol, a novel odorous monoterpenol. *Biocatal Biotransfor* 23:457-463
82. Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:1-8
83. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
84. Langhoff S (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Hannover

85. Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG (2005) Identification of volatile compounds in basil (*Ocimum basilicum* L.) and in thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 91:131-137
86. Leuenberger MG, Engeloch-Jarret C, Woggon WD (2001) The Reaction Mechanism of the Enzyme-Catalysed Central Cleavage of β -Carotene to Retinal. *Angew Chem Int Ed* 40:2613-2617
87. Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Ibdah M, Meir A, Yosef E, Zamir D, Tadmor N (2005) Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science & Technology* 16:407-415
88. Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400:271-274
89. Lindquist A, Andersson S (2002) Biochemical Properties of Purified Recombinant Human β -Carotene-15,15'-Monooxygenase. *J Biol Chem* 277:23942-23948
90. Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger RG, Zorn H (2005a) Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. *J Agric Food Chem* 53:9498-9505
91. Linke D, Zorn H, Gerken B, Parlar H, Berger RG (2005b) Foam fractionation of Exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). *Lipids* 40:323-327
92. Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* 22:503-513
93. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
94. Luckner M (1990) Secondary metabolism in plants and animals. 3. revised and enlarged Ed. Springer-Verlag Berlin
95. Lutz-Wahl S (1999) Selektive Hydroxylierung von α - und β -Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* TÜ 27. Dissertation Universität Stuttgart
96. Madyastha KM, Gururaja TL (1993) Utility of microbes in organic synthesis: Selective transformations of acyclic isoprenoids by *Aspergillus niger*. *Indian J Chem* 32(B):609-614
97. Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutierréz A, del Río JC (2005) Biodegradation of lignocellulose: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195-204

98. Mathieu S, Terrier N, Procureur J, Bigey Z (2005) A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C₁₃-norisoprenoid accumulation. *J Exp Bot* 56:2721-2731
99. Moore RN, Golumbic C, Fisher GS (1956) Autoxidation of α -pinene. *J Amer Chem Soc* 78:1173-1176
100. Mordí RC (1993) Carotenoids: Functions and degradation. *Chem Ind* 3:79-83
101. Mordí RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA (1991) Exploratory Study of β -Carotene Autoxidation. *Tetrahedron Lett* 32:4203-4206
102. Müller H (1997) Determination of carotenoid content in vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204:88-94
103. Oddou J, Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Asther M, Ceccaldi BC (1999) Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:1-6
104. Ohloff G (1994) Scent and fragrances, Springer Verlag, Berlin
105. Ohloff G Riechstoffe und Geruchssinn - Die molekulare Welt der Düfte. Springer Verlag Berlin (1990)
106. Onken J (1998) Biotechnologie lipophiler Substrate in wässrigen Systemen: Terpententransformation durch Basidiomyceten als Modell. Dissertation Universität Hannover
107. Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez ÁT (2005) Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-range Electron Transfer Pathways. *J Mol Biol* 354:385-402
108. Peters T Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten, Dissertation Universität Hannover, 2004
109. Peterson GL (1979) Review of the Folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100:201-220
110. Porter JW (1981) Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. J Wiley & Sons, New York
111. Prema BR, Bhattacharyya PK (1962) Microbial Transformation of Terpenes - Transformation of α -Pinene. *Appl Microbiol* 10:525-528
112. Raulais D (1963) Structure of humbertiol, a new sesquiterpene isolated from the wood of *Humbertia madagascariensis*. *Compt Rend* 256:3369-3371
113. Raulais D, Billet D, Mentzer C (1962) A new sesquiterpene isolated from the wood of *Humbertia madagascariensis*. *Compt Rend* 254:2819-2821

114. Raulais D, Billet D, Mentzer C (1964) A new Sesquiterpene from *Humbertia madagascariensis* wood. I. Partial structure. B Soc Chim Fr 9:2323-2328
115. Rinne S (2007) Dissertation in Vorbereitung
116. Römpp-Online, www.roempp.com, Version 2.10 vom 31.März 2006
117. Ruch S, Beyer P, Ernst HG, Al-Babili S (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC6803. Mol Microbiol 55:1015-1024
118. Rudell DR, Mattheis JP, Fellmann JK (2005) Relationship of Superficial Scaled Development and α -Farnesene Oxidation to Reactions of Diphenylamine and Diphenylamine Derivates in Cv. Granny Smith Apple Peel. J Agric Food Chem 53:8382-8389
119. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez ÁT (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Mol Microbiol 31:223-235
120. Sachan A, Ghosh S, Mitra A (2006) Biotransformation of *p*-Coumaric acid by *Paecilomyces variotti*. Lett Appl Microbiol 42:35-41
121. Sandmann G (2001) Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application. Arch Biochem Biophys 385:4-12
122. Sato T, Hara S, Matsui T, Sasaki G, Saijo S, Ganbe T, Tanaka N, Sugano Y, Shoda M (2004) A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. Acta Cryst D 60:149-152
123. Scheibner M (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzymaktivitäten in Basidiomyceten. Dissertation Universität Hannover
124. Schieberle P, Grosch W (1989) Potent odorants from the peroxidation of lemon oil. Z Lebensm Unters Forsch 189:26-31
125. Schmidt H, Kurtzer R, Eisenreich W, Schwab W (2006) The Carotinate *ATCCD1* from *Arabidopsis thaliana* is a Dioxygenase. J Biol Chem 281:9845-9851
126. Schrader J, Berger RG (2001) Biotechnological production of terpenoid flavour and fragrance compounds. In Rehm H-J Reed G (Eds.) Biotechnology, vol. 10 Wiley-VHC-Verlag Weinheim, S.373-422
127. Schwartz SH, Qin X, Loewen MC (2004) The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates that a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. J Biol Chem 279:46940-46945
128. Schwartz SH, Qin X, Zeevaart AD (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. J Biol Chem 276:25208-25211

129. Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2003) Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiol* 131:1591-1601
130. Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR (1997) Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* 276:1872-1874
131. Simkin AJ, Schwartz SH, Auldridge M, Taylor MG, Klee HJ (2004b) The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavour volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J* 40:882-892
132. Simkin AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, Clark DG, Klee HJ (2004a) Circadian Regulation of the *PhCCCD1* Carotenoid Cleavage Dioxygenase Controls Emission of β -Ionone, a Fragrance Volatile of *Petunia* Flowers. *Plant Physiol* 136:3504-3514
133. Spicer JA, Brimble MA, Rowan DD (1993) Oxidation of α -Farnesene. *Aust J Chem* 46:1929-1939
134. Sprecher E, Hanssen HP (1982) Influence of Strain Specificity and Culture Conditions on Terpene Production by Fungi. *Planta Med* 44:41-43
135. Stiborová M, Mikšanová M, Martínek V, Frei E (2000) Heme Peroxidases: Structure, Function, Mechanism and Involvement in Activation of Carcinogens. A Review. *Collect Czech Chem Commun* 65:297-325
136. Straubinger M, Bau B, Eckstein S, Fink M, Winterhalter P (1998) Identification of Novel Glycosidic Aroma Precursors in Saffron (*Crocus sativus* L.). *J Agric Food Chem* 46:3238-3243
137. Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, Cline K, McCarty DR (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-(Z)-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35:44-56
138. Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, McCarty DR (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12235-12240
139. Taubert J, Krings U, Berger, RG (2000) A comparative study on the disintegration of filamentous fungi. *J Microbiol Meth* 42:225-232
140. Trudgill PW (1994) Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes. In Ratledge C (Ed.) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht(NL), Kap. 2; S.33-61
141. van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedialla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W (2000) The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J Sci Food Agr* 80:880-912
142. van den Brink H(J)M, van Gorcom FM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ (1998) Review Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genet Biol* 23:1-17

143. van der Werf MJ, de Bont JAM, Leak DJ (1997) Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 55:147-177
144. van Dyk MS, van Rensburg E, Moleki N (1998) Hydroxylation of (+)-limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnol Lett* 20:431-436
145. Veddeker B (2004) Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen. Dissertation Universität Hannover
146. Wahlberg I (2002) Carotenoid-derived aroma compounds in tobacco. In: Winterhalter P Rouseff RL (Eds.) Carotenoid-derived aroma compounds. ACS Symp. Ser. 802, American Chemical Society Washington DC, Kap. 10: S. 131-144
147. Watanabe M, Sasaki K, Nakashimada Y, Nishio N (1998) High density culture of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. with self-flocculated cells. *Biotechnol Lett* 20:1113-1117
148. Werkhoff P, Günert M, Krammer G, Sommer H, Kaulen J (1998) Vacuum Headspace Method in Aroma Research: Flavor Chemistry of Yellow Passion Fruits. *J Agric Food Chem* 46:1076-1093
149. Whitaker BD, Saftner RA (2000) Temperature-Dependent Autoxidation of Conjugated Trienols from Apple Peel Yields 6-methyl-5-heptene-2-one, a Volatile Implicated in Induction of Scald. *J Agric Food Chem* 48:2040-2043
150. Winterhalter P, Rouseff R (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. In: Winterhalter P, Rouseff RL (Eds.) Carotenoid-derived aroma compounds. ACS Symp. Ser. Vol. 802, American Chemical Society Washington DC, Kap.1: S.1-19
151. Winterhalter P, Schreier P (1995) The Generation of Norsioiprenoid Volatiles in Starfruit (*Averrhoa carambola* L.) – A Review. *Food Rev Int* 11:237-254
152. Wirtz GM, Bornemann C, Giger A, Müller RK, Schneider H, Schlotterbeck G, Schiefer G, Woggon WD (2001) The Substrate Specificity of β,β -carotene 15,15'-Monooxygenase. *Helv Chim Acta* 84:2301-2315
153. Woggon WD (2002) Oxidative cleavage of carotenoids catalysed by enzyme models and β -carotene-15,15'-Monooxygenase. *Pure Appl Chem* 74:1397-1408
154. Wolken WAM, Tramper J, van der Werf MJ (2002) Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*. *Biotechnol Bioeng* 80:685-690
155. Wright SJ, Caunt P, Carter D, Baker PB (1986) Microbial oxidation of α -pinene by *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:224-227
156. Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimtz M Berger RG (2003a) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavour compounds. *Biol Chem* 384: 1049-1056

157. Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimtz M, Berger RG (2003b) Cleavage of β,β -carotene to flavour compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:331-336
158. Zorn H, Neuser F, Berger RG (2004) Degradation of α -pinene oxide and [$^2\text{H}_7$]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. *J Biotechnol* 107:255-263

Photo *Marasmius scorodoni* (S.42): <http://www.in2.dk/svampe/svpic/MarScoro.jpg>

www.aromenhaus.de

www.logp.com

<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>

Lebenslauf

Björn Hardebusch

geboren am 22. Dezember 1976 in Meschede

Schulbildung

08/1987-06/1993 Realschule Eslohe
08/1993-06/1996 Gymnasium Schmallingenberg, Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

06/1996-04/1997 Grundwehrdienst
Fernmelderegiment 320 Frankenberg/Eder

Studium und Ausbildung

10/1997-10/2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Münster
unter der Leitung von Prof. Dr. H.P. Thier
Abschluss: 1. Staatsexamen

11/2001-12/2002 Berufsqualifizierendes Jahr zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Chemischen Landes- und staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Münster (CVUA) unter der Leitung von Dr. Preuss mit folgenden Tätigkeiten:
Handelslabor Alcum GmbH, Rietberg (3 Monate)
Lebensmittelüberwachungsamt Siegburg (2 Monate)
CVUA Münster (7 Monate)
Abschluss: 2. Staatsexamen

05/2003-10/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover und Beginn der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. R.G. Berger.

11/2003-06/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am obigen Institut

Berufliche Erfahrung

06/1997-08/1997 Giesler Drehtechnik GmbH, Eslohe
01/1995-02/1999 Schmallingenberger Waschstrasse GmbH
07/2000-09/2000 Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Schmallingenberg
01/2003-02/2003 Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Münster

Erklärung gemäß § 6 Absatz 1 b und c der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

Hiermit erkläre ich, Björn Hardebusch, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Björn Hardebusch