

**Biogenese von Perillen durch
Pleurotus ostreatus DSMZ 1020**

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

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Darius Hapetta

Lebensmittelchemiker

geboren am 15. Dezember 1973 in Gleiwitz

2007

Referent:	Prof. Dr. Dr. R. G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. H. Zorn
Tag der Promotion:	01.12.2006
Datum der Veröffentlichung:	Januar 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R.G. Berger angefertigt.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Berger, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas, Betreuung dieser Arbeit, Gewährleistung des Freiraums, Bereitstellung aller zur Durchführung der experimentellen Arbeiten benötigten Mittel und Geräte sowie eine gute Zusammenarbeit.

Ebenso gilt mein Dank:

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, vor allem Herrn Dr. Krings für die wissenschaftliche Beratung, Diskussionsbereitschaft und motivierende Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie für seinen originellen Sinn für Humor, der mich oft durch Tiefen und Höhen hinweggetragen hat,

der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung des Projektes,

und dem Institut für Organische Chemie, besonders Frau Körtje für die Durchführung von NMR-Messungen sowie Herrn Dr. D. Albert für die Unterstützung bei der Auswertung von Spektren.

Ein „Dankeschön“ gilt ebenfalls Herrn Björn Hardebusch, Herrn Henning Bouws und Frau Dr. Diana Linke für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Herzlich danken möchte ich auch Herrn Marco Fraaz für seine Hilfestellungen bei EDV-Problemen, Herrn Horst Deeken für die Durchführung von GC-MS-Messungen sowie Herrn Sascha Rinne für die Durchführung einiger chirospezifischer GC-Trennungen und für Hilfestellungen bei Softwareproblemen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Schwiegereltern, die mich ebenfalls hoffnungsvoll unterstützt haben.

Gewidmet meiner lieben Ehefrau

Zusammenfassung

Pleurotus ostreatus wurde in Gegenwart von β -Myrcen submers kultiviert und dabei konnten mehrere Biokonversionswege aufgeklärt werden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Bildung von Perillen, einem stark nachgefragten Aromastoff. Mehrere Biokonversionsprodukte wurden auf der Basis massenspektrometrischer Daten, Retentionsindizes (Kovats-Indizes) und NMR-Spektroskopie identifiziert: 3,10-Epoxy- β -myrcen, 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-Z-en-1,4-diol, 2-Z-(2'-Hydroxyethyliden)-6-methylhept-5-enal sowie 3- und 4-(4'-Methylpent-3'-enyl)-5H-furan-2-ol. Darüber hinaus wurden weitere Verbindungen nachgewiesen, die keine Zwischenstufen der Perillenbiogenese darstellen: 1,2- und 6,7-Epoxy- β -myrcen, 7-Methyl-3-methylenoct-6-en-1,2-diol, 6-Methyl-2-vinylhept-5-en-1,2-diol und 2-Methyl-6-methylenoct-7-en-2,3-diol als Hydrolyseprodukte der β -Myrcenepoxide sowie die Terpenfuranone 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-(5H)furan-2-on und 4-(4'-Methylpent-3'-enyl)-(5H)furan-2-on. Als weitere Biokonversionsprodukte in geringer Ausbeute wurden Ipsdienol und Ipsdienon gefunden. Unter den identifizierten Zwischenprodukten war 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-5H-furan-2-ol, ein bisher unbekannter Naturstoff. Dessen Struktur wurde mittels MS und NMR aufgeklärt.

Die Strukturen der meisten Verbindungen wurden durch direkten Vergleich mit spektroskopischen Daten synthetisierter Referenzverbindungen bestätigt. Einige Schlüsselintermediate wurden in Dosierungsversuchen als Substrate eingesetzt und deren Biokonversionswege abgeleitet. Um die chemischen Schritte von den enzymabhängigen Konversionen abzugrenzen, wurde bei jedem Dosierungsexperiment ein chemischer Kontrollversuch ohne bzw. mit inaktiviertem Mycel durchgeführt. Bei chiralen Biokonversionsprodukten wurden zu diesem Zweck Enantiomerenüberschüsse bestimmt. Neben der Identifizierung der beteiligten Metabolite wurden auch deren Bildungskinetiken ermittelt und eine umfassende Bilanzierung der Konversionen von β -Myrcen und α -Z-Acaridiol durchgeführt. Ein vollständiger Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle erlaubte dabei eine quantitative Erfassung auch intrazellulärer Stoffe.

Das β -Myrcen und die Schlüsselverbindung der Perillenbiogenese, 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-Z-en-1,4-diol, wurden zusätzlich als trideuterierte Spezies aus entsprechenden Vorstufen synthetisiert und ebenfalls als Substrate verwendet. Dadurch konnte deren Konversion zum Perillen und anderen Produkten eindeutig verfolgt werden.

Die Perillenbiogenese aus β -Myrcen mit Submerskultur von *P. ostreatus* beginnt demnach mit einer 3,10-Epoxidierung. Das 3,10-Epoxy- β -myrcen unterliegt einer Hydrolyse zum 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-Z-en-1,4-diol (1,4-Addition von Wasser), das infolge einer enzymatischen Oxidation einer seiner Hydroxylgruppen zum 3- bzw. 4-(4'-Methylpent-3'-enyl)-5H-furan-2-ol umgesetzt wird. Beide Furanole dehydratisieren unter Aromatisierung zum Perillen. Die Hydrolyse zum 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-en-1,4-diol wurde jedoch als chemischer Schritt identifiziert, welcher aus einer spontanen Ringöffnung des 3,10-Epoxids resultiert.

Ein Dosierungsversuch mit 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-Z-en-1,4-diol als Substrat führte im Rührkesselbioreaktor zur Erfassung sämtlicher Metabolite in der Gasphase, im Kulturmedium und in den Pilzzellen. Unter Verwendung einer Adsorptionssäule im Abluftraum wurde eine Perillenausbeute von nahezu 80% erreicht. Limitierende Schritte der Perillenbiogenese liegen somit in der enzymatischen Epoxidierung des β -Myrcens zum 3,10-Epoxyd und in der nachfolgenden chemischen Hydrolyse zum 3-(4'-Methylpent-3'-enyl)-but-2-Z-en-1,4-diol.

Schlagwörter: Biokonversion, Terpene, Pilze, β -Myrcen, Perillen

Abstract

Submerged cultures of the basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* were fed with β -myrcene to elucidate the bioconversion pathways. The main focus was on the formation of perillene, a sought-after flavour compound. Several intermediates of the biogenesis of perillene were identified based on mass spectrometric data, retention indices (Kovats indices) and NMR spectroscopy: 3,10-epoxy- β -myrcene, 3-(4-methylpent-3-enyl)-but-2-en-1,4-diol, 2-Z-hydroxyethyliden-6-methylhept-5-enal as well as 3- and 4-(4-methylpent-3-enyl)-5H-furan-2-ol. In addition, other compounds which are not intermediates on the route to perillene were detected. 1,2- and 6,7-epoxy- β -myrcene, 7-methyl-3-methylenoct-6-en-1,2-diol, 6-methyl-2-vinylhept-5-en-1,2-diol and 2-methyl-6-methylenoct-7-en-2,3-diol as hydrolysis products of the β -myrcen epoxides as well as the terpene furanones 3-(4-methylpent-3-enyl)-(5H)-furan-2-one and 4-(4-methylpent-3-enyl)-(5H)-furan-2-one. Both lpsdienol and lpsdienon were found in low yield as further bioconversion products. Among the identified intermediates 3-(4-methylpent-3-enyl)-5H-furan-2-ol was previously unknown as a natural compound. The structure was elucidated by MS and NMR.

The structures of most compounds were confirmed by direct comparison with the spectroscopic data of synthesised reference compounds. Some key intermediates were used in feeding experiments to derive a valid bioconversion pathway. To differentiate between chemical steps and enzyme-dependent conversions, a chemical control experiment was carried out parallel to every feeding experiment without or with inactivated mycelia. Besides the identification of the metabolites involved, their formation kinetics was also determined, and a comprehensive balance of the conversions of β -myrcene and α -Z-acaridiol was set up. An exhaustive cell disruption using a ball mill permitted the quantitative determination of intracellular substances.

β -Myrcene and the key compound of perillene biogenesis, α -Z-acaridiol, were also synthesised as D₃-labeled species from corresponding precursors and used as substrates. Their conversion to perillene and other products confirmed the proposed bioconversion unambiguously.

In summary, the biogenesis of perillene from β -myrcene in submerged culture of *P. ostreatus* started with a 3,10-epoxidation. The 3,10-epoxy- β -myrcene was opened to 3-(4-methylpent-3-enyl)-but-2-en-1,4-diol (1,4-addition of water) which was then converted to 3- or 4-(4-methylpent-3-enyl)-5H-furan-2-ol as a result of an enzymatic oxidation of one of its hydroxyl groups. Both furanols dehydrate under aromatisation to perillene. The hydrolysis to 3-(4-methylpent-3-enyl)-but-2-en-1,4-diol was identified as a chemical step which resulted from a spontaneous ring opening of the 3,10-epoxide.

A feeding experiment in a stirred tank bioreactor using 3-(4-Methylpent-3-enyl)-but-2-en-1,4-diol as a substrate resulted in the recovery of all metabolites in the gas phase, in the growth medium and in the fungal cells. A perillene yield of almost 80% was reached using an adsorbent trap in the waste gas stream. The enzymatic epoxidation β -myrcene to 3,10-epoxide and the following chemical hydrolysis to α -Z-acaridiol were thus identified as the limiting steps of the biogenesis of perillene.

Key words: bioconversion, terpene, fungi, β -myrcene, perillene

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Terpene - Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung	1
1.2 Problemstellung	2
1.3 Zielsetzung	3
2 Ergebnisse	4
2.1 Biokonversion von β-Myrcen durch <i>Pleurotus ostreatus</i>	4
2.1.1 Bildung flüchtiger und geruchsaktiver Verbindungen.....	4
2.1.2 Identifizierung der β -Myrcenmetabolite.....	8
2.1.2.1 1,2-, 3,10- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol.....	8
2.1.2.2 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen sowie deren Isomerisierungsprodukte.....	10
2.1.2.3 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol.....	14
2.1.2.4 α,α - und α,β -Acaridiol.....	16
2.1.2.5 α,α -Acarilactol, Perillen und α -Z-Acaridiol.....	21
2.1.2.6 α -Z-Acarialal.....	26
2.1.2.7 α,β -Acarilactol.....	27
2.1.2.8 α -E-Acaridiol.....	27
2.1.2.9 6,7-Epoxy- β -myrcen.....	28
2.1.2.10 Ipsdienol und Ipsdienon.....	29
2.1.2.11 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol und 2-Methyl-6-methylen- 3,7-octadien-2-ol.....	29
2.1.3 Kinetik der Produktbildungen.....	30
2.1.4 Bilanzierung der Biokonversion von β -Myrcen.....	34
2.2 Herleitung der Biogenese von Perillen und anderer Metabolite	36
2.3 Bestätigung der postulierten Perillenbiogenese durch Einsatz trideuterierter Vorstufen	41
2.3.1 Synthese der markierten Intermediate und Schlüsselkomponenten.....	41
2.3.2 Biokonversionen mit markierten Intermediaten.....	45
2.3.2.1 Trideutero- β -Myrcen als Substrat.....	45
2.3.2.2 Biokonversion von Trideutero- α -Z-Acaridiol.....	50
2.3.2.3 Identifizierung von α,α -Acarilactol als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol.....	51
2.4 Biokonversionen von β-Myrcen nachgeordneten Schlüsselmetaboliten und Kinetik der Produktbildungen	55

2.4.1 Biokonversion von 1,2-, 3,10- und 6,7-Epoxy- β -myrcen.....	55
2.4.2 Biokonversion von α -Z-Acaridiol.....	62
2.4.3 Biokonversion von α,α -Acarilactol.....	64
2.4.4 Folgekonversionen von Perillen.....	66
2.4.5 Monoterpenalkohole und -aldehyde als Vorstufen einer Furanbildung.....	68
2.5 Validierter Mechanismus der Perillenbiogenese.....	70
2.6 Analoge Biokonversion von β-Ocimen.....	71
3 Diskussion.....	74
3.1 Vorkommen und Bedeutung von β-Myrcen in der Natur.....	74
3.2 Biotransformationen, Biokonversionen von Terpenkohlenwasserstoffen.....	72
3.3 Bedeutung, Vorkommen und Biogenese der β-Myrcenmetabolite.....	79
3.3.1 Oxyfunktionalisierungen am konjugierten Doppelbindungssystem des β -Myrcens.....	79
3.3.2 Oxyfunktionalisierungen am Prenylrest.....	82
3.3.3 Perillenbiogenesen anderer Organismen.....	84
3.3.4 Sonstige Biokonversionen.....	87
3.4 Mechanismus der Terpenmetabolisierung.....	88
3.4.1 Laccasen.....	89
3.4.2 Peroxidasen.....	89
3.4.3 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP).....	90
3.4.4 Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO).....	92
3.4.5 Sonstige Cytochrom-P450-unabhängige Monooxygenasen.....	92
3.4.6 Dehydrogenasen.....	92
3.4.7 Epoxidhydrolasen.....	93
3.5 Metabolisierungsmechanismus von β-Myrcen durch <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	94
3.5.1 Epoxidierung von β -Myrcen.....	94
3.5.2 Hydrolyse der β -Myrcenepoxide zu β -Myrcendihydrodiolen.....	95
3.5.3 Cyclisierung des α -Z-Acaridiols zu furanoiden Spezies.....	97
3.6 Chemosynthetische Alternativen zur Herstellung von Perillen.....	101
3.7 Möglichkeit zur Perillenproduktion durch Biokonversion von β-Myrcen.....	103
3.8 Bedeutung des Verfahrens.....	105
3.8.1 Chemische Aspekte der Biokonversion.....	105
3.8.2 Physikalische Aspekte der Bioprozesstechnik.....	106
3.8.3 Steigerung der Perillenumsatzrate.....	107
3.8.3.1 Biokonzentrate.....	107
3.8.3.2 Kulturvorbehandlungen.....	108
4 Ausblick.....	109

5 Experimenteller Teil	110
5.1 Materialien und Chemikalien	110
5.1.1 Organismen.....	110
5.1.2 Chemikalien.....	110
5.1.3 Lösungsmittel.....	112
5.1.4 Gase.....	112
5.1.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	113
5.1.6 Bioreaktor.....	113
5.2 Kultivierung von Biokonversionskulturen	114
5.2.1 Kulturmedien.....	114
5.2.1.1 Standardnährlösung (SNL, Sprecher und Hansen, 1982).....	114
5.2.1.2 SNLH-Agar.....	114
5.2.2 Kulturführung.....	114
5.2.2.1 Stammkulturführung.....	114
5.2.2.2 Homogenisieren von Kulturen.....	114
5.2.2.3 Vorkulturen.....	115
5.2.2.4 Experimentalkulturen.....	115
5.2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor.....	115
5.2.2.6 Zellaufschluss mit Hilfe einer Kugelmühle.....	115
5.2.3 Substratdosierung.....	115
5.2.3.1 Direkte Substratdosierung in das Kulturmedium.....	115
5.2.3.2 Kontrollversuche.....	116
5.3 Analytik	116
5.3.1 Probenahmeverfahren.....	116
5.3.1.1 Probenahme aus Schüttelkulturen.....	116
5.3.1.2 Probenahme aus dem Bioreaktor.....	116
5.3.1.3 Untersuchung der Bioreaktor-Abluft.....	116
5.3.2 Bestimmung von Kulturparametern.....	117
5.3.2.1 Bestimmung der Zellmasse.....	117
5.3.2.2 Bestimmung des Glucosegehaltes.....	117
5.3.2.3 Bestimmung des pH-Wertes.....	117
5.3.2.4 Prüfung auf Kontamination.....	117
5.3.3 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie.....	117
5.4 Chemische Synthesen	118
5.4.1 Synthese von 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen.....	118
5.4.2 Synthese von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol.....	121
5.4.3 Synthese von 4-Methyl-3-pentenyljodid.....	121

5.4.4	Synthese von α,α -Acariolid.....	122
5.4.5	Synthese von (Trideutero-) α -Z-Acaridiol und α,α -Acarilactol	124
5.4.6	Synthese von Perillen.....	124
5.4.7	Synthese von α,β -Acariolid.....	125
5.4.8	Synthese von Trideutero- β -myrcen.....	125
5.4.9	Synthese von 6,7-Epoxy- β -myrcen und 6,7-Epoxy- β -Z-ocimen.....	127
5.5	Derivatisierungen.....	127
5.5.1	Silylierung von Proben für die Gaschromatographie.....	127
5.6	Chromatographie.....	128
5.6.1	Klassische Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel 60.....	128
5.6.2	Kapillargaschromatographie (HRGC).....	128
5.6.2.1	HRGC-FID mit on-column-Injektion und polarer Trennsäule für Konversionsextrakte und Syntheseprodukte.....	128
5.6.2.2	HRGC-FID mit on-column-Injektion und unpolarer Trennsäule für silylierte Proben und Syntheseprodukte.....	129
5.6.2.3	HRGC-FID mit on-column-Injektion zur chiralen Trennung.....	129
5.6.2.4	HRGC-O und -FID mit on-column-Injektion und olfaktorischer Detektion...	130
5.6.2.5	HRGC-MS mit on-column-Injektion und Massenspektrometer.....	130
5.6.2.6	Berechnung von Kovatsindices.....	131
5.6.2.7	Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee).....	131
5.6.2.8	NMR-Spektroskopie.....	131
5.7	Entsorgungshinweise.....	132
6	Literaturverzeichnis.....	133
7	Anhang.....	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Biokonversionsprodukte von β -Myrcen durch <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
Abbildung 2.2:	GC-MS-Chromatogramm eines Extraktes der β -Myrcenbiokonversion mit <i>Pleurotus ostreatus</i> auf polarer Trennsäule	6
Abbildung 2.3:	GC-MS-Profil des Biokonversionsextraktes von β -Myrcen nach Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle	6
Abbildung 2.4:	GC-MS-Profil des Biokonversionsextraktes von β -Myrcen nach Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle (Ausschnitt der Abb. 2.3: 8-40 min)	7
Abbildung 2.5:	Massenspektrum von 3,10- β -Myrcendihydrodiol als Synthese- und Biokonversionsprodukt	9
Abbildung 2.6:	Massenspektrum von 1,2- β -Myrcendihydrodiol als Synthese- und Biokonversionsprodukt	9
Abbildung 2.7:	Massenspektrum von 6,7- β -Myrcendihydrodiol als Synthese- und Biokonversionsprodukt	9
Abbildung 2.8:	Syntheseweg zur Herstellung von 3,10- und 1,2-Epoxy- β -myrcen	10
Abbildung 2.9:	Massenspektrum von 3,10-Epoxy- β -Myrcen als Synthese- und Biokonversionsprodukt	11
Abbildung 2.10:	Massenspektrum von 1,2-Epoxy- β -Myrcen als Synthese- und Biokonversionsprodukt	11
Abbildung 2.11:	Isomerisierung von 1,2-Epoxy- β -myrcen zum Citral und analoge Umlagerung von 3,10-Epoxy- β -myrcen zum 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal	12
Abbildung 2.12:	Massenspektrum von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal als Syntheseprodukt	13
Abbildung 2.13:	Massenspektrum von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol als Syntheseprodukt	15
Abbildung 2.14:	Synthese von 4-(Trideutero)methyl-3-pentenylidid	17
Abbildung 2.15:	Synthesestrategie zur Darstellung von (Trideutero-) α,α -Acariolid	17
Abbildung 2.16:	Fragmentierungsmechanismus von α,α -Acariolid	18
Abbildung 2.17:	Massenspektrum von α,α -Acariolid als Biokonversions- und Syntheseprodukt in nicht markierter und trideuterierter Form	18
Abbildung 2.18:	Massenspektren von α,β -Acariolid als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form	20
Abbildung 2.19:	Fragmentierungsmechanismus von Trideutero- α,β -Acariolid nach Tarui <i>et al.</i>	20
Abbildung 2.20:	Synthesestrategie zur Darstellung von α,α -Acarilactol, α -Z-Acaridiol und Perillen	21
Abbildung 2.21:	Massenspektrum von α,α -Acarilactol als Syntheseprodukt	22
Abbildung 2.22:	Nummerierung der Positionen am Kohlenstoffgerüst von α,α -Acarilactol, die bei der Zuordnung der chemischen Verschiebungen in der Tab. 2.5 berücksichtigt wurde	22
Abbildung 2.23:	Massenspektren von α -Z-Acaridiol als Syntheseprodukt in nicht markierter und trideuterierter Form sowie als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen	25
Abbildung 2.24:	Massenspektrum von Perillen	26
Abbildung 2.25:	Massenspektren von α -Z-Acariolal als Synthese- und Biokonversionsprodukt aus β -Myrcen	26

- Abbildung 2.26:** Massenspektrum von α,β -Acarilactol als Biokonversions- und Syntheseprodukt 27
- Abbildung 2.27:** Massenspektren von α -E-Acaridiol als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen und als Isomerisierungsprodukt des α -Z-Acaridiols 28
- Abbildung 2.28:** Massenspektren von 6,7-Epoxy- β -myrcen als Synthese- und Biokonversionsprodukt von β -Myrcen 28
- Abbildung 2.29:** Massenspektren von Ipsdienol und Ipsdienon als Biokonversionsprodukte von β -Myrcen 29
- Abbildung 2.30:** Massenspektren von 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol als Biokonversionsprodukte von β -Myrcen 29
- Abbildung 2.31:** Bildungskinetik der Metabolite von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus* 30
- Abbildung 2.32:** Bildungskinetiken von α,α - und α,β -Acariolid; einmalige Dosierung von β -Myrcen 31
- Abbildung 2.33:** Bildungskinetiken von Perillen und α -E-Acaridiol; einmalige Dosierung von β -Myrcen; chemischer Kontrollversuch unter Dosierung von Perillen mit dicht und durchlässig verschlossenem Erlenmeyer-Kolben 32
- Abbildung 2.34:** Bildungskinetiken der β -Myrcendihydrodiol; tägliche Dosierung von β -Myrcen; Rührkesselreaktor 33
- Abbildung 2.35:** Hypothese der ersten Reaktionsschritte bei der Biokonversion von β -Myrcen zum α -Z-Acaridiol über die Hydratisierungszwischenstufe 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol 36
- Abbildung 2.36:** postulierte Biokonversion von β -Myrcen zum Perillen mittels *Pleurotus ostreatus* 37
- Abbildung 2.37:** β -Myrcenbiokonversion zu den Epoxiden 3,10-, 1,2- und 6,7-Epoxy- β -myrcen sowie deren Haupthydrolyseprodukten 3,10-, 1,2- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol (vicinale Diol) 38
- Abbildung 2.38:** β -Myrcenbiokonversion zu α -Z- und α -E-Acaridiol mit 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen als Zwischenstufen 38
- Abbildung 2.39:** Biokonversion von β -Myrcen zum Ipsdienol mit nachfolgender Oxidation zum Ipsdienon 39
- Abbildung 2.40:** Biokonversion von β -Myrcen zum 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol und 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol 39
- Abbildung 2.41:** Nucleophile Addition von 4-Trideuteromethyl-3-pentenyllithium an Methylvinylketon unter Bildung von 8-Z-/9-E-Trideuterolinalool 41
- Abbildung 2.42:** Massenspektrum von 9-E-/8-Z-Trideuterolinalool als Syntheseprodukt 42
- Abbildung 2.43:** Reaktionsmechanismus der Wassereliminierung nach Burgess von Trideuterolinalool zum Trideutero- β -myrcen 43
- Abbildung 2.44:** Reaktionswege der Wassereliminierung nach Burgess aus Linalool (rechts) und GC-MS-Profil des Produktgemisches (links) 43
- Abbildung 2.45:** Massenspektrum von 8-Z-/9-E-Trideutero- β -myrcen 44
- Abbildung 2.46:** β -Myrcen-Region im Chromatogramm des trideuterierten 5-Komponenten-Gemisches; Dehydratisierung von Trideuterolinalool nach Burgess 45
- Abbildung 2.47:** Massenspektrum von 3,10- β -Myrcendihydrodiol als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form 46
- Abbildung 2.48:** Massenspektrum von 1,2- β -Myrcendihydrodiol als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form 46
- Abbildung 2.49:** Massenspektrum von 6,7- β -Myrcendihydrodiol als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form 47

Abbildung 2.50: Massenspektrum von α -E-Acaridiol als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form	47
Abbildung 2.51: Massenspektrum von α,α -Acariolid als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form	47
Abbildung 2.52: Massenspektrum von Perillen als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form	48
Abbildung 2.53: Massenspektrum von 6,7-Epoxy- β -myrcen als Biokonversionsprodukt in markierter und nicht markierter Form	48
Abbildung 2.54: Postulierter Fragmentierungsmechanismus für 6,7-Epoxy- β -myrcen im Massenspektrometer	49
Abbildung 2.55: Nachgewiesene Biokonversionsprodukte von Trideutero- α -Z-Acaridiol	50
Abbildung 2.56: GC-Chromatogramm des Biokonversionsextraktes nach Dosierung von Trideutero- α -Z-acaridiol	51
Abbildung 2.57: Massenspektrum von α,β -Acariolid als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol in markierter und nicht markierter Form	51
Abbildung 2.58: Massenspektren von α,α -Acarilactol als Synthese- und Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol in markierter und nicht markierter Form	52
Abbildung 2.59: Abgeleitete Perillenbiogenese aus β -Myrcen durch <i>P. ostreatus</i>	54
Abbildung 2.60: Hydrolysekinetik von 1,2- und 3,10- β -Myrcendihydrodiol; Kultivierung und chemische Kontrolle	55
Abbildung 2.61: GC-MS-Chromatogramm des Biokonversionsextraktes mit Dosierung von 1,2-Epoxy- β -myrcen	58
Abbildung 2.62: GC-Chromatogramm des Biokonversionsextraktes mit Dosierung von 3,10-Epoxy- β -myrcen	59
Abbildung 2.63: Chromatogramm-Regionen von 3,10-Epoxy- β -myrcen und Perillen sowie α -Z- und α -E-Acaridiol beim Dosierungsversuch mit 3,10-Epoxy- β -myrcen als Substrat	60
Abbildung 2.64: Biokonversionskinetik von 3,10-Epoxy- β -myrcen	60
Abbildung 2.65: Bildungskinetik von 6,7- β -Myrcendihydrodiol (Hydrolyse-Kinetik) ausgedrückt in prozentualer Ausbeute nach einmaliger Dosierung von 6,7-Epoxy- β -myrcen in Schüttelkultur	61
Abbildung 2.66: Biokonversion von α -Z-Acaridiol in 2 L-Rührkesselreaktor; Bildungskinetik von Perillen (aufsummiert), Ausbeute von Perillen und Gesamtwiederfindung	62
Abbildung 2.67: Bildungskinetik von α,α - und α,β -Acariolid nach Biokonversion von α -Z-Acaridiol in 2 L-Rührkesselreaktor; tägliche Dosierung	63
Abbildung 2.68: Biokonversion von α,α -Acarilactol in Schüttelkultur; Bildungskinetik von α,α -Acariolid und α -Z-Acaridiol; Abbaukinetik des Substrats; einmalige Dosierung	64
Abbildung 2.69: Formulierung einer Disproportionierungsreaktion von α,α -Acarilactol im SNL-Medium	65
Abbildung 2.70: Zusammenstellung der Produktkonzentrationen nach einmaliger Dosierung von α,α -Acarilactol	66
Abbildung 2.71: Bildungskinetik von α,α -Acariolid und Zusammenstellung der Perillenkonzentrationen des chemischen Kontrollversuches und des Kultivierungsversuches nach Dosierung von Perillen in ein SNL-Nährmedium	67
Abbildung 2.72: Nachgewiesene Biokonversion von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal zum α,α -Acariolid durch <i>P. ostreatus</i>	68

Abbildung 2.73: Abgeleiteter Mechanismus der Perillenbiogenese aus β -Myrcen mit <i>Pleurotus ostreatus</i>	70
Abbildung 2.74: Strukturformeln von β -Myrcen, Z- und E-Ocimen	71
Abbildung 2.75: Cyclisierung eines Doppelbindungssystems zum Furanoid am Beispiel von β -Myrcen zum Perillen und Z-Ocimen zum Rosenfuran	71
Abbildung 2.76: Biokonversion von Z-Ocimen; GC-MS-Chromatogramm des Biokonversions-extraktes und das zugehörige Biokonversionsschema	72
Abbildung 2.77: Massenspektren von Rosenfuran, Epoxyrosenfuran und Epoxy-Z-ocimen	73
Abbildung 3.1: Mevalonat-abhängige Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	74
Abbildung 3.2: Desoxyxylulose-Weg der Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	75
Abbildung 3.3: Mechanismus der β -Myrcen-Bildung aus IPP und DAMPP über Geranylpyrophosphat	76
Abbildung 3.4: Postulierte Biogenese von Dihydro- α,β -Acariolid 3-(4-Methylpentyl)-2-buten-4-olid aus Geraniol	80
Abbildung 3.5: Postulierter Mechanismus einer Cannizzaro-Reaktion von α -Z-Acaridial zum α,β -Acariolid	81
Abbildung 3.6: Biokonversionsprodukte von β -Myrcen bei verschiedenen Basidiomyceten (Oxyfunktionalisierungen am konjugierten Doppelbindungssystem)	81
Abbildung 3.7: Oxyfunktionalisierungen von β -Myrcen am Prenylrest bei verschiedenen Basidiomyceten	82
Abbildung 3.8: Vorgeschlagener Mechanismus der Konversion von β -Myrcen zu den Alkoholen 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol und 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-ol über Carbokationen als Zwischenstufen	83
Abbildung 3.9: Postulierter Mechanismus der Biokonversion von β -Myrcen zu den Alkoholen 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol und 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-ol als direkte Oxidation über Hydroperoxide als Zwischenstufen	83
Abbildung 3.10: Hypothetische Biosynthese-Wege furanoider Monoterpene als Bestandteile des etherischen Öls von <i>Perilla frutescens</i>	85
Abbildung 3.11: Biokonversionsprodukte von β -Myrcen bei verschiedenen Basidiomyceten (Cyclisierungsreaktionen)	87
Abbildung 3.12: Postulierter Mechanismus der Biokonversion von β -Myrcen zu cyclischen Metaboliten bei verschiedenen Basidiomyceten über Carbokationen als Zwischenstufen	87
Abbildung 3.13: Reaktionsfolge einer Laccase-vermittelten Ligninoxidation [links] und Strukturformeln verschiedener Mediatoren [rechts]	89
Abbildung 3.14: Mechanismus einer Cytochrom-P450-abgängigen Oxidation am Beispiel von Chrysen	91
Abbildung 3.15: Katalyse-Mechanismus von Epoxidhydrolasen	93
Abbildung 3.16: Bildung der Peroxycarbonsäure durch Perhydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates einer Lipase	94
Abbildung 3.17: Postulierter Mechanismus der Hydrolyse von 1,2-Epoxy- β -myrcen zum α -E-Acaridiol Gegenwart von Aminosäuren im SNL-Nährmedium	96

Abbildung 3.18: Postulierter Mechanismus der Hydrolyse von 3,10-Epoxy- β -myrcen zu den α -Acaridiolen in Gegenwart einer Aminosäure im SNL-Nährmedium	96
Abbildung 3.19: Postulierter Mechanismus der Isomerisierung von Geranial und Neral sowie deren Konversion zum 6-Methyl-5-hepten-2-on und Acetaldehyd über 3-Hydroxycitronellal in Gegenwart einer Aminosäure als Katalysator	97
Abbildung 3.20: Desymmetrierung von <i>meso</i> -1,4-Diolen in Gegenwart einer Alkohol-Dehydrogenase (HLADH) aus Pferdeleber	98
Abbildung 3.21: Mechanismus der Furanbildung bei der Pyrolyse von Kohlenhydraten und/oder Aminosäuren sowie bei der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren	99
Abbildung 3.22: Synthese von Perillenal [E-2-Methyl-5-(3-furyl)-2-pentenal] durch Photooxygenierung von β -Myrcen	100
Abbildung 3.23: Synthese von Perillen nach Kramp und Bohlmann	101
Abbildung 3.24: Synthese von Perillen nach Barma <i>et al.</i>	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Produkte der β -Myrcenbiokonversion mit <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
Tabelle 2.2:	NMR-Strukturdaten von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal	13
Tabelle 2.3:	NMR-Strukturdaten von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol	14
Tabelle 2.4:	Heteronucleare <i>long-range</i> -Kopplungen im ^1H , ^{13}C -korrelierten HMBC-2D-NMR-Spektrum für 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol	15
Tabelle 2.5:	NMR-Strukturdaten von α,α -Acarilactol	24
Tabelle 2.6:	Heteronucleare <i>long-range</i> -Kopplungen im ^1H , ^{13}C -korrelierten HMBC-2D-NMR-Spektrum für α,α -Acarilactol	24
Tabelle 2.7:	Verteilung von β -Myrcen und dessen Produkten im Bioreaktor-System am Ende des Kultivierungsversuchs am achten Tag der Biokonversionszeit	34
Tabelle 2.8:	Analytik des Biokonversionsextraktes mit Dosierung von 1,2-Epoxy- β -myrcen in Bezug auf Abbildung 2.61	58
Tabelle 2.9:	Analytik des Biokonversionsextraktes mit Dosierung von 3,10-Epoxy- β -myrcen in Bezug auf Abbildung 2.62	59
Tabelle 5.1:	Bestandteile der Kulturnährlösung (SNL) nach Sprecher	110
Tabelle 5.2:	Substrate, Reagenzien und sonstige Chemikalien für Kultivierungsversuche und/oder chemische Synthesen	111
Tabelle 5.3:	Verwendete Lösungsmittel	112
Tabelle 5.4:	Verwendete Gase	112
Tabelle 5.5:	Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel	113
Tabelle 7.1	Verzeichnis der in dieser Arbeit aufgeführten Strukturformeln	140
Tabelle 7.2	Biokonversionen von β -Myrcen mit <i>P. ostreatus</i> (Gehalte in $[\text{mg L}^{-1}]$)	144

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
Bu	butyl-
BuLi	Butyllithium
COSY	Correlation Spectroscopy, zweidimensionale NMR
CW	Carbowax
CYP	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase
d	dublett
DB	Divinylbenzen
dd	dublett von dublett
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonucleine acid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ee	enantiomer excess
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ER	endoplasmatisches Retikulum
Et	ethyl-
evt.	eventuell
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
Gew.	Gewicht
HLADH	horse liver alcohol dehydrogenase
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMG	β -Hydroxy- β -methylglutaryl
HMPA	Hexamethylphosphorsäureamid
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation, zweidimensionale ^1H , ^{13}C -NMR
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
IPP	Isopentenylidiphosphat
IS	Interner Standard

LDA	Lithiumdiisopropylamid
LDL	<i>low-density</i> -Lipoproteine
Log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
m	multiplett
mCPBA	Metachlorperbenzoesäure
Me	methyl-
MS	Massenspektrometrie
NAD(P) ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O	Olfaktometrie
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDC	Pyridiniumdichromat
PP _i	Pyrophosphat
prim.	primär
pTsOH	p-Toluensulphonsäure
PUFA	polyunsaturated fatty acids
q	quartett
RT	Raumtemperatur
s	strong, singulett
SNL	Standardnährlösung
Synth.	Synthese
t	triplett
TBABH ₄	Tetrabutylammoniumborhydrid
tert.	tertiär
THP	3-(2`-Tetrahydropyranyloxy)-
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
Ts	p-Tosyl-
u	unit
UV	Ultraviolett
w	weak
THF	Tetrahydrofuran
tm	Triplett von Multiplett

1 Einleitung

1.1 Terpene - Vorkommen, Eigenschaften und Verwendung

Die Naturstoffklasse der Terpene kommt hauptsächlich in Pflanzen vor. Sie werden dort *de novo* biosynthetisiert und üben als bioaktive Substanzen sehr unterschiedliche Funktionen aus. So fungieren manche Terpene als Abwehrstoffe gegen Schädlinge (z.B. Pinen, Phorbol), andere wiederum als Lockstoffe, um Insekten zur Pollenübertragung oder zur Ausbreitung von Samen anzulocken (z.B. Linalool). Weitere Terpene können als Phytoalexine (Capsidiol, Casben) wirken, die postinfektionell zur Abwehr gegen Schädlinge (meist Pilze) gebildet werden oder sie wirken als Pflanzenhormone (Gibberelline), Membranbausteine (Sterine) oder Photosynthesepigmente (Carotinoide) (Watzl *et al.*, 1999). Die meisten dieser Pflanzenterpene dienen als Bestandteile etherischer Öle dem Fraßschutz. Betrachtet man Insekten, so haben manche im Laufe der Evolution die Fähigkeit entwickelt, Terpene zu transformieren und die resultierenden Produkte als Pheromone zu nutzen (Byers *et al.*, 1982; Seybold *et al.*, 2003).

Obwohl Terpene „feindlich gesinnte Kampfstoffe der pflanzlichen Welt“ darstellen, können ihre Bioaktivitäten beim Menschen oft positive Eigenschaften aufweisen. Terpene rufen dadurch zum Beispiel eine charakteristische Geruchswahrnehmung hervor, deren Qualität mit positiven oder negativen Attributen charakterisiert werden kann. Positive Attribute qualifizieren solche Verbindungen als Duft- oder Aromastoffe und können somit zur Aromatisierung von Lebensmitteln oder als Bestandteile in kosmetischen Mitteln (Parfum, Deodorant) verwendet werden.

Die dt. Aromenverordnung unterscheidet in der Anlage 1 per Definition zwischen natürlichen, naturidentischen und künstlichen Aromastoffen (Aromenverordnung, 2001). Danach sind natürliche Aromastoffe chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, die durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren oder aus Ausgangsmaterialien pflanzlicher oder tierischer Herkunft gewonnen werden. Da die natürlichen Aromastoffe seitens der Verbraucher eine größere Akzeptanz finden als die naturidentischen Spezies, sind biotechnologische Verfahren als natürliche Ressourcen eine wertvolle Alternative.

1.2 Problemstellung

Die Gewinnung pflanzlicher Duftstoffe ist entweder durch Isolierung aus der entsprechenden Herkunftspflanze oder durch chemische Synthesen aus frei zugänglichen Vorstufen möglich. Beide Gewinnungsstrategien sind teuer und erschweren eine wirtschaftliche Produktion oder machen sie gar unmöglich. Als Beispiel sei hier die Gewinnung eines bulgarischen Rosenöls aus der Rosenvarietät *Rosa damascena* aufgeführt. 3-4 t Rosenblütenköpfe sind zur Gewinnung von 1 kg etherischen Öls durch Wasserdampfdestillation nötig. Aufgrund des außergewöhnlichen Arbeitsaufwandes bei der Ernte resultiert ein Preis von bis zu 15 000 DM/kg (Ohloff *et al.*, 1994). Die Rosenernte beschränkt sich auf 30 Tage während der Monate Mai und Juni und muss in den frühen Morgenstunden vorgenommen werden, da der Gehalt an Riechstoffen mit steigender Temperatur fällt. (Ohloff *et al.*, 1994)

Eine Chemosynthese zeichnet sich in den meisten Fällen durch mangelnde Regio- und Enantioselektivität aus. Bei der Herstellung können oft schwer auftrennbare Gemische (Racemate, Positionsisomere) entstehen. In solchen Fällen ist sowohl der Isolierungsschritt als auch die daraus resultierende, geringe Ausbeute limitierender Wirtschaftsfaktor. Eine Abhilfe innerhalb der organisch-chemischen Arbeitsweise schafft zwar die Einführung von Schutzgruppen, diese erfordern jedoch zusätzliche Reaktionsschritte, die eine zeitliche Produktionsverzögerung zur Folge haben und ebenfalls einen limitierenden Wirtschaftsfaktor darstellen.

Eine Alternative zur Lösung dieser Probleme bieten Bioprozesstechniken. Intensiv beforscht werden zu Zeit biotechnologische Ansätze zur selektiven Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen. Exemplarisch seien hier die Biotransformationen von α -Pinen zu Verbenon, von Valencen zu Nootkaton bzw. von Limonen zu Carvon und α -Terpineol genannt (Berger und Zorn, 2004; Berger *et al.*, 2001; Demyttenaere, 2001; Schrader und Berger, 2001).

Das ungesättigte Monoterpen β -Myrcen (7-Methyl-3-methylen-1,6-octadien) ist als Bestandteil der Kohlenwasserstofffraktion vieler etherischer Öle bekannt. Aufgrund seiner 1,3-Dienstruktur neigt es zur Polymerisation und es besitzt antimikrobielle Eigenschaften. Es wurde daher noch nicht oft als Startmaterial für Biokonversionsstudien genutzt. Arbeiten von Busmann und Berger [1994] illustrieren jedoch eindrucksvoll das metabolische Potential von Basidiomyceten, β -Myrcen in oxygenierte Monoterpenoide zu überführen. Als Minorbestandteil ($\approx 1 \text{ mg L}^{-1}$) im Transformationsmedium einiger Weißfäulepilze (*Pleuroten*) wurde dabei auch Perillen, 3-(4-Methyl-3-pentenyl)furan nachgewiesen. Nach Ohloff handelt es sich bei Perillen um einen hochaktiven, wohlriechenden Stoff mit blumigen Noten (Ohloff, 1994). Laut Auskunft eines mittelständischen Citrusölverarbeiters besteht ein beträchtliches wirtschaftliches Interesse, diese Verbindung als natürlichen Aromastoff in Citrusaromen zu verwenden.

Arbeiten zur mikrobiologischen Perillenbiosynthese aus β -Myrcen, anderen Terpenen oder terpenoiden Ausgangsstoffen liegen bislang nicht vor. Die Oxidation von Geraniol zu Geranolsäure als Einstieg in die Mineralisierung von Monoterpenen durch anschließende β -Oxidation der Säure bei *Pseudomonas incognita* zeigt beispielhaft, dass es prinzipiell möglich ist, aliphatische Monoterpene unter Erhalt der Isopentenylkette selektiv terminal zu oxidieren (Madyastha *et al.*, 1977). Devi und Bhattacharyya [1977] isolierten ebenfalls einen *Pseudomonas incognita* Stamm, der in der Lage war, mit 3-(4-Methyl-3-pentenyl)-2(5H)-furanon (α,α -Acariolid) eine dem Perillen strukturverwandte Substanz aus Geraniol zu bilden. Die in der Arbeitsgruppe bereits Anfang der Neunziger Jahre durchgeführten Biokonversionsstudien zeigten, dass insbesondere Basidiomyceten β -Myrcen nicht nur als Substrat tolerieren, sondern auch eine Vielzahl an Oxygenierungsprodukten bilden. Unter den identifizierten Oxidationsprodukten befand sich auch Perillen. In darauffolgenden Forschungsarbeiten am Institut wurde ein breitangelegtes Screening von Basidiomyceten bezüglich der Bildung von Perillen aus β -Myrcen durchgeführt. Kontrollversuche zu den Biokonversionsexperimenten belegten eindeutig, dass sowohl eine metabolisch aktive Kultur als auch die Zugabe von β -Myrcen als Precursor für die Perillenbildung unverzichtbar sind. Unter den getesteten Stämmen hat sich der Speisepilz *Pleurotus ostreatus* (Austernseitling) als besonders aktiv erwiesen.

1.3 Zielsetzung

Es existiert bislang kein industrielles Verfahren zur Herstellung von Perillen. Aufgrund der erwähnten Nachfrage ist das wirtschaftliche Interesse, diese Verbindung zu gewinnen beachtlich. Durch Aufklärung der Biogenese soll ein biotechnologischer Zugang zu natürlichem Perillen eröffnet werden.

Das Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Aufklärung der Perillenbiogenese aus β -Myrcen durch den Basidiomyceten *P. ostreatus*. Um limitierende Schritte der β -Myrcenbiokonversion zu lokalisieren, sollen dabei Bildungskinetiken aufgenommen werden. Es gilt hier metabolische Engpässe auf dem Weg zum Perillen sowie nachfolgende enzymatische Umsetzungen der Zielkomponente aufzuzeigen. Erkenntnisse aus gezielten Dosierungsexperimenten mit synthetisierten Intermediaten und der Zielkomponente (Perillen) sollen die Entwicklung von Strategien für gezielte Manipulationen des Bioprozesses im Hinblick auf eine erhöhte Perillenbildung ermöglichen.

2 Ergebnisse

2.1 Biokonversion von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus*

2.1.1 Bildung flüchtiger und geruchsaktiver Verbindungen

P. ostreatus wurde in Gegenwart von β -Myrcen submers kultiviert und dabei wurden mehrere Oxidationsprodukte nachgewiesen. Da das β -Myrcen durch Autoxidation auch direkt mit Luftsauerstoff reagieren kann, wurde zu jedem Biokonversionsversuch ein chemischer Kontrollversuch durchgeführt, bei der eine Substratdosierung in ein steriles Medium erfolgte, der Kolben jedoch gleichen Bedingungen unterworfen wurde. Die in Anwesenheit des aktiven Basidiomyceten gebildeten flüchtigen Verbindungen wurden zum Zeitpunkt der Probenahme aus dem Kulturüberstand bzw. dem aufgeschlossenen Mycel mit Hilfe eines n-Pentan/Diethylether-Azeotropgemisches (1/1,12; v/v) extrahiert, destillativ an einer Vigreux-Kolonnen aufkonzentriert und die Konzentrate gegebenenfalls auch nach Silylierung gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht. Ebenso wurde das sterile Medium (5.2.1.1) der chemischen Kontrolle extrahiert und gaschromatographisch untersucht. Für die Quantifizierung wurde jeweils eine GC-FID-Messung herangezogen. Vergleich der GC-FID-Profile zwischen chemischer Kontrolle und Biokonversion untereinander und Quantifizierung der Produktbildungen ergab, dass eine metabolisch aktive Kultur für die Produktbildung notwendig ist. Bei der chemischen Kontrolle wurden keine flüchtigen Oxidationsprodukte nachgewiesen. Strukturen wurden aus dem Fragmentierungsmuster der Moleküle abgeleitet (EI-MS), die Identifizierung bekannter Verbindungen erfolgte über den Vergleich mit Massenspektren und Kovats-Indizes synthetisierter Spezies oder durch computergestützten Vergleich mit Spektrenbibliotheken bzw. Literaturdaten. Eine Bestätigung der Strukturen erfolgte gegebenenfalls über die NMR-Spektroskopie. Die identifizierten Produkte der Biokonversion von β -Myrcen mit *P. ostreatus* sind in der Abb. 2.1 bzw. Tab. 2.1 aufgelistet. Die Abb. 2.2 zeigt das zugehörige GC-MS-Chromatogramm aus dem Kulturüberstand, das zu einem Probenahmezeitpunkt von 24 h nach β -Myrcendosierung aufgenommen wurde. Im Rahmen der Dosierungsversuche wurde zusätzlich ein GC-MS-Profil des Mycelextraktes nach Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle aufgenommen. Die Abbildungen 2.3 und 2.4 zeigen die zugehörigen GC-MS-Chromatogramme. Zu den identifizierten Hauptprodukten gehören zwei Diterpene, die im GC-MS-Profil deutlich hervortreten (Abb. 2.3). In Spurenbereich wurden neben 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol **17**, Ipsdienol **15** und 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** vor allem auch die sonst nicht nachweisbaren β -Myrcenepoxide **3** und **4** erfasst. Der Chromatogramm-Ausschnitt mit den entsprechenden Peaks ist der Abbildung 2.4 zu entnehmen.

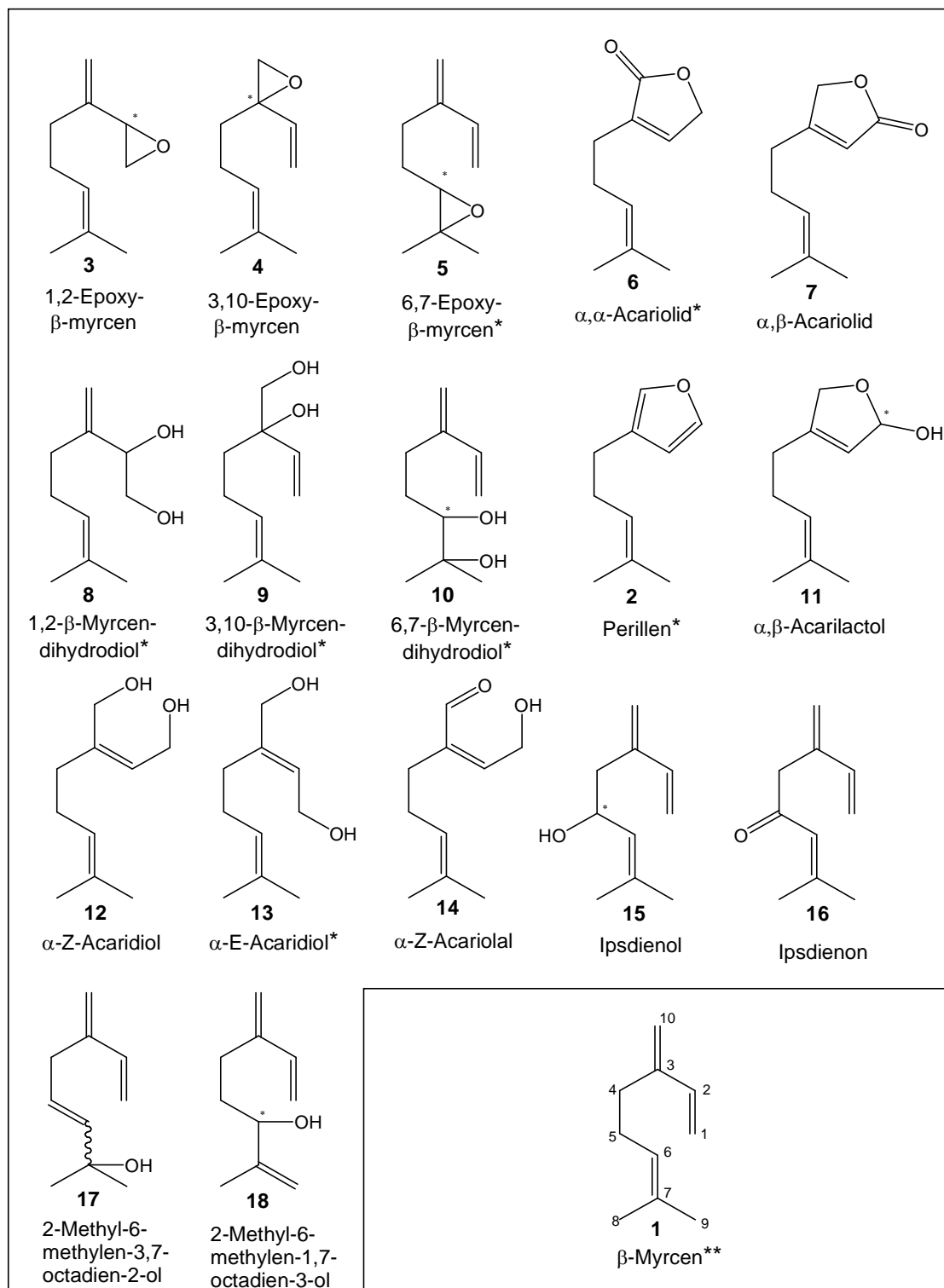


Abbildung 2.1: Konversionsprodukte von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus*; * Verbindung wurde auch in trideuterierter Form als Konversionsprodukt von Trideutero- β -Myrcen nachgewiesen; ** Diese Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts wurde für die Interpretation von NMR- und Massenspektren einheitlich bei allen in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Verbindungen verwendet und weicht deshalb von den IUPAC-Nomenklaturregeln ab.

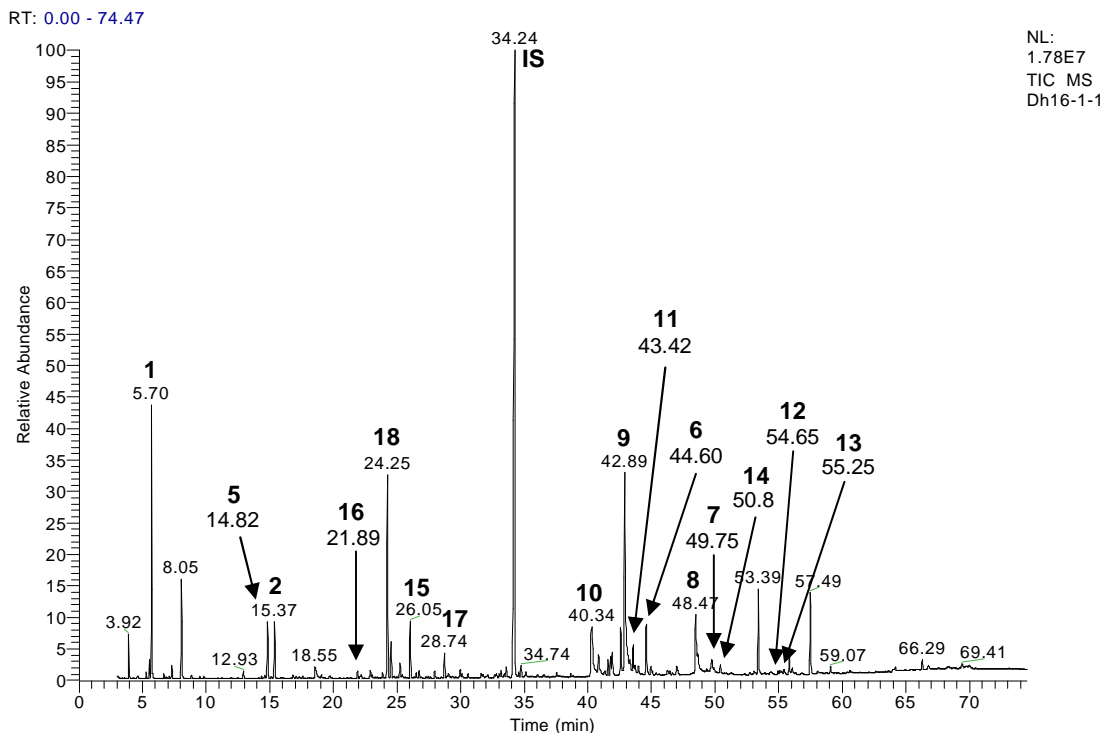


Abbildung 2.2: GC-MS-Chromatogramm eines Extraktes der β -Myrcenbiokonversion mit *P. ostreatus* auf polarer Trennsäule [ZB-Wax; IS: interner Standard - n-Nonadecan ($2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$); Dosierung: $0,71 \text{ g } 200 \text{ mL}^{-1}$ ($1 \text{ mL } 200 \text{ mL}^{-1}$) SNL-Medium (Sprecher *et al.*, 1982) Zeitpunkt der Probenahme: 24 h nach der Dosierung von β -Myrcen (Nummerierung siehe Abb. 2.1)

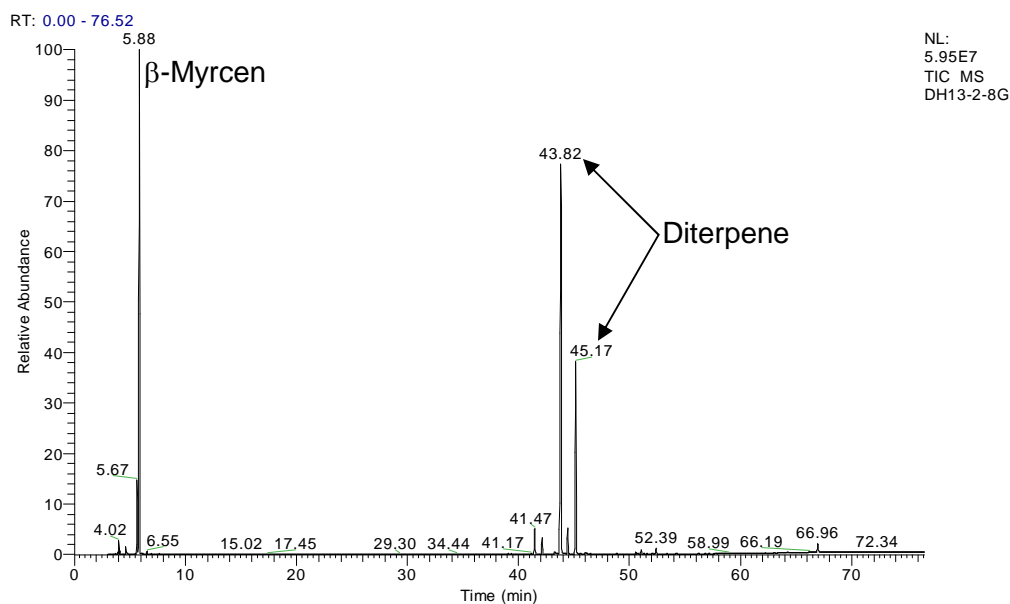


Abbildung 2.3: GC-MS-Profil des Mycelextraktes nach Biokonversion von β -Myrcen und Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle; Bioreaktorversuch (2 L); Biofeuchtmasse: 40g (1/10 des Gesamtmycels); Extraktvolumen: 1mL

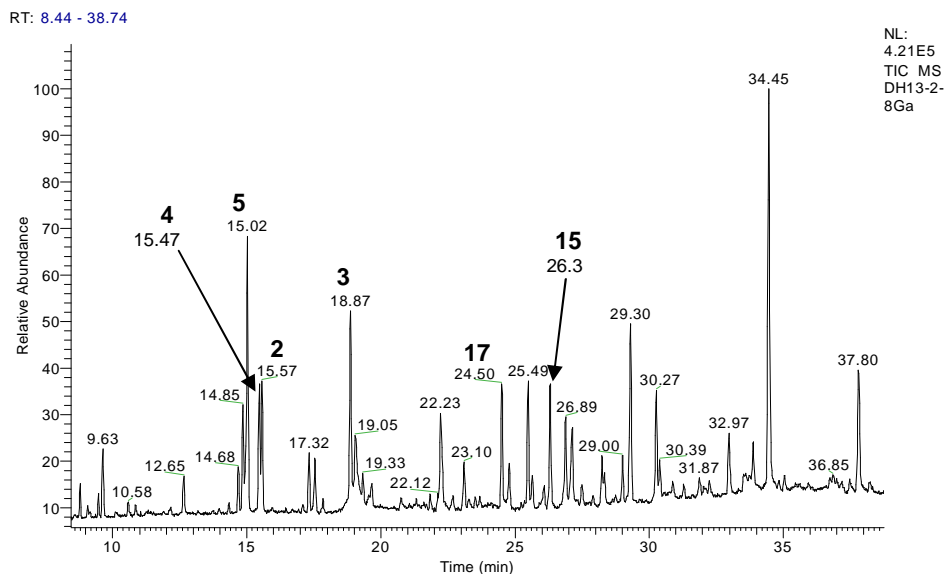


Abbildung 2.4: GC-MS-Profil des Mycelextaktes nach Biokonversion von β -Myrcen und Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle; Bioreaktorversuch (2 L); Analysenzeit: 8-40 min; Biofeuchtmasse: 40 g (1/10 des Gesamtmycels); Extraktvolumen: 1mL; Nummerierung: siehe Abb. 2.1; Ausschnitt der Abbildung 2.3

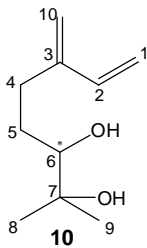
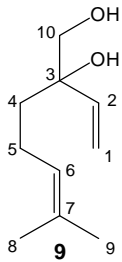
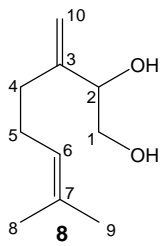
Tabelle 2.1: Produkte der β -Myrcenbiokonversion mit *Pleurotus ostreatus*

Produkt	KI (ZB-Wax)	[M ⁺]	Identifizierung	
1,2- β -Myrcendihydrodiol	8	2319	170	Synth., NMR, MS [*]
3,10- β -Myrcendihydrodiol	9	2141	170	Synth., NMR, MS [*]
6,7- β -Myrcendihydrodiol	10	2060	170	Synth., MS [*]
1,2-Epoxy- β -myrcen	3	1491	152	Synth., NMR, MS [*]
3,10-Epoxy- β -myrcen	4	1401	152	Synth., NMR, MS [*]
6,7-Epoxy- β -Myrcen	5	1392	152	Synth., NMR, MS [*]
α,α -Acariolid	6	2187	166	Synth., MS
α,β -Acariolid	7	2358	166	Synth., MS
α,β -Acarilactol	11	2159	168	Synth., MS [*]
α -Z-Acariolal	14	2210	168	MS
α -E-Acaridiol	13	2575	170	MS
α -Z-Acaridiol	12	2555	170	Synth., MS
Perillen	2	1400	150	Synth., NMR, MS
Ipsdienol	15	1617	152	MS
Ipsdienon	16	1575	150	MS
2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol	17	1620	152	MS
2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol	18	1739	152	MS

*eigene Interpretation; Synth.: Synthese; KI: Retentionsindizes nach Kovats (eigene Daten)

2.1.2 Identifizierung der Metabolite

2.1.2.1 1,2-, 3,10- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol



Zur Identifizierung des 1,2- bzw. 3,10- β -Myrcendihydrodiols **8** und **9** wurde das β -Myrcen **1** einer Oxidation mit Kaliumpermanganat unterworfen (Fauchet *et al.*, 1993). Als Hauptprodukte entstehen die beiden Diole **8** und **9**. 6,7- β -Myrcendihydrodiol **10** wurde als Nebenprodukt ebenfalls nachgewiesen.

Die beiden Hauptprodukte wurden säulenchromatographisch an Kieselgel 60 isoliert und als Reinsubstanzen für die NMR-Spektroskopie sowie für weitere Umsetzungen zugänglich gemacht (zur Synthesevorschrift siehe 5.4.1). Die Strukturen der Diole **8** und **9** wurden mittels NMR-Spektroskopie durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen mit Literaturdaten eindeutig identifiziert (5.4.1; Fauchet *et al.*, 1993)

In den Abbildungen 2.5 und 2.6 sind die Massenspektren von 1,2- und 3,10- β -Myrcendihydrodiol als Synthese- und Biokonversionsprodukt nebeneinander dargestellt. Die jeweiligen Massenspektren sind identisch.

Als alkoholische Verbindungen neigen sie in der EI-Ionenquelle zu dehydratisieren. Sie weisen daher kein intensives Molekülion auf. Das Molekülion bei m/z 170 war lediglich in Spuren bei 1,2- β -Myrcendihydrodiol

detektierbar (Abb. 2.6). Beide Diole wurden deshalb mit BSTFA silyliert und lieferten jeweils ein Molekülion bei m/z 314, was einer doppelten Silylierung entspricht (5.4.1). Damit wurde die Molekülmasse von 170 u bestätigt. Die Silylierung erfolgte sowohl am Synthese- als auch am Biokonversionsprodukt.

Zur Strukturbestätigung beider Diol-Verbindungen folgte die Prüfung auf Chiralitätszentren. Zu diesem Zweck wurde eine chiro-spezifische GC-Chromatographie durchgeführt. Bei beiden Biokonversionsprodukten kam es zur Peakauflösung. Auf der Basis der Peakflächen wurden ee-Werte von 47,0 % für das 1,2-Diol **8** und von 44,4 % für das 3,10-Diol **9** bestimmt. Damit wurde das Vorhandensein beider Enantiomere und somit je eines Chiralitätszentrums nachgewiesen. Eine chiro-spezifische Trennung der Syntheseprodukte ergab keinen Enantiomerenüberschuss. Es handelte sich somit um Racemate.

Die Identifizierung von 6,7- β -Myrcendihydrodiol **10** erfolgte ebenfalls durch Vergleich der Massenspektren synthetisierter und biochemisch gewonnener Spezies. Die Strukturbestätigung des Synthese-Produktes erfolgte durch Vergleich mit einem literaturbekanntem Massenspektrum (Barrero *et al.*, 1992). In der Abb. 2.7 ist je ein Massenspektrum des Synthese- und Biokonversionsproduktes dargestellt. Die Massenspektren sind identisch. Der Basis-Peak bei m/z 59 belegt die charakteristische α -

Spaltung zwischen C6 und C7. Die meisten Signale resultieren jedoch durch Fragmentierungen der entsprechenden Dehydratisierungsprodukte.

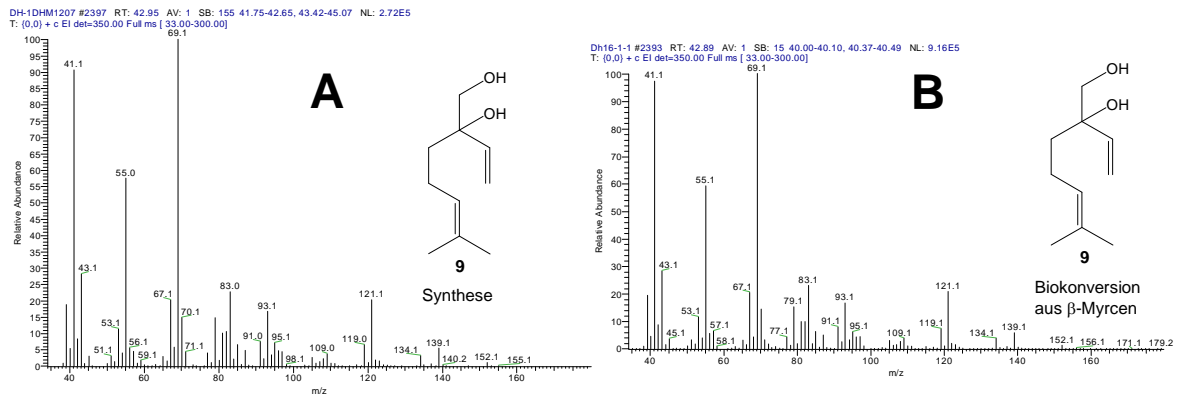


Abbildung 2.5: Massenspektrum von 3,10-β-Myrcendihydrodiol **9** als Synthese- (A) und Biokonversionsprodukt (B); [EI, 70 eV]

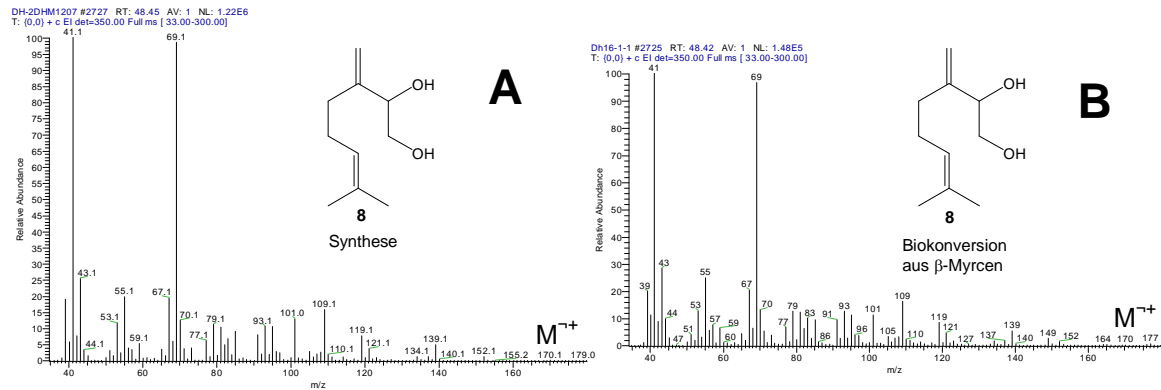


Abbildung 2.6: Massenspektrum von 1,2-β-Myrcendihydrodiol **8** als Synthese- (A) und Biokonversionsprodukt (B); [EI, 70 eV]

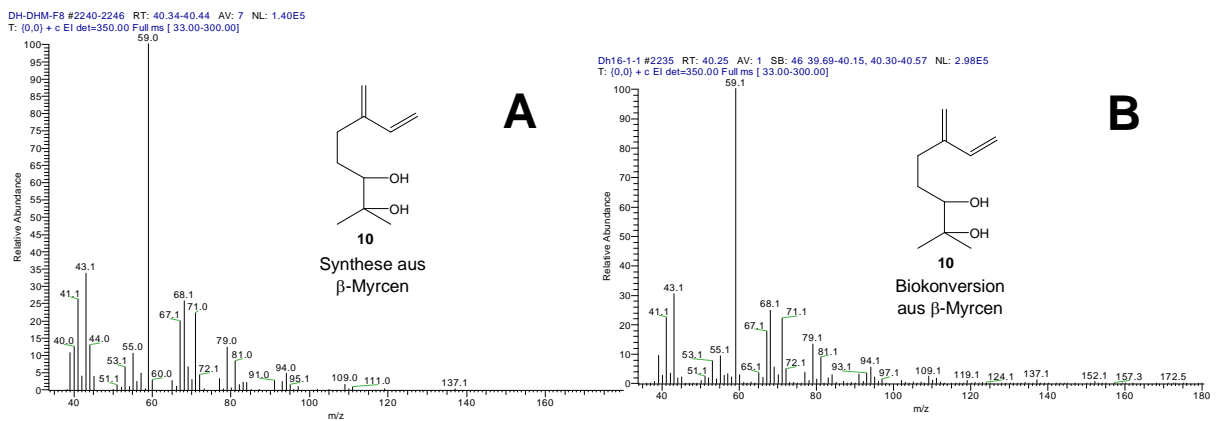
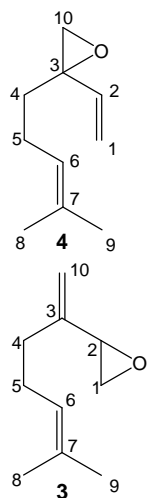


Abbildung 2.7: Massenspektren von 6,7-β-Myrcendihydrodiol **10** als Synthese- A und Biokonversionsprodukt von β-Myrcen B; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.2.2 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen sowie deren Isomerisierungsprodukte



1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen **3** und **4** wurden in einer 2-stufigen Umsetzung des entsprechenden 1,2- **8** bzw. 3,10- β -Myrcendihydrodiols **9** chemosynthetisch nach Fauchet *et al.* erhalten (zur Synthese der beiden Diole siehe Unterkapitel 2.1.2.1). Die Synthesestrategie beruhte auf selektiver Tosylierung primärer Hydroxylgruppen und Behandlung der entstandenen α -Hydroxytosylate **19** und **20** mit desaktiviertem, neutralem Aluminiumoxid unter Cyclisierung zu den entsprechenden Epoxiden **3** und **4** (Fauchet *et al.*, 1993, Kapitel 5.4.1; Abb. 2.8). Beide Epoxide wurden säulenchromatographisch an Kieselgel 60 durch Elution mit n-Pentan-Diethylether (7/3; v/v) isoliert und kernresonanzspektroskopisch untersucht, wobei die ^1H - und ^{13}C -Signale mit literaturbekannten Daten identisch waren (Fauchet *et al.*, 1993, Kapitel 5.4.1).

Durch GC-MS-Messung waren ebenfalls Massenspektren zugänglich, die zur Produktidentifizierung herangezogen wurden.

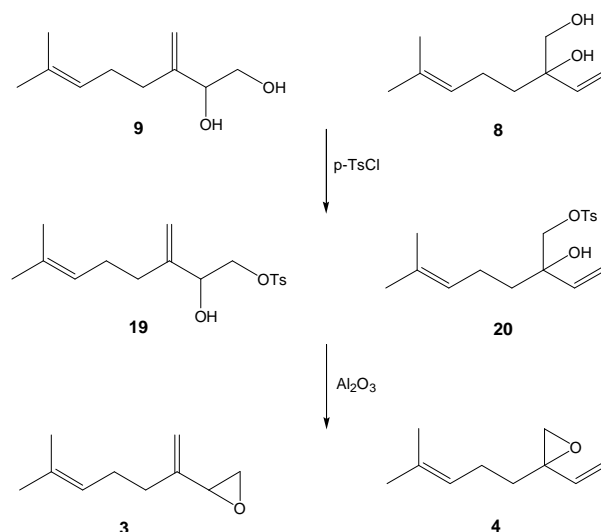


Abbildung 2.8: Syntheseweg zur Herstellung von 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen (**3** und **4**) aus 1,2- bzw. 3,10- β -Myrcendihydrodiol (**8** und **9**) über die Zwischenstufen 2-Hydroxy-1-tosyloxy-1,2-dihydro-**19** und 3-Hydroxy-10-tosyloxy-3,10-dihydro- β -myrcen **20** (Fauchet *et al.*, 1993)

Der Nachweis beider Epoxide im Zellinneren als Biokonversionsprodukte wurde durch direkten Vergleich der entsprechenden Massenspektren erbracht. Die Fragmentierungsmuster der synthetisierten Spezies und der Biokonversionsprodukte sind identisch (Abb. 2.9 und 2.10). Neben der charakteristischen Prenylmasse m/z 69 sind viele Signale erst nach mehreren komplexen Umlagerungs- und Zersetzungsreaktionen als Fragmentationen zu erklären. Das Massenspektrum des 1,2-Epoxids **3** zeigt, dass bei monoterpenoiden Prenylderivaten mit doppeltallylischer Bindung zwischen C4 und C5 ein einfaches

Massenspektrum mit zwei Hauptfragment-Ionen resultiert. Die Prenylmasse m/z 69 und ein Massenpeak bei m/z 41 sind gegenüber anderen Signalen stark hervorgehoben. Beim Fehlen einer doppeltallysichen Stellung wie beim 3,10-Epoxid **4** resultiert dagegen ein komplexeres Massenspektrum mit charakteristischem Fragmentierungsmuster (Abb. 2.9).

Bei der Synthese entstanden auch Nebenprodukte. Laut NMR-Strukturdaten erfolgte eine Isomerisierung zu den entsprechenden Aldehyden (Abb. 2.11). Bei der Synthese des 1,2-Epoxids **3** entstand als Nebenprodukt Citral **21**. Dieses wurde durch Vergleich mit Strukturdaten und Retentionsindizes der kommerziell bezogenen Standards identifiziert. Als Nebenprodukt des 3,10-Epoxids **4** entstand 2-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22**.

Da dieser Aldehyd **22** als isomerenreines Produkt entstand, kann von einer stereoselektiven Umlagerung und somit einer Z-Konfiguration dieser Verbindung ausgegangen werden.

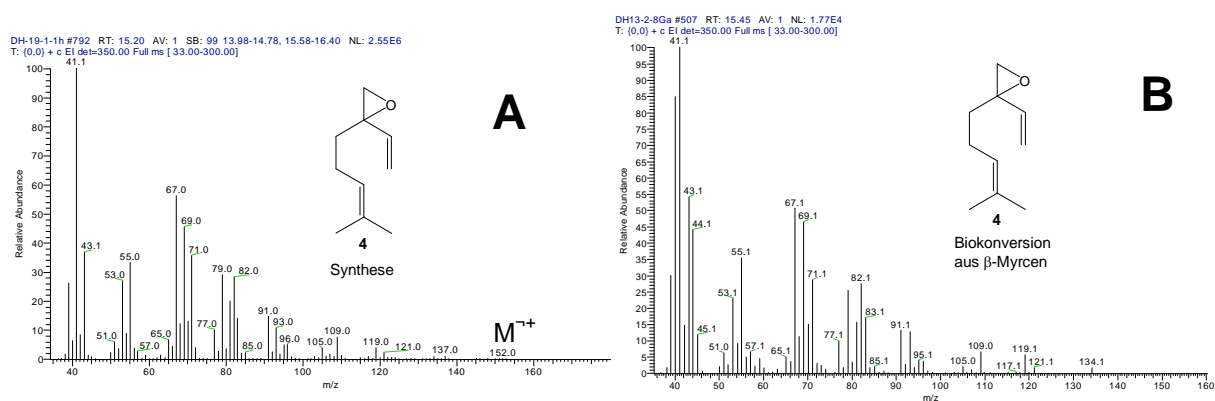


Abbildung 2.9: Massenspektrum von 3,10-Epoxy-β-Myrcen **4** als Synthese- (A) und Biokonversionsprodukt (B); [EI, 70 eV]

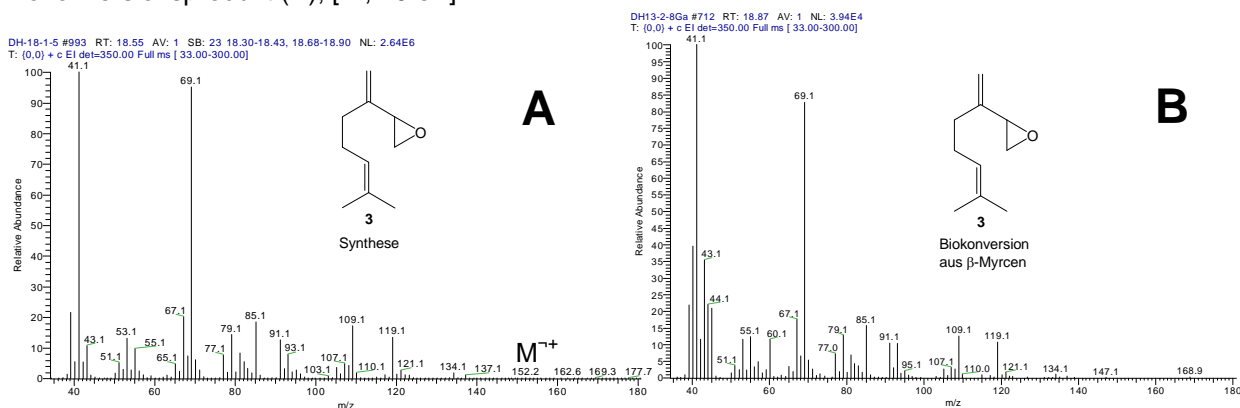


Abbildung 2.10: Massenspektrum von 1,2-Epoxy-β-Myrcen **3** als Synthese- (A) und Biokonversionsprodukt (B); [Quadrupol, EI, 70 eV]

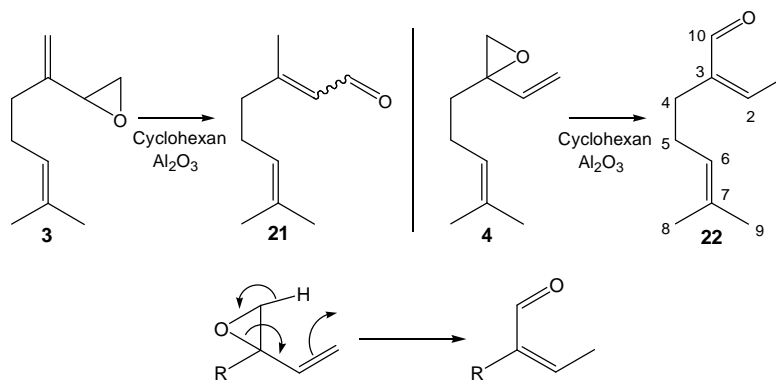


Abbildung 2.11: Isomerisierung von 1,2-Epoxy-β-myrcen **3** zum Citral **21** (Fauchet *et al.*, 1999) und analoge Umlagerung von 3,10-Epoxy-β-myrcen **4** zum 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22**

Die Strukturaufklärung des Aldehyds **22** erfolgte mittels ¹H- und ¹³C-NMR (Tab. 2.2). ¹H-Signale des Prenylrestes wurden den chemischen Verschiebungen $\delta_{\text{H}} = 1,56$ (3H, s, -CH₃_{cis}), 1,66 (3H, s, -CH₃_{trans}), 2,04 (2H, d, CH-CH₂-CH₂), 2,27 (2H, t, CH₂-CH₂-C) und 5,09 (1H, th, C-CH-CH₂) durch Vergleich mit anderen monoterpenoiden Prenylderivaten zugeordnet. Die Aldehydfunktion wurde durch das Singulett bei $\delta_{\text{H}(10)} = 9,76$ eindeutig nachgewiesen. Das Fehlen einer Kopplung des Aldehyd-Protons entspricht einem sp²-hybridisierten C-Atom in α-Stellung und damit einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Deutlich zu erkennen ist die Kopplung der drei Methylprotonen an C1 mit dem einsamen, olefinischen Proton an C2. Das Signal erscheint erwartungsgemäß als Dublett bei $\delta_{\text{H}(1)} = 1,98$. Entsprechend ist das Signal des olefinischen Protons an C2 bei $\delta_{\text{H}(2)} = 6,57$ in ein Quartett aufgespalten. Das Kopplungsmuster zeigt, dass die 3 Methylprotonen an C1 die einzigen Kopplungspartner sind und bestätigt, dass am C-Atom in Position C3 keine Protonen gebunden sind und zwischen C2 und C3 eine Doppelbindung resultieren muss. Das ¹³C-NMR-Spektrum enthielt alle 10 Signale mit chemischen Verschiebungen, die ebenfalls mit den berechneten gut übereinstimmen (Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra®; Tab. 2.2).

Zur Strukturaufklärung wurden durch GC-MS-Messung auch massenspektrometrische Daten herangezogen (Abb. 2.12). Das Molekülion konnte bei m/z 152 gemessen werden. Da der Aldehyd **22** zu einer monoterpenoiden Verbindung mit einer doppeltallylischen Bindung zwischen C4 und C5 gehört, resultierte ein einfaches Massenspektrum mit m/z 41 und 69 als Hauptpeaks, die sich von den übrigen Signalen stark abheben. Das Massenspektrum besitzt dabei die Prenylmasse m/z 69 als Basis-Peak. Das relativ intensive Signal bei m/z 109 deutet auf eine C₃H₇-Abspaltung am Prenylrest nach Umlagerung der prenylischen Doppelbindung hin.

Tabelle 2.2: NMR-Strukturdaten von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22**

Position	¹³ C-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	Multiplizität, J,	¹ H-NMR
C-Atom**	δ(50MHz, CDCl ₃)	δ(ber.)	δ(400MHz, CDCl ₃)	Integral	δ(ber.)*
1	14,8	10,3	1,98	d; ³ J=6,83; 3H	1,71
2	144,4	139,0	6,57	q; ³ J=7,17; 1H	6,65
3	150,0	147,2	-	-	-
4	26,8	30,2	2,27	t; ³ J=7,51; 2H	2,00
5	23,7	23,8	2,03	q; ³ J=7,51; 2H	2,00
6	123,5	122,5	5,08	th; ³ J=7,17; 1H	5,20
7	132,3	133,9	-	-	-
8	17,6	19,3	1,56	d; ⁴ J=1,03; 3H	1,71
9	25,6	25,3	1,66	s, 3H	1,71
10	195,0	190,0	9,35	s, 1H	9,68

** Nummerierung wie bei β-Myrcen (Abb. 2.11); * ChemdrawUltra®

Das Signal bei m/z 124 mit der Differenz zur Molekülmasse von 28 u lässt sich mit einem CO-Verlust erklären (Hesse *et al.*, 1995).

Die Z-Konfiguration der Doppelbindung zwischen C2 und C3 lässt sich bereits aus dem Reaktionsmechanismus der stereoselektiven Synthese ableiten (Abb. 2.11). Durch die Verwendung eines aprotischen Lösungsmittels (Cyclohexan) und die Tatsache, dass gemäß Gaschromatographie des isolierten Produkts eine stereoisomerenreine Verbindung entstand, kann von dem in Abb. 2.11 dargestellten cycloelektronischen Mechanismus ausgegangen werden (5.4.1).

Der Spektrenvergleich ergab, dass 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22** in Konversions-extrakten nicht nachgewiesen wurde. Der Aldehyd **22** war für die vorliegende Arbeit dennoch von Bedeutung, da durch den Einsatz in Dosierungsversuchen ebenfalls eine Untersuchung auf Konversion erfolgte. Hier stand eine mögliche Cyclisierung zu furanoiden Spezies im Vordergrund. Das Ergebnis ist in 2.4.5 aufgeführt.

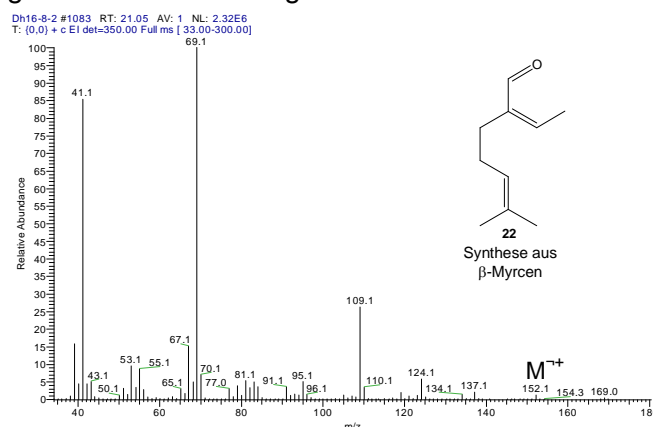
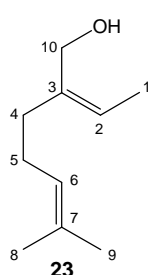


Abbildung 2.12: Massenspektrum von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **49** als Syntheseprodukt [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.2.3 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol



Der Alkohol 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23** ist eine Verbindung, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit als Biokonversionsprodukt des β -Myrcens und Zwischenstufe der Perillenbiogenese in Erwägung gezogen wird. Um diese Verbindung zugänglich zu machen, wurde das 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22** einer Reduktion mit DIBAL-H unterzogen (zur Synthese des Aldehyds siehe 2.1.2.2). Die Strukturaufklärung des Alkohols **23** erfolgte mittels NMR und MS.

Die Prenyl-Signale der NMR-Spektren entsprechen weitgehend denen des Aldehyds **22**. Alle chemischen Verschiebungen stimmen mit den berechneten gut überein (Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra[®]; Tab. 2.3) und wurden durch Aufnahme von $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-, HMBC- und HMQC-Spektren bestätigt. Charakteristisch ist die vicinale Kopplung zwischen den drei Methylprotonen an C1 und dem olefinischen Proton an C2. Durch Aufnahme eines 2D-korrelierten $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrums konnte zusätzlich eine schwache Kopplung zwischen C1- und C10- sowie zwischen C2- und C10-Protonen beobachtet werden. Da die in Nachbarschaft zum O-Atom befindlichen Methylenprotonen an C10 als enantiotope AB-Gruppe zufällig isochron sind, ergibt sich dort ein verbreitertes Singulett-Signal mit einem 2H-Integral. Die Zuordnung aller ^{13}C -Signale erfolgte über direkte C-H-Kopplungen des HMQC-Spektrums. Die Identifizierung der CH_2 -Gruppen an C4, C5 und C10 konnte durch Anwendung der DEPT-Technik erreicht werden. Für die Zuordnung der beiden quaternären C-Atome an C3 und C7 wurde neben den chemischen Verschiebungen auch das HMBC-Spektrum mit C-H-*long-range*-Kopplungen herangezogen (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.3: NMR-Strukturdaten von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23**

Position C-Atom	^{13}C -NMR $\delta(500\text{MHz, CDCl}_3)$	^{13}C -NMR $\delta(\text{ber.})^*$	^1H -NMR $\delta(500\text{MHz, CDCl}_3)$	Multiplizität, J, Integral	^1H -NMR $\delta(\text{ber.})^*$
1	13,0	10,8	1,62	d, $^3J=6,80$, 3H	1,71
2	121,6	116,3	5,50	q, $^3J=7,25$, 1H	5,46
3	139,6	144,1	-	-	-
4	27,8	34,0	2,10	m, 2H	2,00
5	26,8	24,3	2,07	m, 2H	2,00
6	124,1	122,5	5,11	tm, 1H	5,20
7	132,0	133,9	-	-	-
8	17,6	19,3	1,66	s, 3H	1,71
9	25,7	25,3	1,61	s, 3H	1,71
10	67,4	64,5	4,01	s, 1H	4,20

* ChemdrawUltra[®]

Tabelle 2.4: Heteronucleare Long-range-Kopplungen im ^1H , ^{13}C -korrelierten HMBC-2D-NMR-Spektrum für 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23**; w: weak, m: medium, s: strong

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
(C1)-H	-	s (^2J)	s (^3J)	-	-	-	-	-	-	-
(C2)-H	w (^2J)	-	-	m (^3J)	-	-	-	-	-	m (^3J)
(C4)-H	-	m (^3J)	m (^2J)	-	s (^2J)	w (^3J)	-	-	-	w (^3J)
(C5)-H	-	-	-	m (^2J)	-	-	-	-	-	-
(C6)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(C8)-H	-	-	-	-	-	s (^3J)	s (^2J)	-	s (^3J)	-
(C9)-H	-	-	-	-	-	s (^3J)	s (^2J)	s (^3J)	-	-
(C10)-H	-	s (^3J)	s (^2J)	m (^3J)	-	-	-	-	-	-

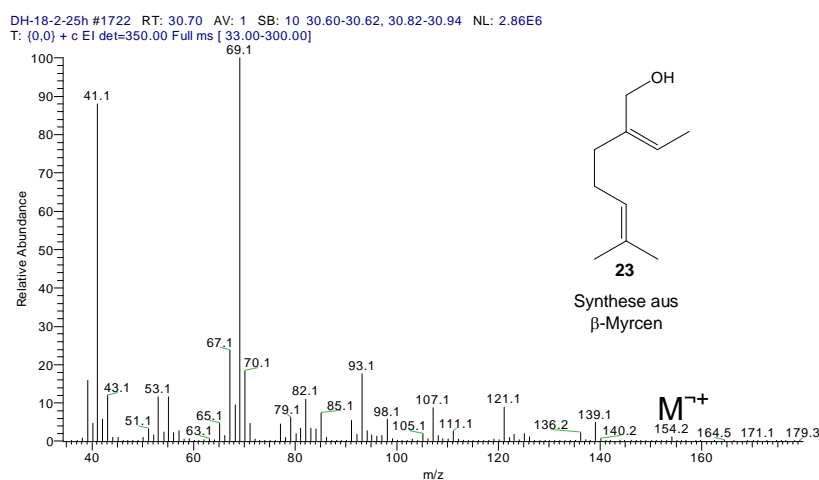
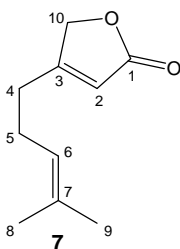
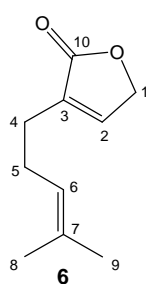


Abbildung 2.13: Massenspektrum von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23** (Syntheseprodukt aus β -Myrcen) [Quadrupol, EI, 70eV]; KI: 1792 (ZB-Wax)

Im Massenspektrum ist das Molekül-Ion bei m/z 154 deutlich zu sehen. Die meisten Peaks konnten weitgehend dem Dehydratisierungsprodukt β -Myrcen zugeordnet werden. Zu den entsprechenden Massen zählen $m/z = 136$ (M^+ von β -Myrcen), 121, 107, 93, 69 und 41. Das Molekül neigt damit in der Ionenquelle zum β -Myrcen zu dehydratisieren (Abb. 2.13).

In Biokonversionsansätzen wurde der Alkohol **23** nicht nachgewiesen. Die Untersuchung auf Biokonversion wird in 2.4.5 behandelt.

2.1.2.4 α,α - und α,β -Acariolid



Die beiden Biokonversionsprodukte α,α - **6** und α,β -Acariolid **7** konnten bereits ohne Chemosynthesen aufgrund ihrer charakteristischen Massenspektren durch Vergleich mit Literaturdaten (Tarui *et al.*, 2002) identifiziert werden. Es sollte jedoch geklärt werden, ob die beiden 2(5H)-Furanone **6** und **7** ebenfalls zu Intermediaten der Perillenbiogenese gehören. Die Notwendigkeit einer Verwendung in Dosierungsversuchen machte eine Synthese des α,α -Acariolids erforderlich. Das 2(5H)-Furanon **6** stellt außerdem einen wertvollen Ausgangsstoff für Synthesen anderer „Acariverbindungen“ wie α,α -Acarilactol **32**, Perillen **2** und α -Z-Acaridiol **12** dar, die zur Aufklärung der Biokonversionswege ebenfalls eingesetzt wurden. Zudem wurde α,α -Acariolid auch in trideuterierter Form aus entsprechend markierter Vorstufe erhalten. Als trideuterierte Vorstufe diente das

kommerziell erhältliche Grignard-Reagenz Trideuteromethylmagnesiumiodid **25***, aus dem 4-Trideuteromethyl-3-pentenylidiod **27*** als Reaktant der Acariolid-Synthese gewonnen wurde. Die Umsetzung erfolgte nach Biernacki (1980) durch Addition dieses Grignard-Reagenzes an die Carbonylgruppe des Cyclopropyl-methylketons **24** und anschließender Behandlung mit 30%-iger Schwefelsäure. Die Synthese von **27** erfolgte in markierter und nicht markierter Form. Die Einführung der Trideuteromarkierung in das Molekül zeigt die Abb. 2.14.

Die Synthese des α,α -Acariolids erfolgte 4-stufig (Tarui *et al.*, 2002). Als Ausgangsstoff diente α -Brom- γ -butyrolacton **28**, das im ersten Schritt mit einem Überschuss an Dimethylsulfid umgesetzt wurde (Abb. 2.15, Trost *et al.*, 1973). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel 60 wurde das entstandene α -Methylthio-Derivat **29** mit dem Alkenylidiod **27** (zur Synthese siehe Biernacki, 1980) in Gegenwart eines Gemisches aus Lithiumdiisopropylamid (LDA) und Hexamethylphosphorsäureamid (HMPA) in α -Position alkyliert (Herrmann *et al.*, 1973; Tarui *et al.*, 2002).

Als Zwischenprodukt resultierte das α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -methylthio- γ -butyrolacton **30**, das nach chromatographischer Aufreinigung an Kieselgel mit Natriummetaperiodat (NaIO_4) zum α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -methylsulfonyl- γ -butyrolacton **31** oxidiert wurde (Trost *et al.*, 1981). Aufgrund einer beobachteten Zersetzung des Zwischenproduktes **31** während einer gaschromatographischen Trennung wurde wegen offensichtlicher Instabilität dieser Spezies auf weitere Reinigungsschritte des Rohproduktes verzichtet. Zur vollständigen Eliminierung der Methylsulfonylgruppe wurde dann das Zwischenprodukt **31** einer 7-stündigen thermischen Behandlung in Toluol unter Rückfluss unterzogen.

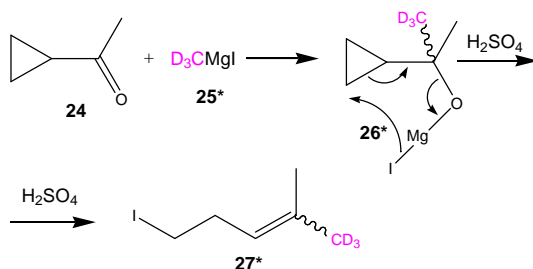


Abbildung 2.14: Synthese von 4-(Trideutero)methyl-3-pentenyl iodid **28** aus Cyclopropylmethylketon **25** und (Trideutero)methylmagnesiumiodid **26** über Grignard-Addukt **27** nach Biernacki (1980)

Es resultierte α,α -Acariolid **6** als Endprodukt. In der Abb. 2.15 ist die zugrunde liegende Synthesestrategie für die trideuteromarkierte Verbindung dargestellt.

Die Zwischenstufen wurden massenspektrometrisch kontrolliert und über direkten Vergleich mit Literaturdaten identifiziert (Tarui *et al.*, 2002). In der Abbildung 2.17 sind die Massenspektren von α,α -Acariolid als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen und als Syntheseprodukt in trideuterierter und nicht isotopenmarkierter Form zusammengestellt.

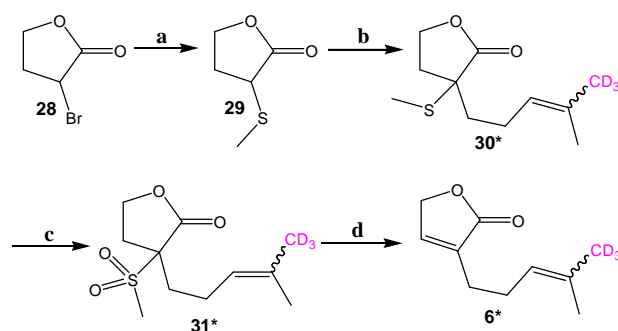


Abbildung 2.15: Synthesestrategie zur Darstellung von (Trideutero)- α,α -Acariolid; **a:** Me₂S; Rückfluss **b:** LDA/HMPA/4-(Trideutero)methyl-3-pentenyl iodid **c:** NaIO₄/MeOH/H₂O // **d:** Toluol/Rückfluss (Tarui *et al.*, 2002)

Das α,α -Acariolid **6** gehört ebenfalls zu einer Verbindung mit doppeltallylischer Stellung zwischen C4 und C5 und liefert dementsprechend ein einfaches Massenspektrum mit der Prenylmasse m/z 69 sowie zwei weiteren intensiven Signalen bei m/z 41 und 98 (Abb. 2.17 **A** und **B**). Von den zuletzt genannten Massen ist das Signal bei m/z 98 sehr charakteristisch. Die Trideuteromarkierung einer der beiden vinyllischen Methylgruppen ermöglichte eine Aufklärung des zugrunde liegenden Fragmentierungsmechanismus, der bereits von Tarui *et al.* postuliert wurde (Abb. 2.16; Tarui *et al.*, 2002). Danach erfolgt bei einer geeigneten Konformation des Moleküls ein Transfer eines allyllischen Methylwasserstoffs der Position C8

und C9 auf die Carbonylgruppe des Furanonringes. Aus welcher Position im Molekül die H-Spezies übertragen wird, wurde jedoch bislang nicht eindeutig bewiesen. Das Trideutero- α,α -Acariolid **6*** liefert ein Massenspektrum, das zusätzlich zu m/z 98 ein Signal bei m/z 99 aufweist (Abb. 2.17 C). Die partielle Massenzunahme um 1 u legt somit einen Deuterium-Transfer von einer der beiden vinylischen Methylgruppen des Prenylrestes auf den Furanonring fest. Der in Abb. 2.16 dargestellte Fragmentierungsmechanismus nach Tarui *et al.* (2002) konnte damit bestätigt werden. Die unterschiedlichen Intensitäten der Signale m/z 98 und 99 (Abb. 2.17 C) deuten auf einen Isotopeneffekt hin, bei dem das Deuteriumlangsamer übertragen wird als das entsprechende H-Atom.

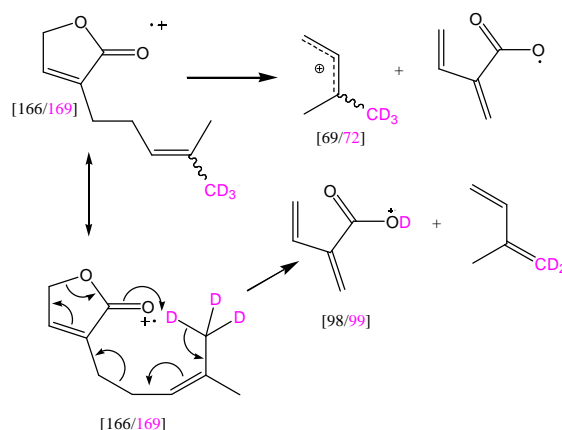
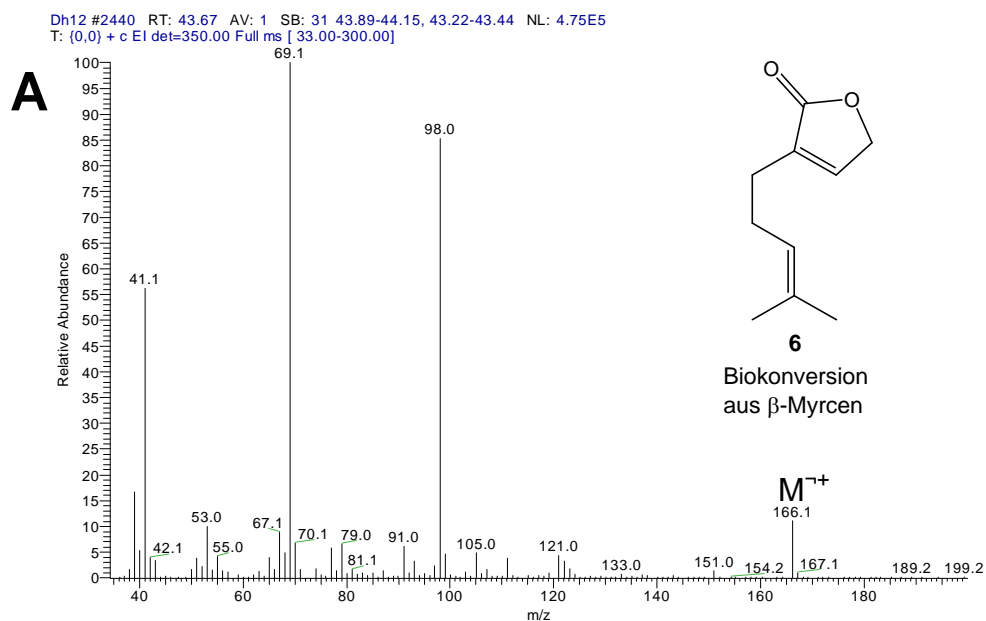


Abbildung 2.16: Fragmentierungsmechanismus von α,α -Acariolid **6** nach Tarui *et al.*

[Quadrupol, EI, 70eV]



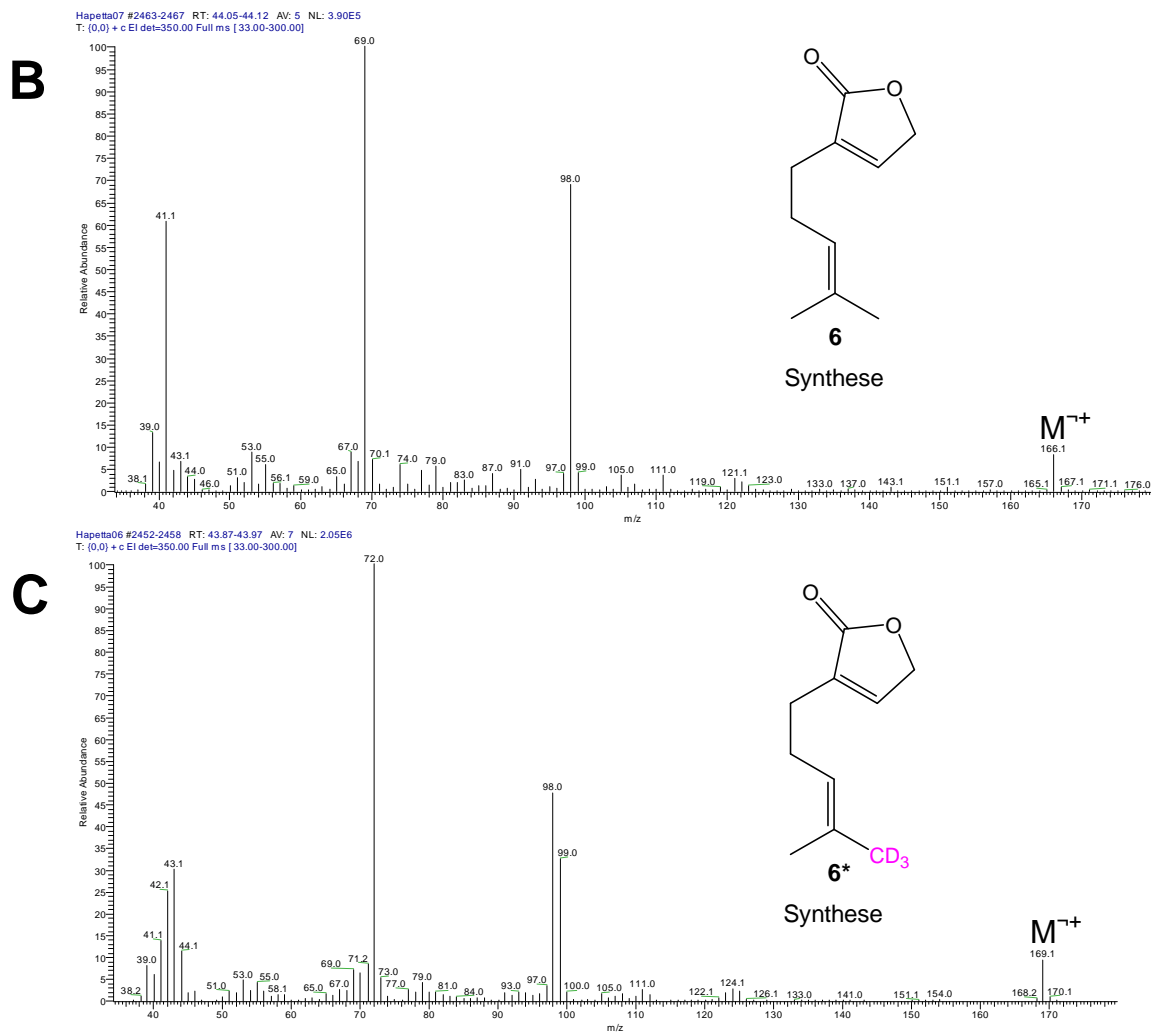


Abbildung 2.17: Massenspektrum von α,α -Acariolid **6** als Biokonversions- **A** und Syntheseprodukt in nicht markierter **B** und in trideuterierter Form **C** [Quadrupol, EI, 70eV]

Die Identifizierung von α,β -Acariolid **7** erfolgte ebenfalls durch Vergleich mit Literaturdaten (Tarui *et al.*, 2003). Die Massenspektren des α,β -Acariolids als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acariolid in markierter und nicht markierter Form (Abb. 2.18 **A** und **B**) können durch Massenschiebungen zur Ableitung des Fragmentierungsmusters ebenfalls herangezogen werden.

Das Fragmentierungsmuster entsprach weitgehend dem des α,α -Acariolids. Der von Tarui *et al.* postulierte H-Transfer auf den Lactonring konnte auch hier durch den Einsatz einer Trideuteromarkierung **7*** bestätigt werden (Tarui *et al.*, 2002). Die Zunahme der Peak-Intensität bei m/z 99 im Massenspektrum zeigte den in der Abb. 2.19 dargestellten Fragmentierungsmechanismus.

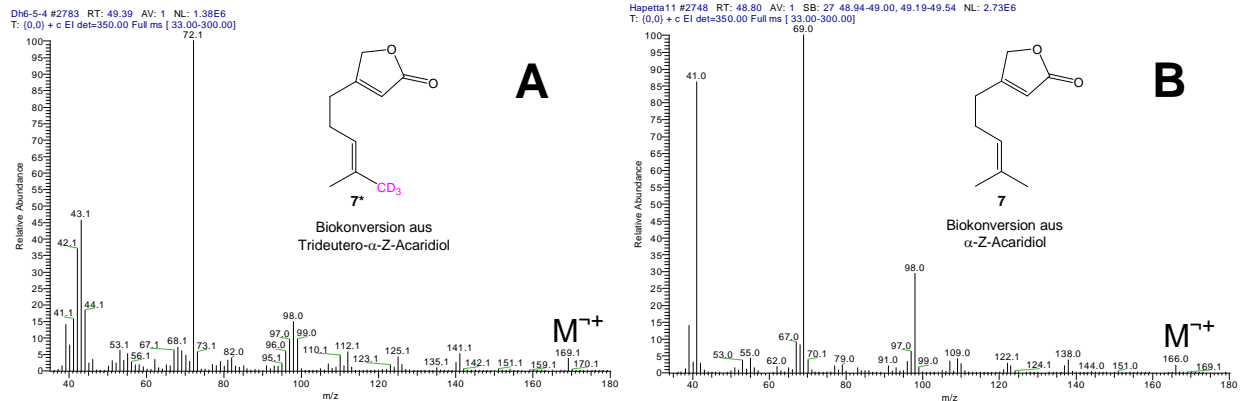


Abbildung 2.18: Massenspektren von α,β -Acariolid **7** als Biokonversionsprodukt aus (Trideutero)- α -Z-Acariolid in markierter **A** und nicht markierter Form **B**; GC-MS-Messung (Quadrupol, EI, 70eV)

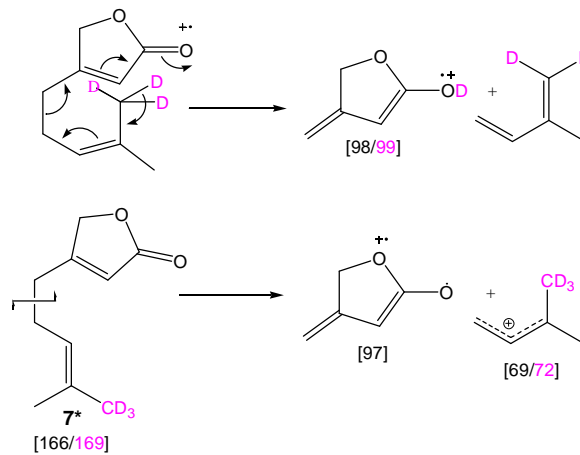


Abbildung 2.19: Fragmentierungsmechanismus von Trideutero- α,β -Acariolid **7*** nach Tarui *et al.* [Quadrupol, EI, 70eV]

Durch den gemessenen Deuterium-Transfer von einer der beiden vinyllischen Methylgruppen auf den Furanon-Ring konnte die Übertragung nach Tarui *et al.* (2002) festgelegt werden (Abb. 2.18). Die Intensität des Signals bei m/z 98 tritt deutlich schwächer in Erscheinung als beim α,α -Isomer. Die Signalschwächung lässt sich durch sterische Effekte erklären. Die größere Entfernung des Alkenylrestes von der lactonischen Carbonylgruppe beim α,β -Acariolid lässt weniger Konformationen zu, bei denen eine ausreichende Annäherung der beteiligten Molekül-Regionen möglich ist. Die H- bzw. D-Übertragung ist damit stärker behindert. Die Frage, welche der beiden vinyllischen Methylgruppen am H-Transfer beteiligt ist, konnte mit diesem Experiment nicht beantwortet werden.

2.1.2.5 α,α -Acarilactol, Perillen und α -Z-Acaridiol

Die Verbindungen α,α -Acarilactol **32**, Perillen **2** und α -Z-Acaridiol **12** wurden zur Strukturbestimmung bzw. für den Einsatz in Dosierungsversuchen ebenfalls synthetisiert. Die Synthese erfolgte durch Reduktion von α,α -Acariolid **6** mit DIBAL-H. Je nach Reduktionsmitteldosis konnte die Reaktion entweder zum α,α -Acarilactol **32** oder zum α -Z-Acaridiol **12** als Hauptprodukt geführt werden (Abb. 2.20). Die erste Verbindung entstand unter 2e (einfache Reduktion), die zweite unter 4e Übertragung (zweifache Reduktion). Das Perillen konnte durch anschließende Behandlung von α,α -Acarilactol mit verdünnter Schwefelsäure quantitativ gewonnen werden. In der Abb. 2.20 ist das entsprechende Syntheschema aufgeführt.

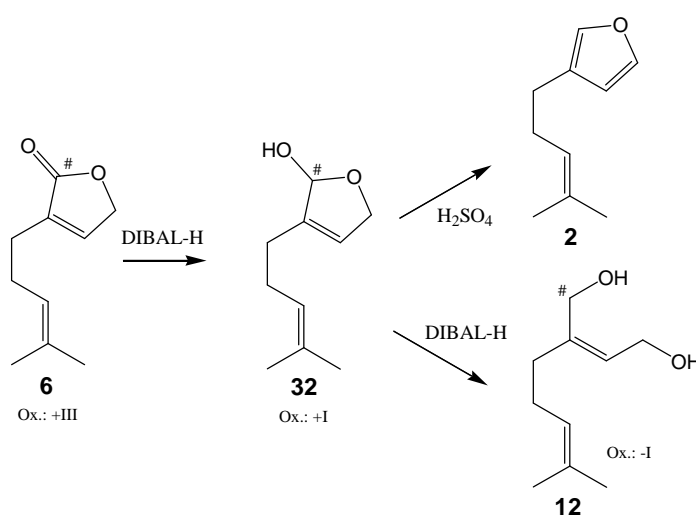


Abbildung 2.20: Synthesestrategie zur Darstellung von α,α -Acarilactol **32**, α -Z-Acaridiol **12** und Perillen **2**; DIBAL-H: Diisobutylaluminiumhydrid; Ox.: Oxidationsstufe; #: C-Atom, auf welches sich die Oxidationsstufe bezieht

Das α,α -Acarilactol **32** erwies sich als eine säureinstabile Verbindung, die sich sehr leicht unter Wassereliminierung zum Perillen zersetzte. Die Wassereliminierung war besonders begünstigt, da hiermit eine Aromatisierung des sauerstoffhaltigen Heterocyclus zur furanoiden Struktur (Hückel-Regel) erfolgte.

Das α,α -Acarilactol wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben, so dass eine Strukturaufklärung mittels 1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie mittels massenspektrometrischer Daten erfolgte. Das Massenspektrum von α,α -Acarilactol ist in Abb. 2.21 dargestellt, wurde jedoch als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen nicht nachgewiesen. Im Fragmentierungsmuster dominieren hauptsächlich die für Perillen typischen Massensignale. Das Perillen resultiert aus der bereits erwähnten thermischen Zersetzung dieses Lactols **32** in der Ionenquelle. Daneben taucht als Gegenpart zur Prenylmasse ein Peak bei m/z 99 auf, der charakteristisch für das α,α -Acarilactol **32** ist (Abb. 2.21).

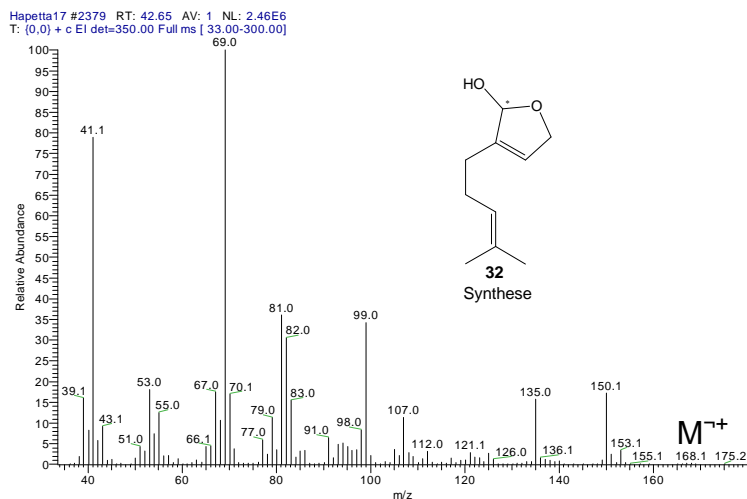


Abbildung 2.21: Massenspektrum von α,α -Acarilactol **32** als Syntheseprodukt [EI, 70 eV, Quadrupol]

Eine Behandlung mit BSTFA lieferte ausschließlich ein einfach silyliertes Molekölion mit der Masse m/z 240 entsprechend einer Molekülmasse des α,α -Acarilactols von m/z 168 und bestätigte so die Existenz einer OH-Gruppe im Molekül (5.4.5). Ein weiteres charakteristisches Signal, das einem einfach silylierten Fragmentation mit der Masse m/z 99 entspricht, tauchte bei m/z 171 auf. Damit wurde gezeigt, dass die OH-Gruppe nicht am Prenylrest lokalisiert ist und das Fragmentation bei m/z 99 durch Allylsplattung zur lactolischen Doppelbindung zwischen C4 und C5 entsteht.

Für die nachfolgende Zuordnung der NMR-Signale gilt die in Abb. 2.22 dargestellte Positionsnummerierung des Kohlenstoffgerüsts. Die gemessenen chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit den berechneten überein (Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra[®]; Tab. 2.5).

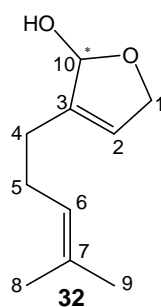


Abbildung 2.22: Nummerierung der Positionen am Kohlenstoffgerüst von α,α -Acarilactol, die bei der Zuordnung der chemischen Verschiebungen in der Tabelle 2.5 berücksichtigt wurde.

Die Anwesenheit des Prenylrestes mit der Masse $M_R = 69$ konnte durch die entsprechenden chemischen Verschiebungen $\delta_{H(4)} = \delta_{H(5)} = 2,2$ (C-CH₂-CH₂-CH), $\delta_{H(6)} = 5,1$ (CH₂-CH=C), $\delta_{H(8)} = 1,6$ (-CH₃ [Z]) und $\delta_{H(4)} = 1,7$ (-CH₃ [E]) bestätigt werden (Tab. 2.5).

Long-range-Kopplungen des HMBC-Spektrums zum C-Atom an C4 von je einem olefinischen Proton an C2 und C6 sowie den Methylenprotonen an C5 sowie Kopplungen zum C-Atom an C5 von dem olefinischen Proton an C6 und den Methylenprotonen an C4 bestätigen die Teilstruktur der benachbarten Methylengruppen des Alkenylrestes. Ebenso zeigen sich Kopplungen der allylischen Methylprotonen an C8 und C9 sowie der Methylenprotonen an C4 und C5 zum olefinischen C-Atom des Prenylrestes an C6. Für die Strukturaufklärung sind ferner Signale des Lactolrings von entscheidender Bedeutung. Die beiden Methylenprotonen an C1 sind diastereotop und zeigen zwei getrennte Signale bei $\delta_{H(1a)} = 4,5$ als „d“ und $\delta_{H(1b)} = 4,7$ als „ddd“. Das Dublett-Signal bei $\delta_{H(1b)} = 4,5$ ist wegen zusätzlicher Aufspaltung leicht verbreitert. Nur eine schwache Kopplung eines der beiden benachbarten Methylen-Protonen an C1 zum olefinischen Proton an C2 konnte im ¹H,¹H-COSY beobachtet werden. Fernkopplungen zu je einem C-Atom an C2 und C3 im HMBC-Spektrum sowie direkte Kopplungen zum C-Atom an C1 bestätigen jedoch die Signale der Methylenprotonen an C1. Durch die Aufnahme des homonuclearen ¹H-Shift-korrelierten Spektrums (¹H,¹H-COSY) konnte darüber hinaus eine Fernkopplung eines der beiden Methylenprotonen an C1 mit dem tert. Methinproton an C10 beobachtet werden. Die Multiplizität des Methinprotons „dd“ an C10 zeigt zusätzlich eine vicinale Kopplung mit dem OH-Proton des Lactol-Ringes. Entsprechend fand sich ein Dublett bei $\delta_{H(OH)} = 3,1$, das dem OH-Proton zugeordnet wird. Diese Kopplung wurde durch ¹H,¹H-COSY bestätigt und im ¹³C,¹H-Shift-korrelierten 2D-NMR-Spektrum (HSQC-Edit) ist gezeigt, dass das Proton bei $\delta_{H(OH)} = 3,1$ keine direkte Kopplung mit je einem C-Atom eingeht. Das Proton muss folglich direkt am Heteroatom gebunden sein. Die Molekülmasse von $M_R = 168$ bestätigt jedoch, dass es sich hier um ein O-Atom handelt (Abb. 2.22). Die Zuordnung der ¹³C-Signale erfolgte ebenfalls über direkte Kopplungen mit Protonen auf der Basis des HSQC-Spektrums (Tab. 2.5). Die chemischen Verschiebungen $\delta_{C(3)} = 141,0$ und $\delta_{C(7)} = 132,2$ zeigen keine direkten Kopplungen und werden somit eindeutig den sp²-hybridisierten quartären C-Atomen an C3 und C7 zugeordnet. Durch die Aufnahme eines ¹³C,¹H-korrelierten HMBC-Spektrums konnten *long-range*-Kopplungen zwischen C- und H-Atomen sichtbar gemacht werden. Dadurch wurden die berechneten Signale (Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra®) der quartären C-Atome in Position C3 und C7 eindeutig bestätigt. So zeigen das olefinische Proton an C2 (²J), eins der Methylenprotonen an C1 (³J) sowie die Methylenprotonen des Alkenylrestes an C4 und C5 je eine *long-range*-Kopplung zum quartären C-Atom an C3. Zu dem zweiten quartären C-Atom am Prenylrest (C7) zeigten sich *long-range*-Kopplungen von den Methylenprotonen an C5 (³J) und den beiden allylischen

Methylprotonen an C8 und C9 und bestätigen, dass am C-Atom in Position C7 kein Proton gebunden ist. Die ^{13}C -Verschiebung an C10 konnte durch *long-range*-Kopplungen von den Methylenprotonen an C1, dem olefinischen Proton an C2 und dem lactolischen OH-Proton ebenfalls bestätigt werden. Eine schwache *long-range*-Kopplung zeigt auch das tert. sp^2 -hybridisierte Ring-C-Atom an C2 mit den beiden Methylenprotonen an C1 jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Alle C-H-*long-range*-Kopplungen sind in der Tab. 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.5: NMR-Strukturdaten von α,α -Acarilactol **32**

Position C-Atom**	$^{13}\text{C-NMR}$ $\delta(125\text{MHz, CDCl}_3)$	$^{13}\text{C-NMR}$ $\delta(\text{ber.})^*$	$^1\text{H-NMR}$ $\delta(500\text{MHz, CDCl}_3)$	Multiplizität,J, Integral	$^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ber.})^*$
1	73,7	65,2	4,5	d; $^2\text{J} = 13,3$ Hz; 1H	4,4
1	73,7	65,2	4,7	ddd; $^2\text{J} = 13,3$	-
2	123,3	121,1	5,8	s; 1H	5,6
3	141,0	143,3	-	-	-
4	26,5	27,8	2,2	m; 2H	2,0
5	25,6	24,6	2,2	m; 2H	2,0
6	123,6	122,5	5,1	m; $\text{J}=5,3\text{Hz}$; 1H	5,2
7	132,2	133,9	-	-	-
8	17,7	19,3	1,6	s; 3H	1,7
9	26,0	25,3	1,7	s; 3H	1,7
10	104,3	105,2	5,9	dd; $^4\text{J}=4,1$ / $^2\text{J}=8,4$; 1H	6,2
O-Atom	-	-	3,1	d; $^2\text{J}=8,4$	2,0

* Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra[®]; ** gemäß Abb. 2.21

Tabelle 2.6: Heteronucleare *long-range*-Kopplungen im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -korrelierten HMBC-2D-NMR-Spektrum für α,α -Acarilactol; w: weak, m: medium, s: strong; Nummerierung: siehe Abb. 2.21

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
(C1)-H	-	w (^2J)	m (^3J)	-	-	-	-	-	-	-
(C1)-H	-	m (^2J)	s (^3J)	-	-	-	-	-	-	m (^2J)
(C2)-H	m	-	m (^2J)	m (^3J)	-	-	-	-	-	s (^3J)
(C4)-H	-	s (^3J)	w (^2J)	-	s (^2J)	s (^3J)	-	-	-	-
(C5)-H	-	w (^4J)	w (^3J)	-	-	-	m (^3J)	-	-	-
(C6)-H	-	-	-	m (^3J)	-	-	-	w (^3J)	w (^3J)	-
(C8)-H	-	-	-	-	-	vs (^3J)	^2J	-	vs	-
(C9)-H	-	-	-	-	-	vs (^3J)	^2J	vs	-	-
(C10)-H	w ($^{3/4}\text{J}$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(OH)-H	-	-	m (^3J)	-	-	-	-	-	-	s (^2J)

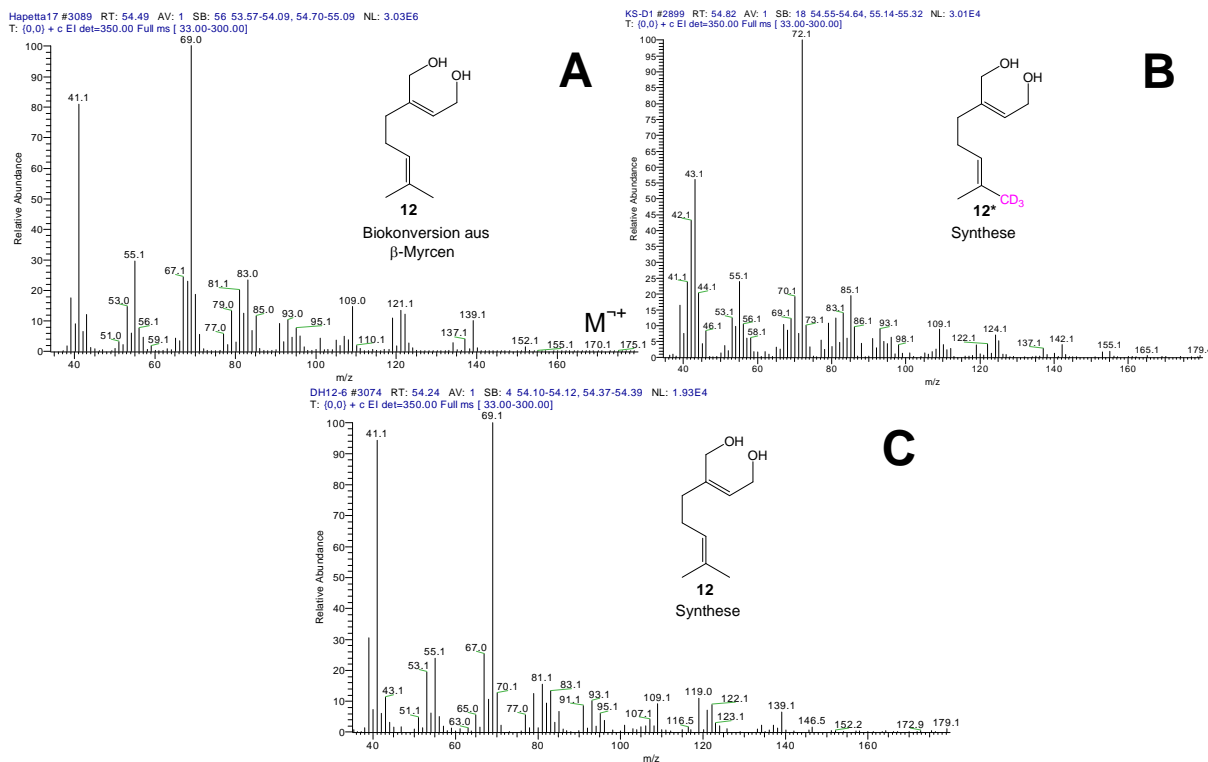


Abbildung 2.23: Massenspektren von α -Z-Acaridiol **12** als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen **A** und als Syntheseprodukt in trideuterierter **B** und nicht markierter Form **C** [EI, 70 eV, Quadrupol].

Die doppelte Reduktion (4e) von α,α -Acariolid **6** liefert das offenkettige α -Z-Acaridiol **12**. Die cyclische Struktur legt zwangsläufig die Z-Konfiguration des α -Acaridiols fest. Die Identifizierung als Biokonversionsprodukt erfolgte massenspektrometrisch über direkten Vergleich mit den Daten des Syntheseproduktes (Abb. 2.23).

Darüber hinaus wurde das Produkt zweimal silyliert, so dass die Molekülmasse auf m/z 314 anstieg und die Anwesenheit zweier Hydroxylgruppen im Molekül zeigte. Das leicht dehydratisierbare Diol **12** besitzt somit eine Molekülmasse von 170 u. Sowohl beim Syntheseprodukt als auch beim Biokonversionsprodukt handelt es sich demzufolge eindeutig um α -Z-Acaridiol. In der Abb. 2.23 sind die Massenspektren von α -Z-Acaridiol als Biokonversions- und Synthese-Produkte zusammengestellt, wobei das Massenspektrum des Synthese-Produktes in trideuterierter und in nicht markierter Form zugänglich war. Die markierte Form war aus dem Trideutero- α,α -Acariolid **6*** zugänglich.

Perillen wurde über den Vergleich des Kovats-Index und des Massenspektrums mit den entsprechenden Literaturdaten (Suzuki *et al.*, 1992) identifiziert. Das Massenspektrum von Perillen als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen ist in der Abb. 2.24 dargestellt.

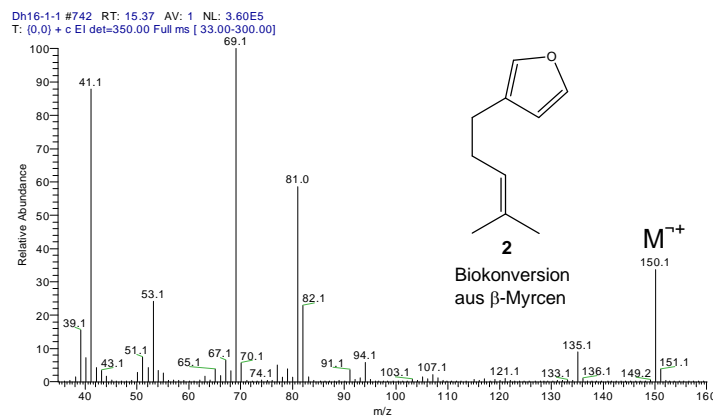


Abbildung 2.24: Massenspektrum von Perillen **2** [EI, 70eV; Quadrupol]

2.1.2.6 α -Z-Acariolal

Die Identifizierung von α -Z-Acariolal **14** als Zwischenstufe der Perillenbiogenese erfolgte durch Massenspektrenvergleich mit literaturbekanntem α -Acariolal (Shimizu *et al.*, 2003). Um die Z-Konfiguration des Hydroxyaldehyds **14** zu bestätigen, wurde das α,α -Acarilactol **32** über Nacht im sterilen Nährmedium (SNL) bei pH 6 geschüttelt, das Nährmedium mit n-Pentan/Diethylether-Azeotropgemisch extrahiert und der Extrakt massenspektrometrisch untersucht. Als Nebenprodukt des α,α -Acarilactols entstand nach Ringöffnung eine Verbindung, die sowohl bezüglich des Fragmentierungsmusters als auch des Kovats-Index mit dem entsprechenden Biokonversionsprodukt von β -Myrcen übereinstimmte. In der Abb. 2.25 sind die beiden Massenspektren zusammengestellt. Durch die Ringöffnung von α,α -Acarilactol ist zwangsläufig die Z-Konfiguration des entstehenden Hydroxyaldehyds gegeben. Das α -Z-Acariolal gilt somit als Konversionsprodukt des β -Myrcens und damit auch als Zwischenstufe der Perillenbiogenese, da dessen Cyclisierung zum Perillen spontan verläuft und somit rein chemische darstellen (Perez Locas *et al.*, 2004).

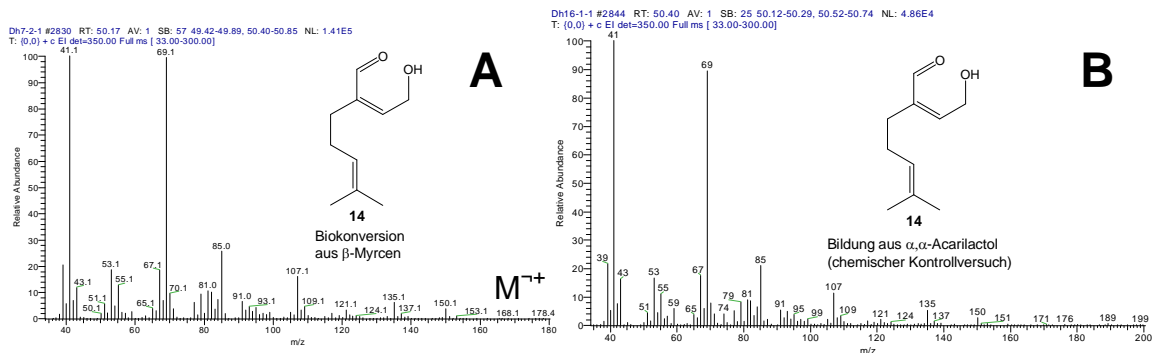


Abbildung 2.25: Massenspektren von α -Z-Acariolal **14** als Biokonversions- **A** und Syntheseprodukt **B** aus β -Myrcen; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.2.7 α,β -Acarilactol

Bei der Konversion von β -Myrcen wurde von den möglichen Acariolactolen **11** (α,β -) und **32** (α,α -) nur das α,β -Isomer postuliert. Die Identifizierung erfolgte durch Reduktion des α,β -Acariolids **7** mittels DIBAL-H. Das α,β -Acariolid **7** wurde zu diesem Zweck durch Konversion von α -Z-Acaridiol durch *P. ostreatus* erhalten. Die Massenspektren von α,β -Acarilactol als Konversionsprodukt von β -Myrcen und als Reduktionsprodukt des biochemisch erhaltenen α,β -Acariolids sind relativ ähnlich und entsprechen weitgehend dem Fragmentierungsmuster von Perillen (Abb. 2.26). Detaillierte Strukturaufklärung wurde jedoch nicht durchgeführt.

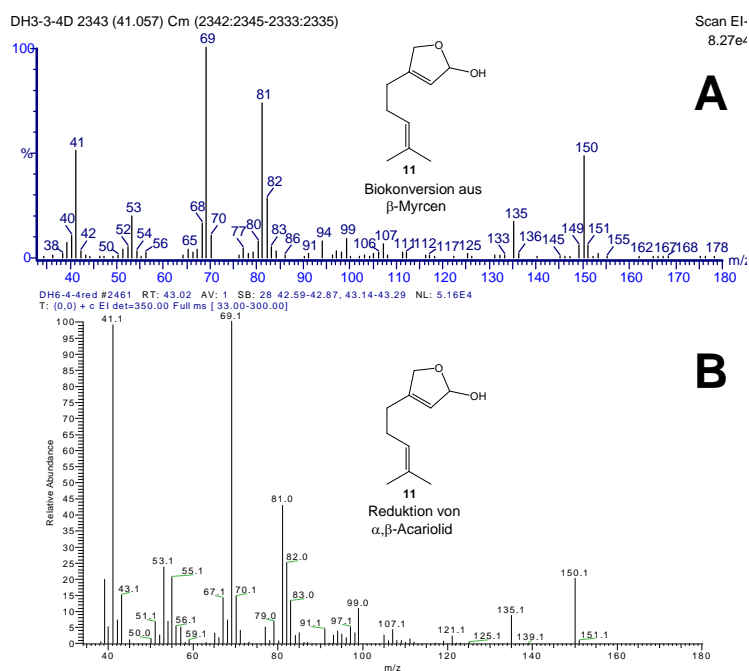


Abbildung 2.26: Massenspektrum von α,β -Acarilactol **11** als Biokonversions- **A** und Syntheseprodukt **B**; GC-MS-Messung; (Quadrupol, EI, 70eV)

2.1.2.8 α -E-Acaridiol

Bei der Gaschromatographie des Biokonversionsextraktes von β -Myrcen eluierte eine um 0,5 min bezüglich des α -Z-Acaridiols **12** stärker retardierte Verbindung mit nahezu identischem Massenspektrum. Da beide Verbindungen zweimal silyliert wurden, muss sich in beiden Fällen um ein Monoterpendiol mit der Molekülmasse 170 u handeln. Für die später eluierte Verbindung wurde somit α -E-Acaridiol **13** postuliert. Eine Synthese von α -E-Acaridiol wurde nicht durchgeführt. Das synthetisierte α -Z-Acaridiol isomerisierte jedoch im chemischen Kontrollversuch geringfügig zu einer Verbindung, deren Massenspektrum mit dem des stärker retardierten Diols identisch war (Abb. 2.27). Da die beiden Massenspektren auch mit einem Literaturspektrum (Leal *et al.*, 1989) von α -E-Acaridiol identisch sind, ist bei dem stärker retardierten Diol das α -E-Acaridiol anzunehmen.

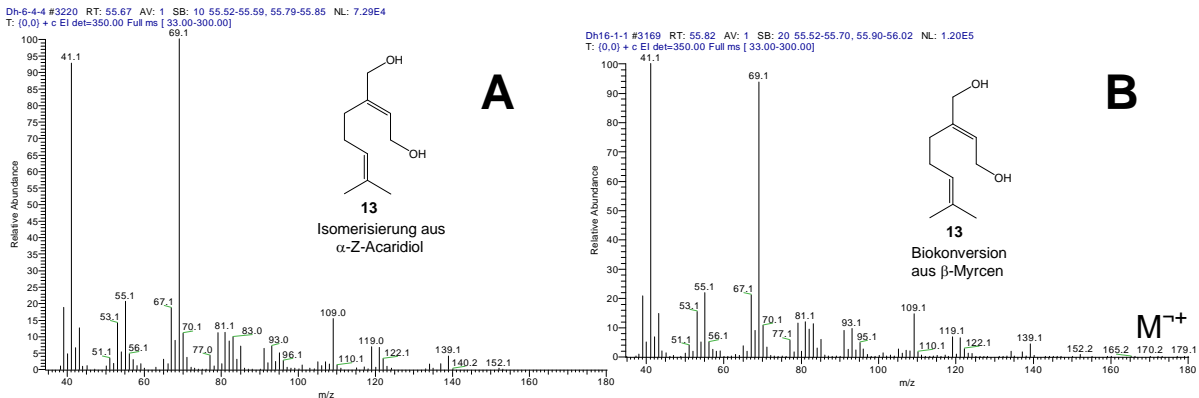
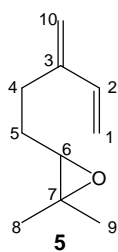


Abbildung 2.27: Massenspektren von α -E-Acaridiol **13** als Isomerisierungsprodukt des α -Z-Acaridiols **A** und als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen **B**; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.2.9 6,7-Epoxy- β -myrcen



Das 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** wurde aus β -Myrcen durch eine selektive Epoxidierung der prenylischen Doppelbindung mit mCPBA hergestellt (Majetich *et al.*, 2003). Die konjugierten Doppelbindungen waren von der Epoxidierung nur geringfügig betroffen. Die Massenspektren des Biokonversions- und Synthese-Produktes wurden aufgenommen und sind in der Abb. 2.28 aufgeführt. Beide Massenspektren sind in ihren Fragmentierungsmustern identisch und zeichnen sich durch Isomerisierungsreaktionen aus.

Zur eindeutigen Identifizierung wurde das Synthese-Produkt auch einer kernresonanzspektroskopischen Untersuchung unterzogen. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale stimmen dabei mit den Literatur-NMR-Daten überein (5.4.9; Rodriguez *et al.*, 1990) und bestätigen die Struktur von 6,7-Epoxy- β -myrcen.

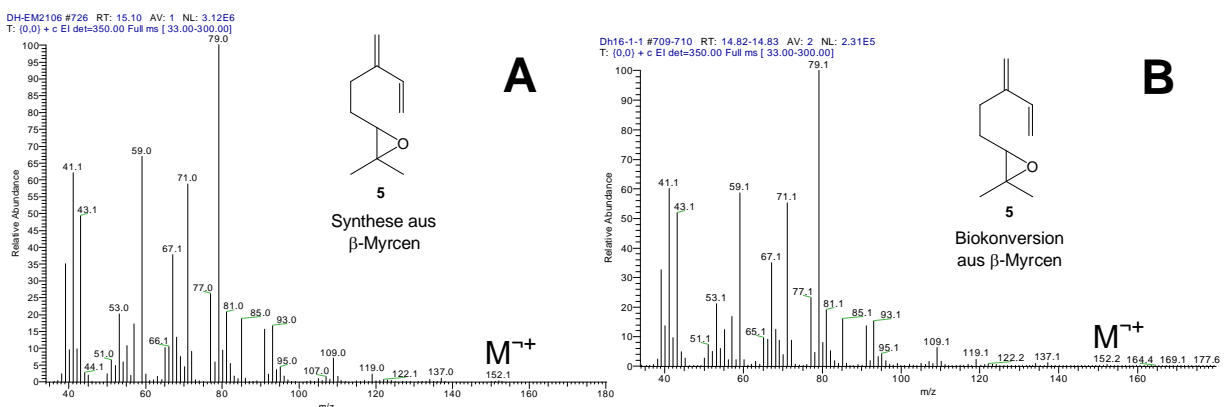


Abbildung 2.28: Massenspektren von 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** als Synthese- **A** und Biokonversionsprodukt **B** von β -Myrcen; GC-MS-Messung (Quadrupol, EI, 70eV)

2.1.2.10 Ipsdienol und Ipsdienon

Die einzige Biokonversion in Form einer direkten allylischen Oxidation am β -Myrcenmolekül erfolgte am Prenylrest an C5. Es resultierten die als Borkenkäferpheromone bekannten Verbindungen Ipsdienol **15** und Ipsdienon **16**. Beide wurden massenspektrometrisch durch Vergleich mit literaturbekannten Daten identifiziert. Die Massenspektren sind in der Abb. 2.29 aufgeführt. Die gemessenen und publizierten Massenspektren sind identisch (Adams, 1995).

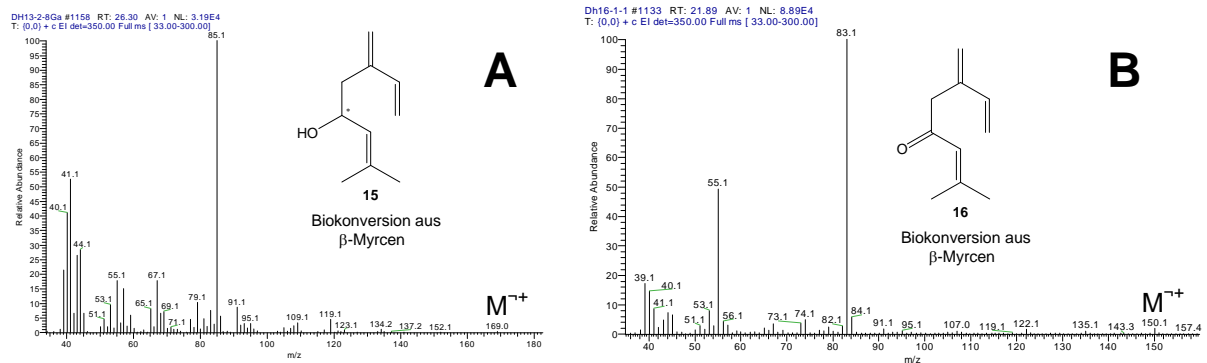


Abbildung 2.29: Massenspektren von Ipsdienol **15** (A) und Ipsdienon **16** (B) als Biokonversionsprodukte von β -Myrcen; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.2.11 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol und 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol

Weitere Monoterpenole des β -Myrcens, die als Biokonversionsprodukte nachgewiesen wurden, waren 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol **17** und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol **18**. Im Gegensatz zum Ipsdienol handelt es sich um Alkohole, die unter Allylumlagerung der prenylischen Doppelbindung entstehen. Die Strukturen wurden massenspektrometrisch durch Vergleich mit Literaturdaten bestimmt (Baekström *et al.*, 1982). Beide Massenspektren sind in Abb. 2.30 dargestellt.

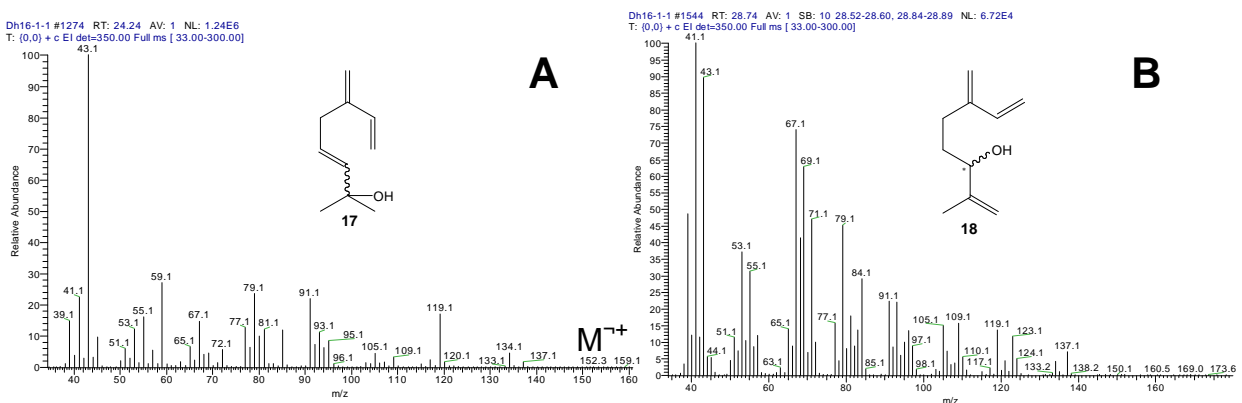


Abbildung 2.30: Massenspektren von 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol **17** (A) und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol **18** (B) als Biokonversionsprodukte von β -Myrcen; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

2.1.3 Kinetik der Produktbildungen

Für die Substratdosierung wurde eine Experimentalkultur im Stadium der maximalen Wachstumsrate verwendet (5. Tag). Die β -Myrcen-Dosierung erfolgte in Schüttelkultur mit $0,71 \text{ g } 200 \text{ mL}^{-1}$ Nährmedium einmalig zu Beginn des Biokonversionsversuches und der Versuch erstreckte sich über vier Tage mit täglicher Probenahme. Hauptkonversionsprodukte waren (1,2- **8**, 3,10- **9** und 6,7-**10**) β -Myrcendihydrodiol (Abb. 2.31)

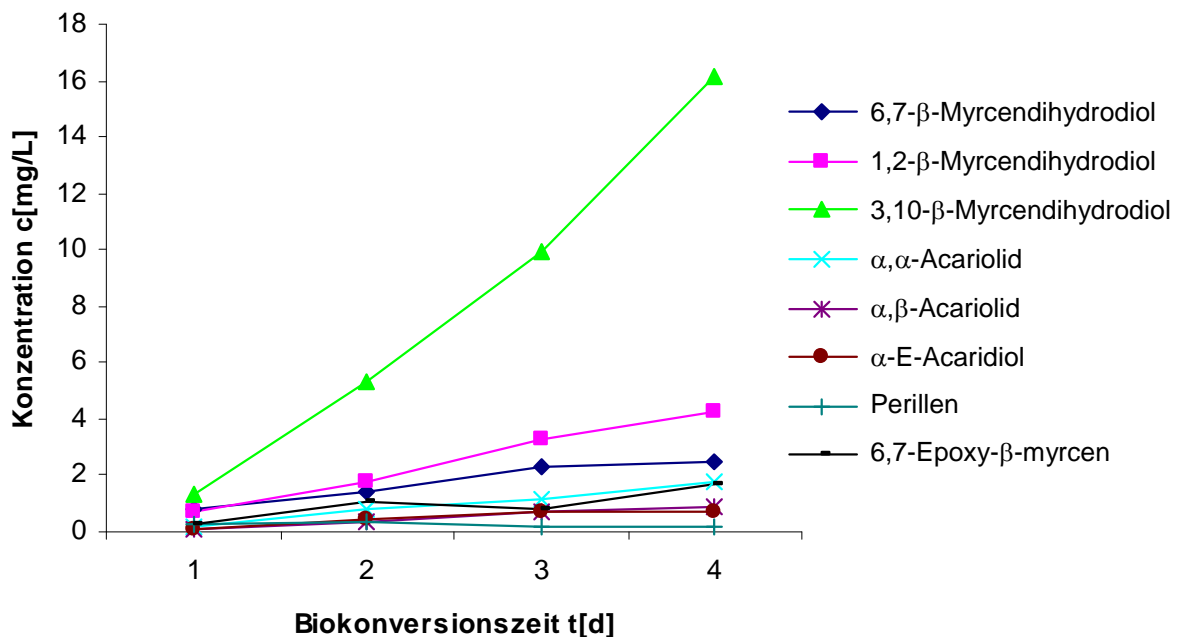


Abbildung 2.31: Bildungskinetik der Metabolite von β -Myrcen durch *P. ostreatus* im Kulturüberstand

Alle drei Verbindungen weisen olfaktorische Eigenschaften mit attraktiven Aromaqualitäten auf. So besitzen 1,2- und 3,10- β -Myrcendihydrodiol süßlich-blumige Noten mit leichten Nuancen nach Honig, während 6,7- β -Myrcendihydrodiol von einem mandelähnlichen, süßen Ton gezeichnet ist (Yamazaki *et al.*, 1988). Biochemische Vorstufen solcher vicinalen Diol sind typischerweise leicht hydrolysierbare Epoxide, die aufgrund ihrer Instabilität in Biokonversionsextrakten schwer nachzuweisen sind. Im Kulturüberstand wurde nur das 6,7-Epoxy- β -myrcen nachgewiesen. Epoxide des konjugierten Doppelbindungssystems 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen wurden erst nach Zellaufschluss mittels einer Kugelmühle in Spuren erfasst (Abb. 2.4). Bildungskinetiken der β -Myrcendihydrodiol sowie des 6,7-Epoxy- β -myrcens über vier Tage sind in der Abb. 2.31 dargestellt.

Die Graphik zeigt eine kontinuierliche Konzentrationszunahme aller vier Produkte. 3,10- β -Myrcendihydrodiol wurde im Laufe der Biokonversionszeit in deutlich stärkerem Maße im Medium angereichert.

Das Auftreten beider Acariolid-Isomere **6** und **7** bei der Dosierung von β -Myrcen deutet insgesamt auf zwei Wege bei der Cyclisierung des α -Z-Acaridiols. Für die Beurteilung des bevorzugten Weges war es deshalb hilfreich, die Bildungskinetiken der Acariolide zu bestimmen (Abb. 2.32).

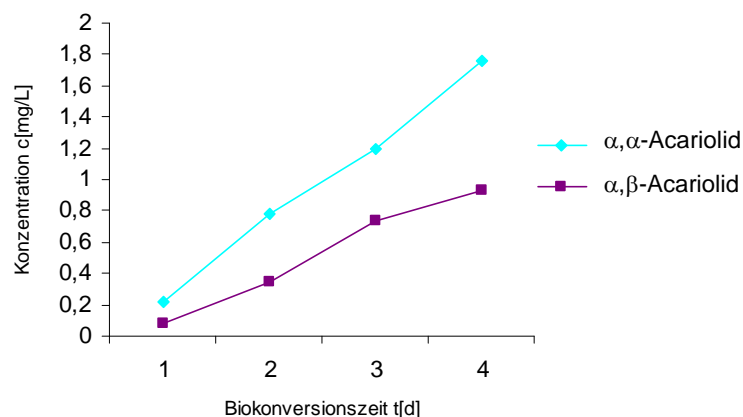


Abbildung 2.32: Bildungskinetiken von α, α - und α, β -Acariolid; einmalige Dosierung von β -Myrcen [$0,71 \text{ g } 200 \text{ mL}^{-1}$]; 5. Kulturtag; Schüttelkultur von *P. ostreatus*; tägliche Probenahme; Ausschnitt der Abb. 2.31

Im Verlauf der Biokonversionszeit zeigte sich im Kulturüberstand eine Anreicherung beider Verbindungen, von denen das α, α -Acariolid gegenüber seinem α, β -Isomer im Verhältnis von etwa 2:1 überwog. Die Frage nach dem bevorzugten Weg der Cyclisierung zum Perillen lässt sich jedoch durch die entsprechende Biokonversion von α -Z-Acaridiol endgültig beantworten. Weitere interessante Bildungskinetiken bei der Biokonversion von β -Myrcen waren die von Perillen und α -E-Acaridiol. Auch hier wurde eine Extraktion des Kulturüberstandes zugrunde gelegt. Das α -Z-Acaridiol konnte im Gegensatz zu seinem E-Isomer nur in Spuren nachgewiesen werden. Der über vier Tage dauernde Dosierungsversuch ergab die in der Abb. 2.33 **A** dargestellten Bildungskinetiken von Perillen und α -E-Acaridiol.

In der Abbildung ist deutlich zu sehen, dass die Konzentration von α -E-Acaridiol ab dem dritten Tag stagnierte. Das Perillen erreichte dagegen am zweiten Tag nach der Substratdosierung ein Konzentrationsmaximum von $0,37 \text{ mg L}^{-1}$. Die Abnahme der Perillenkonzentration war hauptsächlich auf dessen Flüchtigkeit zurückzuführen. Um Perillenverluste über die Abluft nachweisen zu können, wurde ein Wiederfindungsversuch durchgeführt, bei dem das Perillen unter Bedingungen des chemischen Kontrollversuches mit sterilem Nährmedium (SNL) behandelt wurde (Abb. 2.33 **B**).

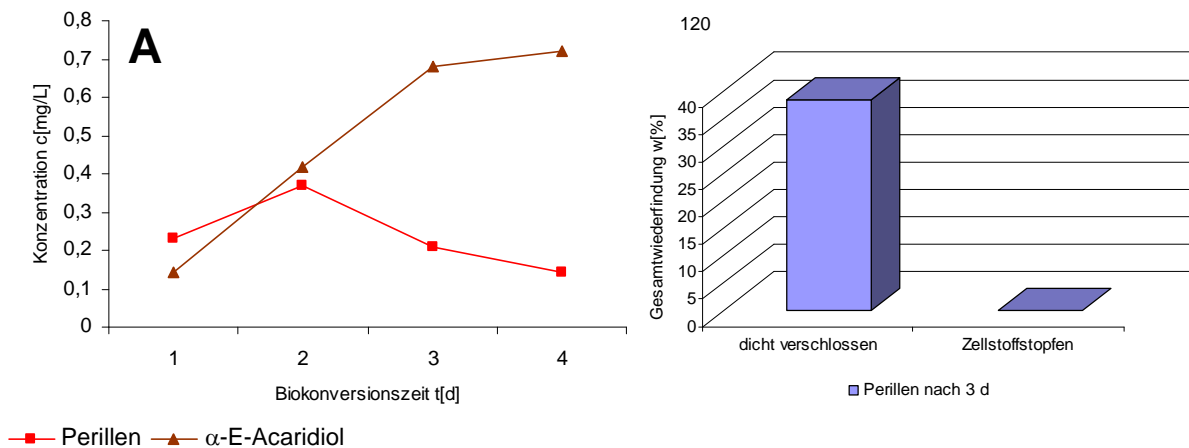


Abbildung 2.33: A: Bildungskinetiken von Perillen und α -E-Acaridiol; einmalige Dosierung von β -Myrcen [$0,71 \text{ g } 200 \text{ mL}^{-1}$] in eine Schüttelkultur von *P. ostreatus*; tägliche Probenahme; Ausschnitt der Abb. 2.31; **B:** chemischer Kontrollversuch unter Dosierung von Perillen mit dicht (Gummistopfen) und durchlässig (Zellstoffstopfen) verschlossenem Erlenmeyer-Kolben; Versuchsdauer: 3 Tage; Dosierung: $38 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$

Es wurden zwei Schüttelkolben angesetzt, wobei der eine dicht, der andere lediglich mit Zellstoffstopfen verschlossen war. Da die Verluste über die Abluft im dichtverschlossenen Kolben während der Agitation des Schüttlers vollständig unterbunden waren, konnte durch Vergleich der Wiederfindungen an Perillen in beiden Versuchsansätzen das Ausmass der Verluste über die Gasphase quantifiziert werden. Die Agitation des Schüttlers dauerte drei Tage. Die Wiederfindung im Versuch mit dem dicht verschlossenen Kolben betrug 38 % und sank beim Übergang zum Experiment mit Zellstoffstopfen auf nahezu 0 % (Abb. 2.33 **B**). Der Unterschied in der prozentualen Wiederfindung zwischen den beiden Versuchsansätzen belegt den Übergang vom Medium in die Gasphase während der Agitation des Schüttlers und erklärt die Verluste des Perillens im Nährmedium.

Die entstandene Bilanzlücke von 62 % im ersten Fall wurde in einem gesonderten Wiederfindungsversuch überprüft. Das Perillen wurde dabei einem sterilen Medium von 50 mL Volumen in Mengen von $79,3 \mu\text{g}$ zugesetzt und direkt ohne Agitation des Schüttlers mit n-Pentan/Diethylether-Azeotrop extrahiert. Mit einer Wiederfindung von 36 % konnte das Ergebnis des Versuchsansatzes mit dicht verschlossenem Kolben (Abb. 2.33 **B**) weitgehend reproduziert werden. Die Bilanzlücke ist somit auf die flüssig-flüssig-Extraktion im Scheidetrichter oder Destillation an der Vigreux-Kolonnen zurückzuführen. Das Auftreten eines Konzentrationsmaximums von Perillen bei der Dosierung von β -Myrcen kann damit als Ergebnis einer Überlagerung der Perillenbiogenese und des Verlustes über die Abluft sowohl während der Agitation des Schüttlers als auch bei der Aufarbeitung gedeutet werden.

Zwecks Bilanzierung der β -Myrcenbiokonversion wurde ein Kultivierungsversuch in einem 2 L-Rührkesselreaktor mit täglicher Dosierung von $3,5 \text{ g } \beta$ -Myrcen durchgeführt. Um Verluste

über die Reaktorabluft zu vermeiden, wurde eine Adsorptionssäule (Lewatit OC 1064) im Abluftraum verwendet, in welcher das β -Myrcen sowie dessen flüchtige Produkte adsorptiv gewonnen wurden. Der Kultivierungsversuch erstreckte sich über 8 d. Innerhalb der ersten beiden Tage erfolgte eine tägliche Dosierung von 0,71 g (1 mL). Da die Analytik des Kulturüberstandes bis auf zwei Diterpene ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) keine weiteren Produkte aufzeigte, wurde die Dosierung ab dem zweiten Biokonversionstag auf 3,5 g (5 mL) pro Tag erhöht. Um das System mit dem Substrat zu sättigen, erfolgte die Dosierung bei unterbrochener Luftversorgung, die nach 2 h wieder aufgenommen wurde. Ab dem dritten Tag wurden die ersten Oxidationsprodukte nachgewiesen. In der Abb. 2.34 sind die Bildungskinetiken der β -Myrcendihydrodiol und des 6,7-Epoxy- β -myrcens dargestellt. Die beiden Epoxy- β -myrcene des konjugierten Dien-Systems wurden in Spuren erst nach Zellaufschluss nachgewiesen und tauchen bei der Kinetik nicht auf.

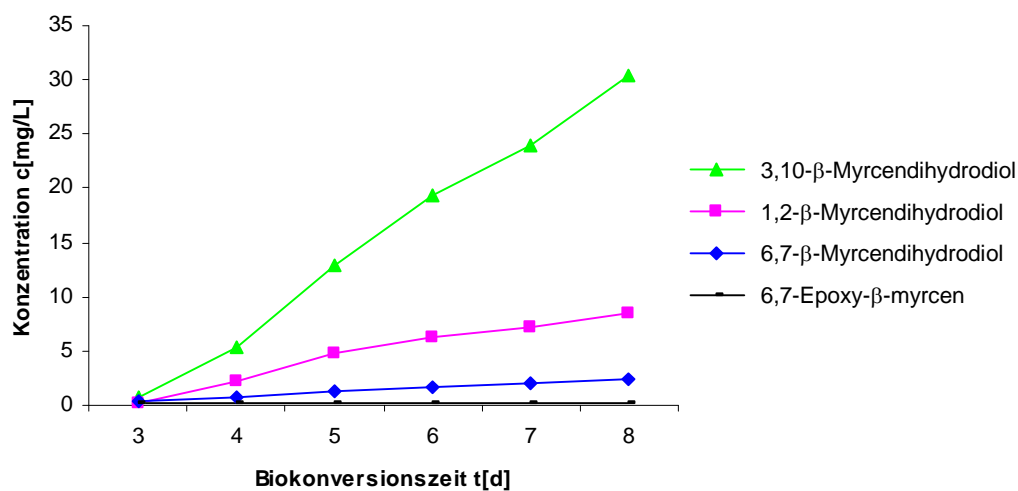


Abbildung 2.34: Bildungskinetiken der β -Myrcendihydrodiol; Analytik des Kulturüberstandes; tägliche Dosierung von β -Myrcen ($3,5 \text{ g 2L}^{-1}$) im Rührkesselreaktor; tägliche Probenahme

Durch die Ausdehnung der Biokonversionszeit auf 8 d konnte die Konzentrationszunahme dieser Verbindungen über längere Zeit verfolgt werden. Die Anreicherung der β -Myrcendihydrodiol im Medium setzte sich bis zum achten Tag fort und nahm in der Reihe 3,10-Diol $>$ 1,2-Diol $>$ 6,7-Diol ab. Um die Bildungskinetik der Diol im weiteren Verlauf der Biokonversionszeit abschätzen zu können, wurden Dosierungsversuche mit 1,2- und 3,10- β -Myrcendihydrodiolen durchgeführt. Ein Abbau konnte jedoch nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zur Schüttelkultur wurden im Kulturüberstand des Bioreaktors Perillen und die „Acariverbindungen“ nicht nachgewiesen.

2.1.4 Bilanzierung der Biokonversion von β -Myrcen

Aufgrund der geringen Bildungsrate konnten weder das Perillen noch die α -Acaridole noch die Acariolide im Bioreaktorversuch nachgewiesen werden. Beim Übergang von der Schüttelkultur zum Bioreaktor verlagerte sich das Produktspektrum zugunsten der vicinalen Diolen. Erst nach Mycelaufschluss am 8. Biokonversionstag wurde das Perillen in Spuren nachgewiesen (Abb. 2.4). Die Gesamtmenge an oxyfunktionalisierten Biokonversionsprodukten im Zellinneren ist in Bezug auf die Gesamtmenge des zudosierten β -Myrcens zu vernachlässigen. β -Myrcen und dessen Dimere waren Hauptbestandteile des Zellinneren (Abb. 2.3). Auf der Lewatit-Säule befand sich ausschließlich das β -Myrcen, das jeden Tag in Mengen von 1 bis 2 g gewonnen wurde. Tab. 2.7 gibt die Verteilung der Komponenten im Bioreaktorsystem und die prozentuale Gesamtwiederfindung wieder.

Tabelle 2.7: Verteilung von β -Myrcen und dessen Produkten im Bioreaktor-System am Ende des Kultivierungsversuchs am 8. Tag der Biokonversionszeit

Mycel (ca. 400g Biofeuchtmasse)	SNL-Überstand (2L)	Abluft (Lewatit OC 1064)	Dosierte Gesamtmenge an β -Myrcen [g]	Gesamtwiederfindung [%]
0,73 g (2,9 %) β -Myrcen Diterpene	0,14 g (0,5 %) β -Myrcen Diterpene Konversionsprodukte	9,26 g (36,6 %) β -Myrcen	25,3 g	40 %

Hier sei allerdings betont, dass es sich hier ausschließlich um gaschromatographisch erfassbare Komponenten handelt. Der Begriff der Gesamtwiederfindung bezieht sich somit auf die Gesamtheit aller GC-chromatographierbaren Substanzen. Die Bilanzierung zeigte eine 40 %-ige Wiederfindung. Die entstandene Bilanzlücke könnte auf Bildung von Oligo- und Polymeren des β -Myrcens und/oder höher oxidierten Biokonversionsprodukten zurückgeführt werden.

Zusammenfassung für 2.1

Hauptkonversionsprodukte von β -Myrcen waren geruchsaktive, vicinale 1,2-, 3,10- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol. Von den entsprechenden Epoxiden konnte nur das 6,7-Epoxy- β -myrcen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Epoxide des konjugierten Doppelbindungssystems, 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen, wurden erst nach Zellaufschluss analytisch erfaßt.

Metabolite des β -Myrcens, die nachgewiesen und im Zusammenhang mit der Perillenbiogenese postuliert wurden, waren 3,10- und 1,2-Epoxy- β -myrcen, α -Z-Acaridiol, α -Z-Acariolal, α,β -Acarilactol sowie das Perillen. Vom α -Z-Acaridiol zum Perillen wurden zwei Biokonversionswege angenommen. Metabolite, die eindeutig nicht zur Perillenbiogenese gehören, waren 1,2-, 3,10- β -Myrcendihydrodiol, α -E-Acaridiol, die Oxidationsprodukte der Acarilactole, α,α - und α,β -Acariolid sowie Biokonversionsprodukte, die durch Umsetzungen des Prenylrestes entstanden sind.

Dazu gehört das 6,7-Epoxy- β -myrcen sowie dessen Hydrolyseprodukt 6,7- β -Myrcendihydrodiol. Unter Produkten allylischer Hydroxylierungen wurden Ipsdienol sowie dessen Oxidationsprodukt Ipsdienon nachgewiesen und identifiziert. Darüber hinaus wurden Alkohole nachgewiesen, die an eine Allylumlagerung der prenylischen Doppelbindung geknüpft waren. Dazu gehörten 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol.

Bildungskinetiken der vicinalen Diol zeigen eine kontinuierliche Anreicherung im Kulturmedium. Beim Übergang von Schüttelkulturen in einen Rührkesselreaktor verlagerte sich das Produktspektrum zugunsten der β -Myrcendihydrodiol.

2.2 Herleitung der Biogenese von Perillen und anderer Metabolite

Auf der Basis der in Kapitel 2.1 aufgeführten und identifizierten Biokonversionsprodukte des β -Myrcens wurden Biogenesewege zum Perillen und anderen Metaboliten hergeleitet. Mit dem Nachweis mehrerer Monoterpene-dihydrodiolen (**8**, **9**, **10**, **12** und **13**) kann formal angenommen werden, dass es sich bei den ersten beiden Schritten zum Diol um die formale Einführung eines Sauerstoffatoms und die 1,4-Addition eines Wassermoleküls handelt (Abb. 2.35). Die zeitliche Abfolge dieser Schritte war zunächst unklar, so dass auch eine 1,4-Hydratisierung des β -Myrcens zu 3-Hydroxymethyl-7-methyl-octa-2(Z),6-dien **23** als initialer Schritt in Erwägung gezogen wurde. Das Produkt **23** sollte anschließend zum α -Z-Acaridiol **12**, einem β -Myrcen-1,10-dihydrodiol, allylisch oxidiert werden (Abb. 2.35).

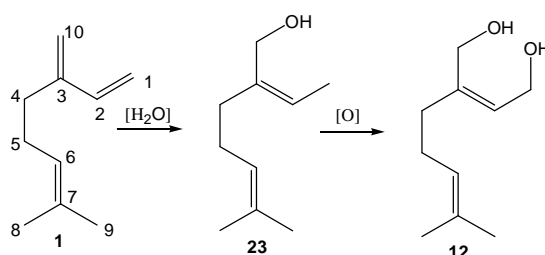


Abbildung 2.35: Hypothese der ersten Reaktionsschritte bei der Biokonversion von β -Myrcen **1** zum α -Z-Acaridiol **12** über die Hydratisierungszwischenstufe 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23**

Durch Zellaufschluss wurden 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen **3** und **4** als Biokonversionsprodukte nachgewiesen. Auch diese beiden Verbindungen kommen als Zwischenstufen der Perillenbiogenese in Frage, wobei der initiale Schritt in diesem Fall eine Epoxidierung einer der konjugierten Doppelbindungen darstellt. Die Epoxy- β -myrcene hydrolysierten zu mehreren β -Myrcendihydrodiolen. Unter ihnen erfüllt jedoch nur α -Z-Acaridiol die notwendige strukturelle Voraussetzung für eine Cyclisierung zum furanoiden Perillen **2** (Abb. 2.36).

Für die weitere Umsetzung zum Perillen über das entsprechende 4-Hydroxy-2-butenal-Derivat ist eine Oxidation nur einer der beiden alkoholischen OH-Gruppen erforderlich. Die Oxidation zweier OH-Gruppen zum Dialdehyd wurde nicht beobachtet. Da beide OH-Gruppen des α -Z-Acaridiols oxidierbar sind, gibt es theoretisch zwei Wege, die zum Perillen führen können. Der Nachweis von α,α -**6** und α,β -Acariolid **7** sowie α,β -Acarilactol **11** als Biokonversionsprodukte deuten auf das Vorhandensein beider Biokonversionswege hin (Abb. 2.36).

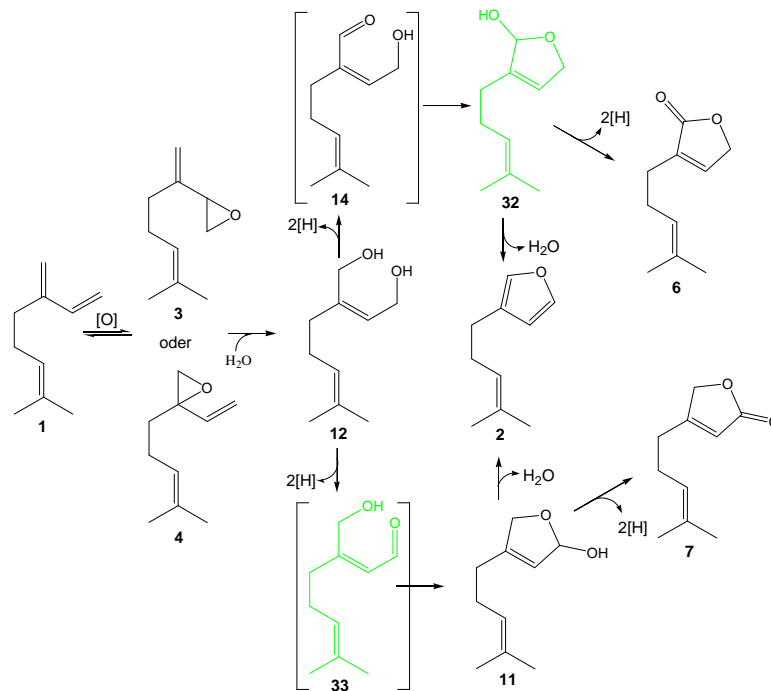


Abbildung 2.36: Aus den identifizierten Myrcenmetaboliten postulierte Biokonversion von β -Myrcen **1** zum Perillen **2** mittels *P. ostreatus* über die Zwischenstufen (1,2- **3** oder 3,10- **4**) Epoxy- β -myrcen, α -Z-Acariol **12**, α -Z-Acariolal **14**, α,α -Acarilactol **32**, 10-Hydroxygeranial **33** (wurde theoretisch hergeleitet), α,β -Acarilactol **11**; α,α - **6** und α,β -Acariolid **7** sind nachgeordnete Biokonversionsprodukte der beiden Lactole **32** und **11** und somit Nebenprodukte der Perillenbiogenese; grün: nicht nachgewiesen als Produkte von β -Myrcen

Die Bezeichnung „Acarilactol“ wurde in der vorliegenden Arbeit für die Verbindungen **11** und **32** zum ersten Mal verwendet, da diese als neue Naturstoffe hier erstmals beschrieben wurden. Diese Bezeichnung knüpft an die Nomenklatur von Tarui *et al.* an (Tarui *et al.*, 2002).

Das 10-Hydroxygeranial **33** wurde analytisch nicht erfasst. Das α -Z-Acariolal **14** entstand dagegen in Spuren im chemischen Kontrollversuch bei pH 6 unter Dosierung von α,α -Acarilactol in ein steriles Medium und wurde durch direkten Vergleich mit Massenspektren der Biokonversionsprodukte von β -Myrcen im Extrakt identifiziert.

Nach der Cyclisierung der entstandenen Hydroxyaldehyde **14**, **33** zu den Halbacetalen **32**, **11** erfolgt eine Wassereliminierung zum Perillen (Perez Locas *et al.*, 2004).

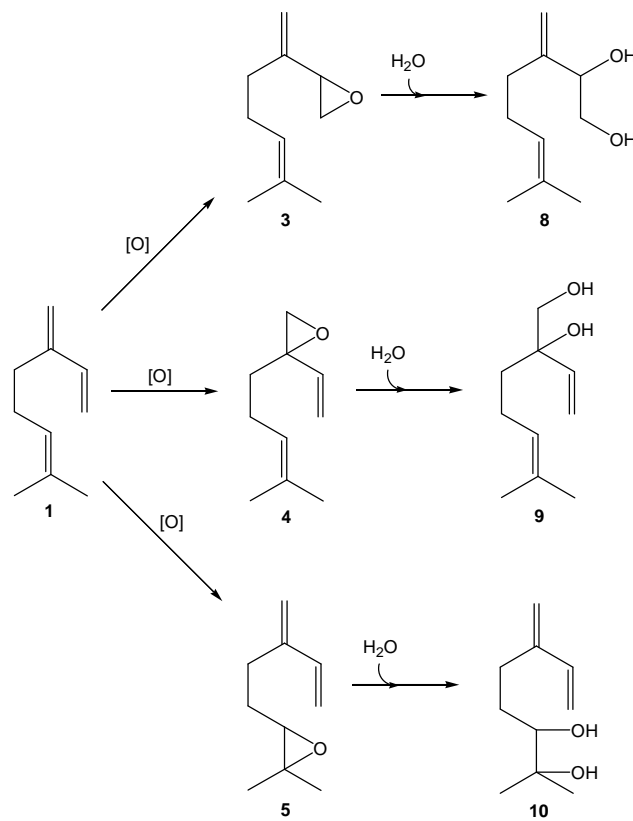


Abbildung 2.37: β -Myrcenbiotransformation zu den Epoxiden 1,2-, 3,10- und 6,7-Epoxy- β -myrcen **3**, **4** und **5** sowie deren Haupthydrolyseprodukte 1,2-, 3,10- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol **8**, **9** und **10** (vicinale Diolle)

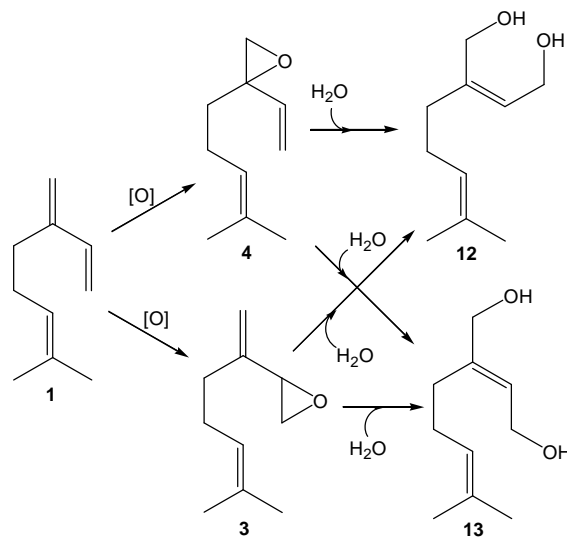


Abbildung 2.38: β -Myrcenkonversion zu α -Z- und α -E-Acaridiol **12** und **13** mit 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen **3** und **4** als Zwischenstufen

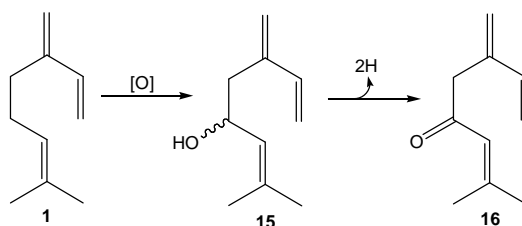


Abbildung 2.39: Biokonversion von β -Myrcen **1** zum Ipsdienol **15** mit nachfolgender Oxidation zum Ipsdienon **16**

Unter den Biokonversionen von β -Myrcen wurden auch Seitenwege beobachtet. Es wurde festgestellt, dass auch die Doppelbindung zwischen C6 und C7 epoxidiert wurde. Es resultierte neben 1,2- und 3,10- Epoxy- β -myrcen **3** und **4** auch das entsprechende 6,7-Epoxid **5** sowie deren Hydrolyseprodukte 1,2-, 3,10- und 6,7- β -Myrcendihydrodiol (**8**, **9** und **10**) (Abb. 2.37). Alle drei β -Myrcendihydrodiole gehörten zu Hauptbiotransformationsprodukten des β -Myrcens. Darüber hinaus wurde neben α -Z-Acaridiol auch sein α -E-Isomer **13** als Nebenprodukt in Konversionsextrakten nachgewiesen (Abb. 2.38). Die Enantiomerenüberschüsse der Dirole **8**, **9** und **10** (2.1.2.1 und 2.4.1) bei der Biokonversion von β -Myrcen und bei der Hydrolyse der racemischen β -Myrcenepoxide deuten auf enantioselektive Umsetzungen und damit biochemische Herkunft der beiden Transformationsschritte unter Enzyimbeteiligung hin.

Unter den Monooxygenierungsreaktionen trat auch eine allylische Hydroxylierung zum Ipsdienol **15** auf, das in geringem Maß weiter zum Ipsdienon **16** dehydrierte (Abb. 2.39). Eine chiroselektive Gaschromatographie des Ipsdienols aus dem Biokonversionsextrakt ergab einen ee-Wert von 42,0 % und zeigt damit eine biogenetische Herkunft dieser chiralen Verbindung. Als Monoole wurden auch 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol **17** und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol **18** nachgewiesen. Deren Biogenese wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht (Abb. 2.40).

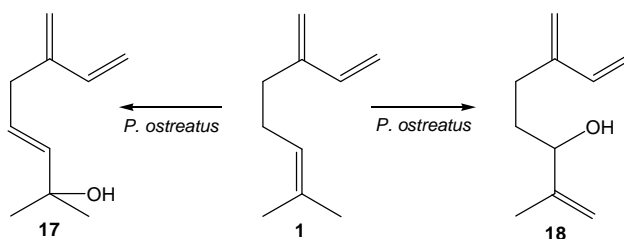


Abbildung 2.40: Biokonversion von β -Myrcen **1** zum 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol **17** und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol **18** (Dosierung: 0,71 g 200 mL⁻¹)

Zusammenfassung 2.2:

Nach Identifizierung mehrerer Biokonversionsprodukte des β -Myrcens wurde eine Biogenese des Perillens und anderer Metabolite abgeleitet. α -Z-Acaridiol gilt dabei als Schlüsselmetabolit der Perillenbiogenese. Dessen Bildung bestand formal insgesamt aus einer Einführung des O-Atoms und einem Hydratisierungsschritt des konjugierten 1,3-Diensystems. Als mögliche Zwischenstufen hierfür wurden 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcen vorgeschlagen. Mehrere β -Myrcendihydrodirole entstanden, jedoch nur α -Z-Acaridiol erfüllt die notwendige strukturelle Voraussetzung für eine Cyclisierung zu furanoiden Verbindungen. Das α -Z-Acaridiol cyclisiert somit über zwei mögliche Konversionswege zum Perillen. Der Befund beider Konversionswege stützt sich auf den Nachweis weiterer α,α - und α,β -Verbindungen als Folgeprodukte des α -Z-Acaridiols. Diese werden deshalb als α,α - und α,β -Weg bezeichnet. Dabei erfolgt zunächst ein Dehydrierungsschritt an einer der alkoholischen OH-Gruppen zu einem Hydroxyaldehyd. Die anschließende Cyclisierung und Dehydratisierung führen zum Perillen.

Neben den genannten Konversionen konnte auch eine Hydroxylierung des β -Myrcens zum Ipsdienol mit anschließender Oxidation zum Ipsdienon sowie eine Hydroxyfunktionalisierung zu den Alkoholen 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol und 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol beobachtet werden.

2.3 Bestätigung der postulierten Perillenbiogenese durch Einsatz trideuterierter Vorstufen

2.3.1 Synthese der markierten Intermediate und Schlüsselkomponenten

Zum Beweis der Perillenbildung aus β -Myrcen war eine Synthese von 8- bzw. 9-Trideutero- β -Myrcen **1*** erforderlich. Als verfügbare markierte Vorstufe diente das 4-Trideuteromethyl-3-pentenylidiod **27*** (Abb. 2.41). Die Synthese von Trideutero- β -myrcen **1*** erfolgte zweistufig über Linalool als Zwischenprodukt. Zu Beginn wurde das Alkenylidiod **27*** in eine lithiumorganische Verbindung **35*** umgewandelt, indem **27*** mit n-Butyllithium bei -70°C umgesetzt wurde. Es resultierte 4-Trideuteromethyl-3-pentenyllithium **35***, das an die Carbonylgruppe des Methylvinylketons **34** addiert wurde (Suga *et al.*, 1966). Eine Abweichung von der Literaturvorschrift bestand in der Verwendung der Iod-Verbindung **27*** als Ausgangsstoff anstelle von 4-Methyl-3-pentenylchlorid. Das Linalool wurde anschließend aus dem entstandenen Lithiumlinaloolat **36*** mit gesättigter NH_4Cl -Lösung freigesetzt. Die Wahl des NH_4Cl -Salzes als Protonendonator anstelle einer Säure erfolgte zur Unterbindung unkontrollierter Wassereliminierungen. In der Abb. 2.41 ist die nucleophile Addition dargestellt.

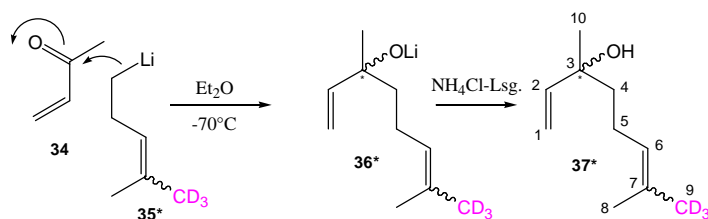


Abbildung 2.41: Nucleophile Addition von 4-Trideuteromethyl-3-pentenyllithium **35*** an Methylvinylketon **34** unter Bildung von 8-Z-/9-E-Trideuterolinalool **37*** über Trideuterolithiumlinaloolat **36*** als Zwischenstufe

Das resultierende Trideuterolinalool war ein E/Z-Gemisch, da als Vorstufe ebenfalls ein E-/Z-Gemisch (bezogen auf die prenylische Doppelbindung) verwendet wurde. Da die nucleophile Addition von beiden Seiten der Carbonylgruppe erfolgte, lieferte die zugrunde liegende C-C-Verknüpfung für jedes E-/Z-Stereoisomer ein Racemat mit je einem Chiralitätszentrum an C3 (Abb. 2.41). Die Charakterisierung und Identifizierung der Zielverbindung **37*** erfolgte anhand von Retentionsindizes nach Kovats (5.6.9.6) und Massenspektren sowie durch Vergleich mit Literaturdaten der nicht markierten Spezies.

Abb. 2.42 gibt das Massenspektrum des synthetisierten Trideuterolinalools **37*** wieder. Das Fragmentierungsmuster des tert. Alkohols **37*** ist von einigen trideuterierten Spaltprodukten begleitet. Zu ihnen gehören die Signale m/z 72 (Prenylrest), 124 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$) und 139 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$). Das Fragmentation mit der Masse m/z 71 trägt keine Deuteromarkierung und durch

Vergleich mit dem Massenspektrum des nicht markierten Linalools (Adams, 1995) wurde gezeigt, dass es sich hier um α -Spaltung zwischen C3 und C4 handelt.

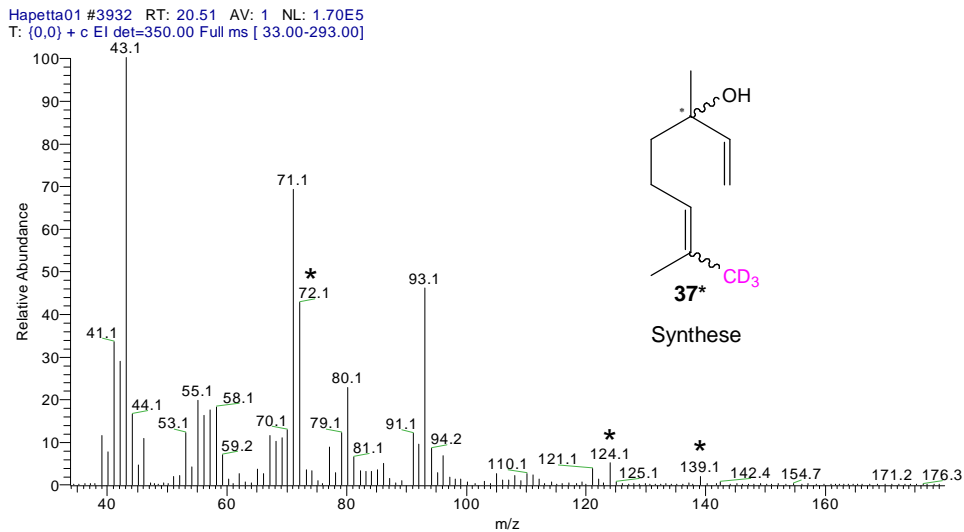


Abbildung 2.42: Massenspektrum von 9-E-/8-Z-Trideuterolinalool **37*** als Syntheseprodukt; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]; * Signale mit Massenverschiebung um 3 u in Bezug auf die nicht markierte Verbindung

Da analoge Synthese mit nicht markiertem 4-Methyl-3-pentenylithium **35** ein literaturidentisches Massenspektrum von Linalool lieferte, ist bei dem hier beschriebenen Syntheseprodukt das Trideuterolinalool **37*** anzunehmen.

Die Umsetzung zum 9-E-/8-Z-Trideutero- β -myrcen erfolgte durch Wassereliminierung des Trideuterolinalools **37*** nach Burgess mit Hilfe von vakuumgetrocknetem Methyl-(carboxysulfamoyl)triethylammoniumhydroxid als Dehydratisierungsreagenz in zwitterionischer Form (Burgess *et al.*, 1973) In der Abb. 2.43 ist der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus dargestellt (Burgess *et al.*, 1973).

Die Synthese war jedoch von Nebenreaktionen begleitet. Um die massenspektrometrische Identifizierung der Nebenprodukte zu erleichtern, wurde die Umsetzung mit nicht markiertem Linalool wiederholt. Als Produktspektrum resultierte ein präparativ schwer auftrennbares Gemisch aus β -Myrcen **1**, R-/S-Limonen **40**, Z- **41** und E-Ocimen **42** sowie 1-Methyl-4-(1-methylethyliden)-cyclohexen **43** in reproduzierbaren Mengenverhältnissen. Das β -Myrcen hatte darin einen Anteil von 28 %. Bei der Identifizierung über den direkten Vergleich mit Literaturspektren konnten identische Massenspektren für die 5 genannten Komponenten gefunden werden. In der Abb. 2.44 sind die Reaktionswege dieser Umsetzung sowie das dazugehörige GC-MS-Profil des Produktgemisches dargestellt. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration beider Ocimene erfolgte über den Vergleich mit der Retentionszeit eines kommerziell bezogenen Z-Ocimen-Standards.

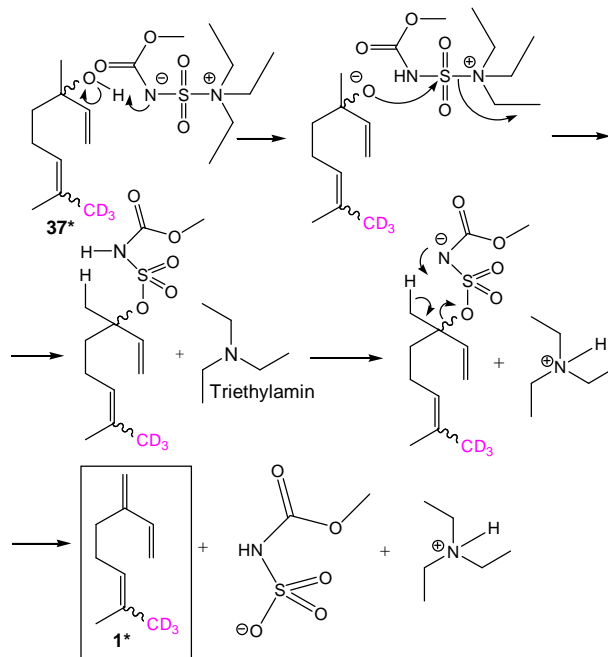


Abbildung 2.43: Reaktionsmechanismus der Wassereliminierung nach Burgess von Trideuterolinalool **37*** zum Trideutero-β-myrcen (Burgess *et al.*, 1973)

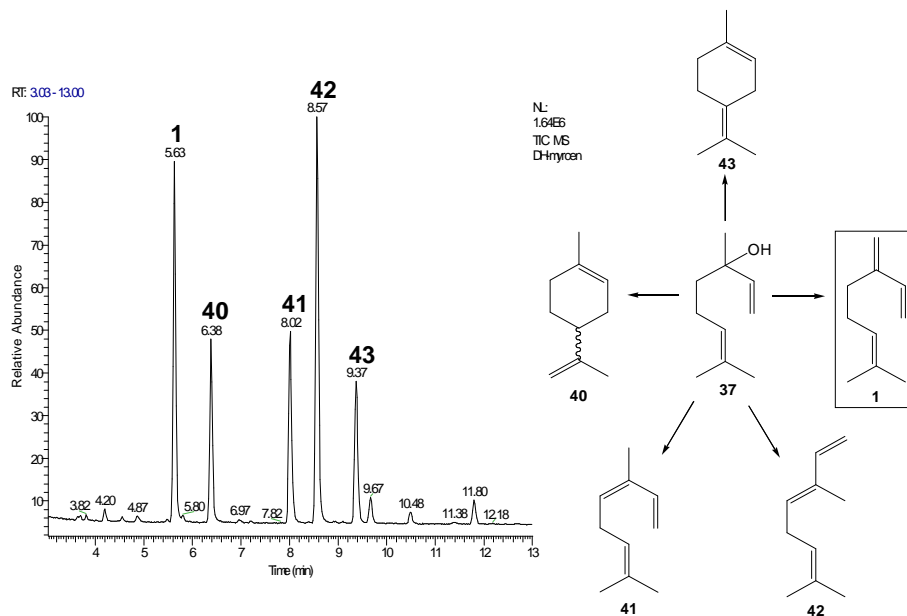


Abbildung 2.44: Reaktionswege der Wassereliminierung nach Burgess aus Linalool **37** (rechts) und GC-MS-Profil des Produktgemisches (links) bestehend aus β-Myrcen **1**, R/S-Limonen **40**, Z-Ocimen **41**, E-Ocimen **42**, und 1-Methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexen **43**;

Unter den Massenspektren der trideutierten Produktkomponenten soll hier nur das von Trideutero-β-myrcen **1*** (Abb. 2.45) aufgeführt werden. Zu beachten ist, dass es sich auch hier um ein E-/Z-Isomerengemisch handelt, bestehend aus 8-Z- und 9-E-Trideutero-β-myrcen.

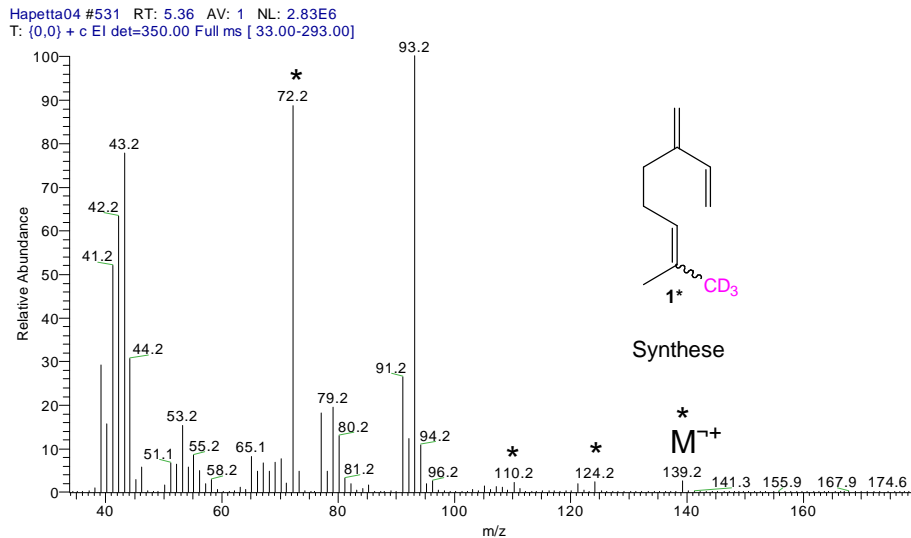


Abbildung 2.45: Massenspektrum von 8-Z-/9-E-Trideutero- β -myrcen **1***; GC-MS-Messung (Quadrupol, EI, 70 eV); * Massenverschiebung um 3 u in Bezug auf die nicht markierte Spezies

Um auszuschließen, dass es sich beim trideutერიerten Perillen und dessen Vorstufen nicht um Produkte des ebenso dosierten Trideutero- β -Ocimens handelt, wurde parallel ein Kontrollversuch unter Dosierung eines kommerziell bezogenen β -Z-Ocimens in eine Experimentalkultur mit aktiven Zellen durchgeführt. Unter den Produkten des β -Ocimens wurden weder Perillen noch sonstige Verbindungen nachgewiesen, die als Produkte des β -Myrcens (Abb. 2.1) identifiziert wurden. Damit konnte sicher gestellt werden, dass die hier aufgeführten Produkte des β -Myrcens in trideuterierter Form eindeutig dem Substrat β -Myrcen zuzuordnen sind (zur Identifizierung der Produkte von β -Z-Ocimen siehe 2.6).

Das ebenfalls eingesetzte Trideutero- α -Z-Acaridiol **12*** wurde durch Reduktion von Trideutero- α,α -acariolid **6*** mit DIBAL-H gewonnen. Zu präparativen Arbeiten sei auf die Kapitel 2.1.2.5 und 5.4.5 verwiesen. Das Trideutero- α -Z-Acaridiol stellte ebenfalls ein E-/Z-Isomerengemisch dar, dessen Komponenten im chromatographischen und massenspektrometrischen Verhalten keine Unterschiede zeigten. Im nachfolgenden Text ist deshalb analog dem Trideutero- β -Myrcen **1*** unter dem Begriff Trideutero- α -Z-Acaridiol ein Gemisch beider Stereoisomere zu verstehen.

2.3.2 Biokonversionen mit markierten Intermediaten

2.3.2.1 Trideutero- β -Myrcen als Substrat

Über Metabolite, die im Dosierungsversuch mit dem Substrat Trideutero- β -Myrcen **1*** Träger der entsprechenden Markierung am Prenylest wurden, konnten postulierte Biokonversionswege bewiesen werden. Da das Substrat als trideutertes 5-Komponenten-Gemisch (Abb. 2.44) eingesetzt wurde und Metabolite des β -Myrcens von denen der Nebenkomponten auf der Basis der Isotopenmarkierung unterschieden werden sollten, wurde die Mischung mit einem nicht isotopenmarkierten β -Myrcen in definierter Menge versetzt. Infolge dessen wies das β -Myrcen im Gegensatz zu anderen Komponenten lediglich einen Markierungsgrad von 46,9 % auf. Der Gesamtgehalt an β -Myrcen betrug damit 45,1 % der Monoterpenkohlenwasserstoffmischung. Die Dosierung erfolgte mit 0,49 mmol (Trideutero)- β -Myrcen je 100 mL SNL-Nährmedium. Bei der gaschromatographischen Trennung wurde festgestellt, dass die markierte und nicht markierte Spezies angetrennt werden und das Trideutero- β -Myrcen schwächer retardiert wurde (Abb. 2.46).

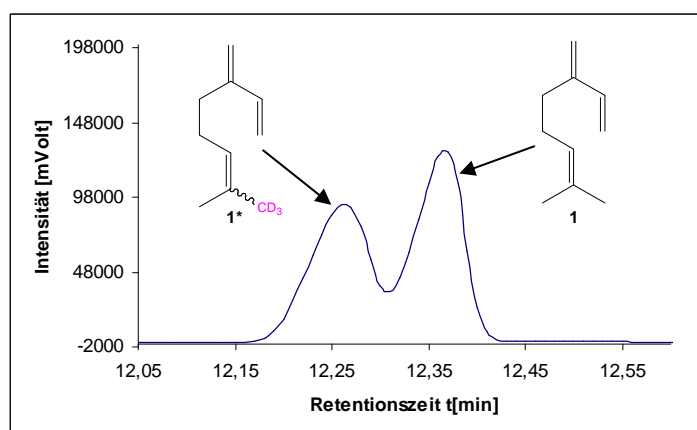


Abbildung 2.46: β -Myrcen-Region im Chromatogramm des trideutierten 5-Komponenten-Gemisches; Dehydratisierung von Trideuterolinalool nach Burgess; Säule: DB5; GC-FID; β -Myrcen **1**: 0,26 mmol (35,5 mg); Trideutero- β -Myrcen **1***: 0,23 mmol (31,9 mg)

Neben β -Myrcen erscheinen daher auch dessen Metabolite im GC-Chromatogramm als Doppelpeaks. Dadurch konnte je ein Massenspektrum der nicht markierten und der trideutierten Spezies generiert werden.

Unter den markierten Metaboliten wurden neben Perillen **2*** auch α -E-Acaridiol **13***, α,α -Acaridiolid **6***, die vicinalen β -Myrcendihydrodirole **8***, **9*** und **10*** sowie das 6,7-Epoxy- β -myrcen **5*** nachgewiesen. Die Massenspektren der Trideuteroverbindungen sind in den Abb. 2.47 bis 2.53 aufgeführt.

Durch den Massenspektrenvergleich der trideutერიerten und der nicht markierten Verbindungen konnten einige Fragmentierungsreaktionen aufgeklärt werden. Trideuteromarkierte Fragment-Ionen erfuhren gegenüber den nicht markierten Spezies eine Massenverschiebung um 3 u. Wassereliminierungen der 1,2- und 3,10- β -Myrcendihydrodiol **8** und **9** konnten anhand der Massenverschiebung von m/z 152 nach 155 (einfache Dehydratisierung) und m/z 134 nach 137 (doppelte Dehydratisierung) aufgezeigt werden (Abb. 2.47 und 2.48). Die Masse m/z 41 erwies sich dagegen als ein Signal unterschiedlichen Ursprungs, da es in Massenspektren der trideutერიerten Spezies **8*** und **9*** je eine Peakregion mit einem Massenbereich zwischen m/z 41 und 44 ergab (Abb. 2.47 und 2.48). Dieses Verhalten zeigen alle in dieser Arbeit beschriebenen β -Myrcendihydrodiol des konjugierten 1,3-Diensystems. Charakteristisch für beide Diol ist ferner die α -Spaltung zwischen C3 und C10 bei **9** bzw. zwischen C1 und C2 bei **8**, deren Signal bei m/z 139 ebenfalls eine Massenverschiebung um 3 u aufweist. Beim 3,10-Diol **9** war außerdem nach der α -Spaltung eine Dehydratisierung zum Fragmention mit m/z 121 bei nicht markierter Spezies bzw. 124 bei trideuterierter Spezies in höherer Intensität messbar. Charakteristisch für das 1,2-Diol **8** war dagegen das Ion bei m/z 101, das keine Verschiebung um 3 u beim Übergang zum deuterierten Molekül zeigte und folglich als Fragment-Ion nach Abspaltung der Prenylmasse $M_R = 69$ zu deuten ist.

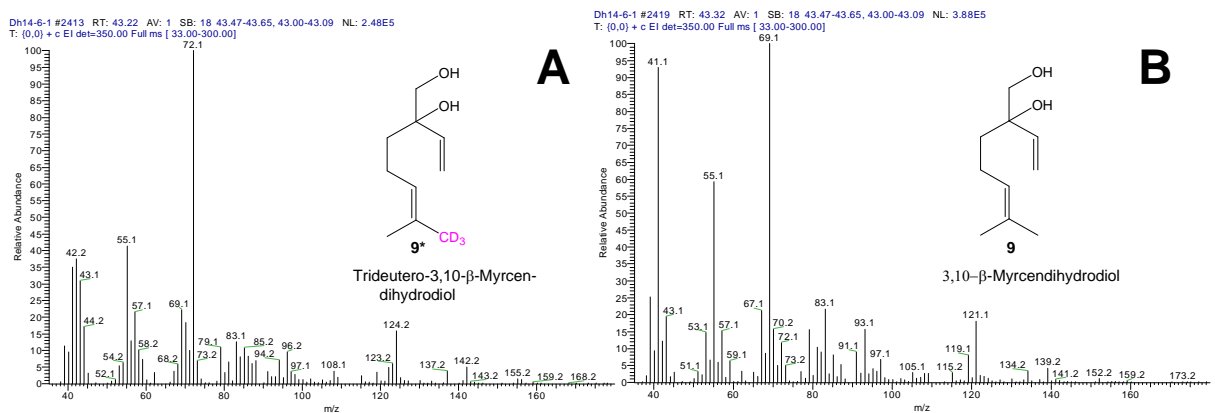


Abbildung 2.47: Massenspektrum von 3,10- β -Myrcendihydrodiol **9** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

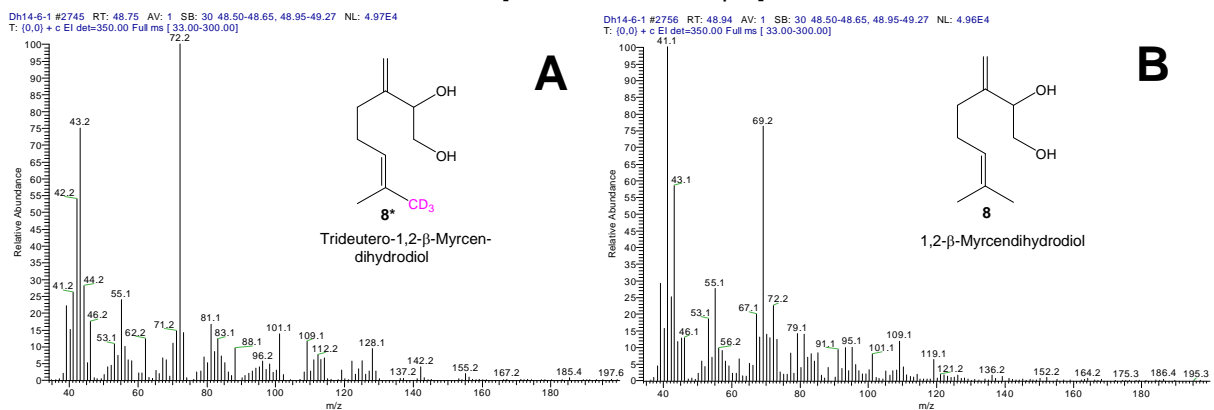


Abbildung 2.48: Massenspektrum von 1,2- β -Myrcendihydrodiol **8** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

Das 6,7- β -Myrcendihydrodiol **10** ist ebenfalls in trideuterierter Form zugänglich. Es zeichnet sich durch einen Basis-Peak bei m/z 59 aus, der aus einer α -Spaltung zwischen C6 und C7 resultiert und beim Übergang zum trideutierten Verbindung **10*** eine Massenverschiebung um 3 u erfährt. Diese Fragmentierung war sehr charakteristisch für das vicinale 6,7-Diol **10**. Auch die Masse m/z 71 erfährt eine Massenverschiebung um 3 u, die als Spaltung zwischen C5 und C6 nach einfacher Dehydratisierung am Prenylrest zu deuten ist (Abb. 2.49).

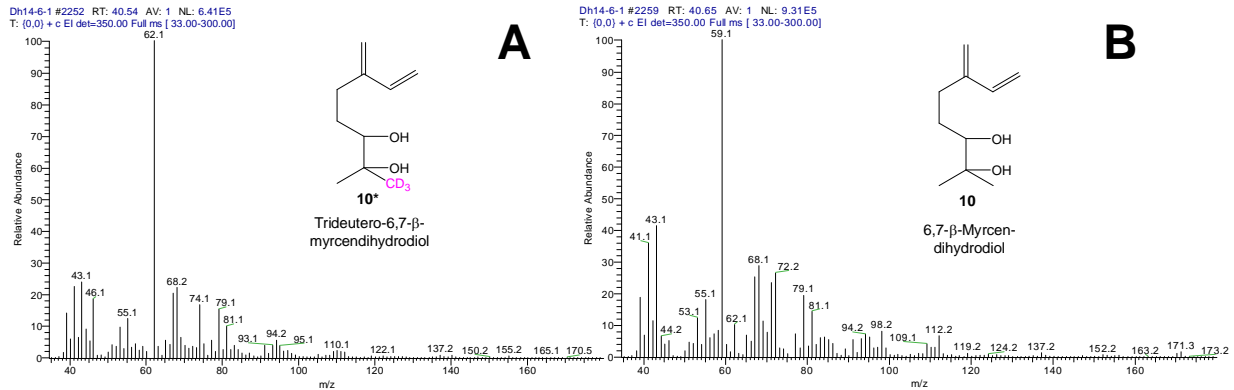


Abbildung 2.49: Massenspektrum von 6,7- β -Myrcendihydrodiol **10** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

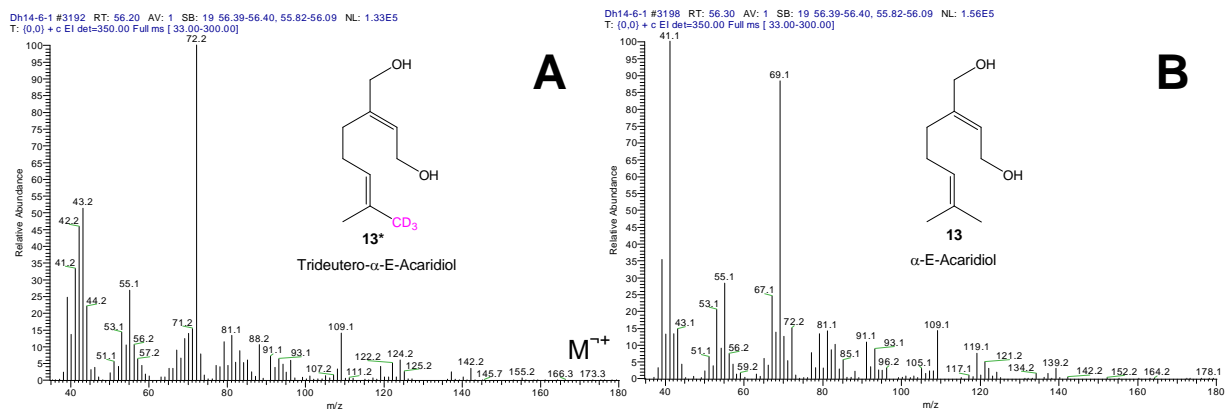


Abbildung 2.50: Massenspektrum von α -E-Acaridiol **13** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

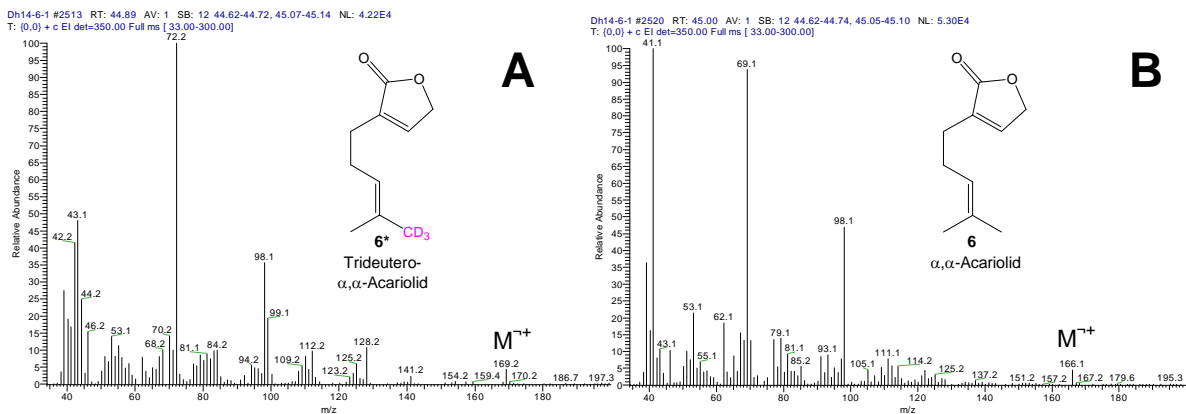


Abbildung 2.51: Massenspektrum von α,α -Acaridiol **6** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

Beim α -E-Acaridiol trat neben den Hauptsignalen m/z 41 und m/z 69 charakteristischerweise ein Massenpeak bei m/z 109 deutlicher hervor als beim entsprechenden Z-Isomer (Abb. 2.50). Die fehlende Massenverschiebung um 3 u zeigte eine Abspaltung von C_3H_7 bzw. $C_3H_4D_3$ am Prenylrest nach einfacher Dehydratisierung des Moleküls und Umlagerung der prenylischen Doppelbindung (Abb. 2.50).

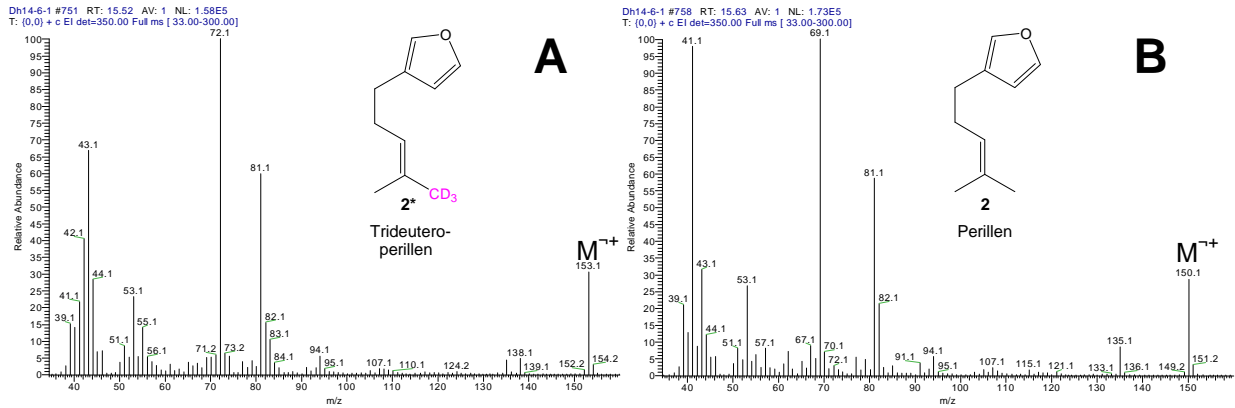


Abbildung 2.52: Massenspektrum von Perillen **2** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

Beim Spektrenvergleich von trideutiertem und nicht markiertem Perillen bzw. α,α -Acariolid zeigen sich Verschiebungen der Prenylmasse m/z 69 nach 72 und des jeweiligen Molekülions nach m/z 153 für Perillen und nach m/z 169 für α,α -Acariolid. Die zugehörigen Massenspektren sind in den Abbildungen 2.51 und 2.52 dargestellt.

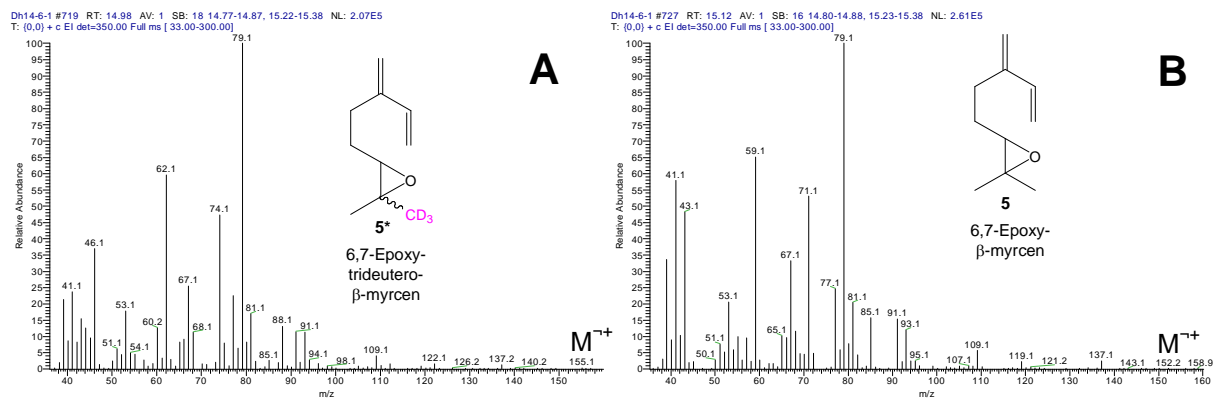


Abbildung 2.53: Massenspektrum von 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** als Biokonversionsprodukt in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI, 70 eV, Quadrupol]

Unter den Epoxiden konnte lediglich das 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** in trideutierter Form nachgewiesen werden (Abb. 2.53). Die Massenspektren zeigen für die Signale m/z 59 und 71 eine Massenverschiebung um 3 u und belegen damit die Zugehörigkeit zum Prenylrest. Das Fragment-Ion m/z 71 zeigt damit eine α -Spaltung zwischen C5 und C6 zum Oxiran-Sauerstoff und ist charakteristisch für das 6,7-Epoxy- β -myrcen. Nach Umlagerung der endständigen Doppelbindung zwischen C3 und C10 läßt sich auch eine Allylspaltung

zwischen C5 und C6 formulieren (Abb. 2.54). Das resultierende und gemessene Fragment-Ion der Masse m/z 81 kann sich durch Cyclisierung zum Cyclopenten-Kation stabilisieren. Der Basispeak m/z 79 lässt sich durch anschließende Aromatisierung zum Cyclopentadienyl-Kation interpretieren (Abb. 2.54). Die Masse m/z 67 belegt die erwartete Allylsplattung zwischen C4 und C5.

Andere Fragmentierungen konnten nach Umlagerung zum 2-Methyl-6-methylen-4,7-octadien-2-ol abgeleitet werden. So belegt das Signal bei m/z 59 eine α -Spaltung unter Freisetzung des Fragment-Ions $C_3H_7O^+$ bzw. des Spaltprodukts C_7H_9 . Die Massenverschiebung nach m/z 62 bestätigt diesen Befund (Abb. 2.53, 2.54). Nach entsprechender Allylsplattung zwischen C6 und C7 kann das resultierende Fragment-Ion $C_7H_9^+$ nach Cyclisierung und Dehydrierung zum Tropylium-Kation $C_7H_7^+$ mit der Masse m/z 91 aromatisieren. Die nachfolgende C_2H_2 -Abspaltung führt anschließend zum Pentadienyl-Kation $C_5H_5^+$ mit der Masse m/z 65 (Abb. 2.54; Hesse *et al.*, 1995). Beide Signale wurden bei der massenspektrometrischen Messung erfasst.

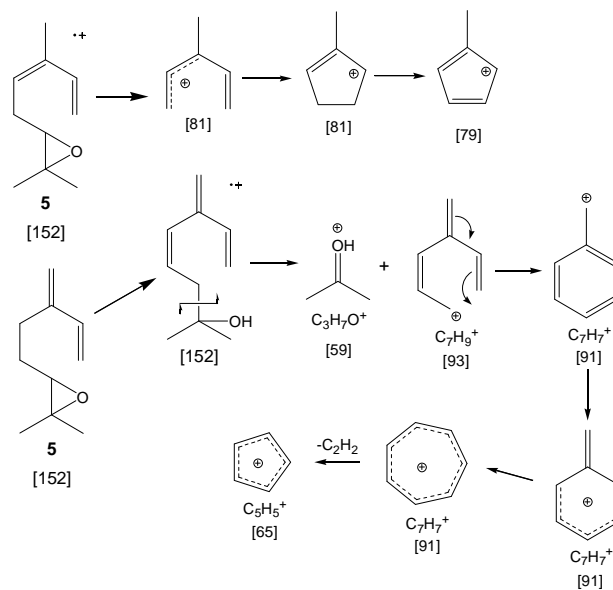


Abbildung 2.54: Postulierter Fragmentierungsmechanismus für 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** im Massenspektrometer (Quadrupol, EI, 70eV)

2.3.2.2 Biokonversion von Trideutero- α -Z-Acaridiol

Der Beweis von α -Z-Acaridiol **12** als Zwischenstufe war erforderlich, da das α -Z-Acaridiol nicht nach Trideutero- β -myrcen-Dosierung nachgewiesen wurde. Um nachgeordnete Metabolite in trideuterierter Form zu erfassen, erfolgte eine Dosierung in Mengen von 0,53 mmol des Trideutero- α -Z-Acaridiols je 100 mL SNL-Medium. Die Probenahme wurde am ersten und vierten Tag nach der Dosierung vorgenommen. Unter den trideuterierten Metaboliten wurden neben Perillen **2*** auch α,α -Acarilactol **32*** und die beiden Acariolide **6*** und **7*** nachgewiesen (Abb. 2.55 und 2.56).

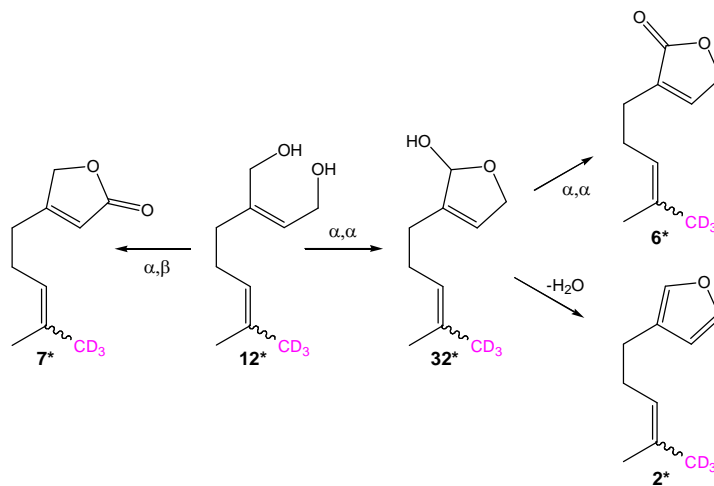


Abbildung 2.55: Nachgewiesene Biokonversionsprodukte von Trideutero- α -Z-Acaridiol **12***

Als Kontrolle wurde ein Dosierungsversuch mit nicht markiertem Substrat durchgeführt. Damit konnten die Produkte zugeordnet werden. Die quantitative Bestimmung des Perillens ergab auch hier lediglich transiente Konzentration.

Die Zugehörigkeit des α -Z-Acaridiols zur Perillenbiogenese wurde jedoch durch den Einsatz der trideuterierten Spezies bewiesen und es konnte ein α,α - und ein α,β -Weg bei der oxidativen Cyclisierung des α -Z-Acaridiols beobachtet werden. Die Massenspektren der Produkte α,α - und α,β -Acariolid, α,α -Acarilactol und Perillen in markierter und nicht markierter Form sind in den Abb. 2.51, 2.57, 2.58 und 2.52 dargestellt. Als Minorbestandteil wurde das α -Z-Acariolal **14** nur in nicht markierter Form erfasst.

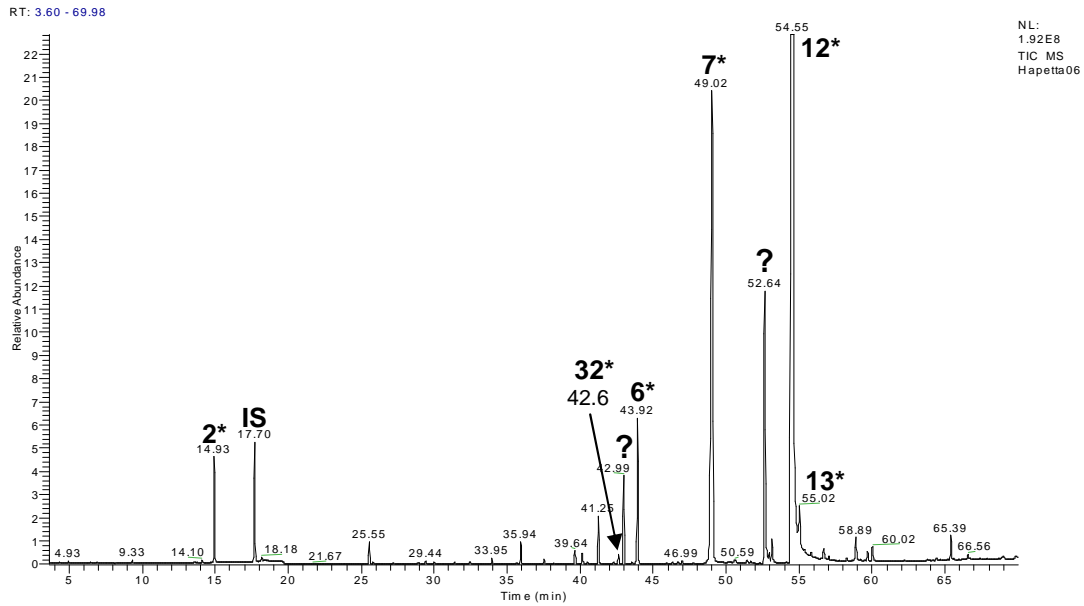


Abbildung 2.56: GC-Chromatogramm des Biokonversionsextraktes nach Dosierung von Trideutero- α -Z-acaridiol; Substratdosis: 91,3mg 100 mL⁻¹; Probenahme: 1.Tag; Extraktionsmittel: n-Pentan/Diethylether; Säule: ZB-Wax; IS: interner Standard [R-(+)-Camphor] Trideuteroperillen **2***, Trideutero- α -Z-acaridiol **12***, Trideutero- α,α -acarilactol **32***, Trideutero- α,α -acariolid **6***, Trideutero- α,β -acariolid **7***

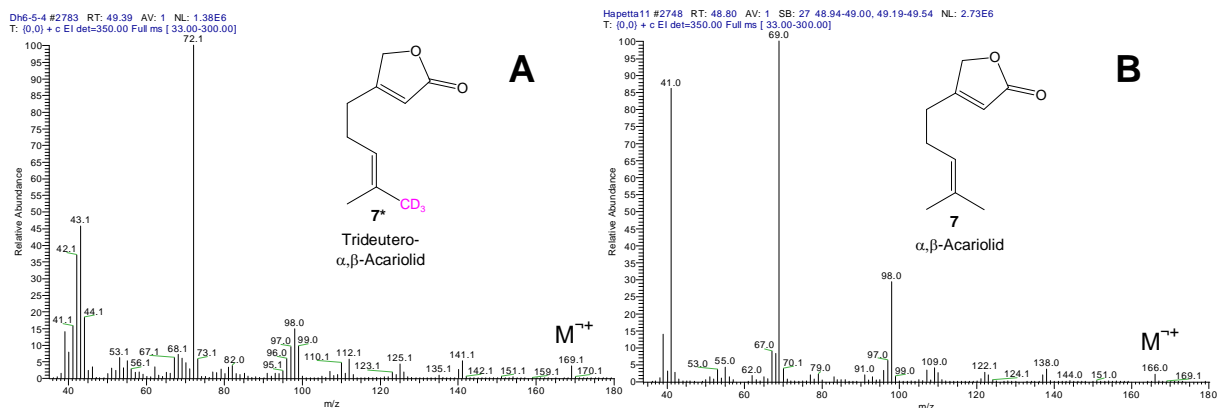


Abbildung 2.57: Massenspektrum von α,β -Acariolid **7** als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol **12** in markierter **A** und nicht markierter Form **B** [EI; 70 eV; Quadrupol]

2.3.2.3 Identifizierung von α,α -Acarilactol als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol

Die Struktur von α,α -Acarilactol wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie mit Hilfe der Massenspektrometrie aufgeklärt (2.1.2.5). Die Bestätigung lieferte die Reduktion (2.1.2.5) von sicher identifiziertem α,α -Acariolid (2.1.2.4). Als Biokonversionsprodukt wurde es nur bei der Dosierung von α -Z-Acaridiol nachgewiesen. Die Massenspektren der synthetisierten Verbindung und des Biokonversionsproduktes sind identisch (Abb. 2.58). Nach Biokonversion von Trideutero- α -Z-Acaridiol resultierte auch ein Massenspektrum des Trideutero- α,α -Acarilactols, das zur Spektreninterpretation heran-

gezogen wurde. Es dominierten hauptsächlich die für Perillen typischen Massensignale (Abb. 2.24). Die Spaltung der doppeltallyischen Bindung zwischen C4 und C5 liefert neben der Prenylmasse m/z 69 auch den charakteristischen Peak bei m/z 99, deren Signalzugehörigkeit die fehlende Massenverschiebung gegenüber der nicht markierten Spezies bestätigt (Abb. 2.58).

Die Identifizierung des α,α -Acarilactols als Biokonversionsprodukt des α -Z-Acaridiols vervollständigt das Schema der Perillenbiogenese (Abb. 2.59). Beide Acarilactole gelten deshalb als nachgewiesene Zwischenstufen (Abb. 2.26 und 2.58) und bestätigen das Vorhandensein beider Wege zum Perillen (α,α - und α,β -Weg).

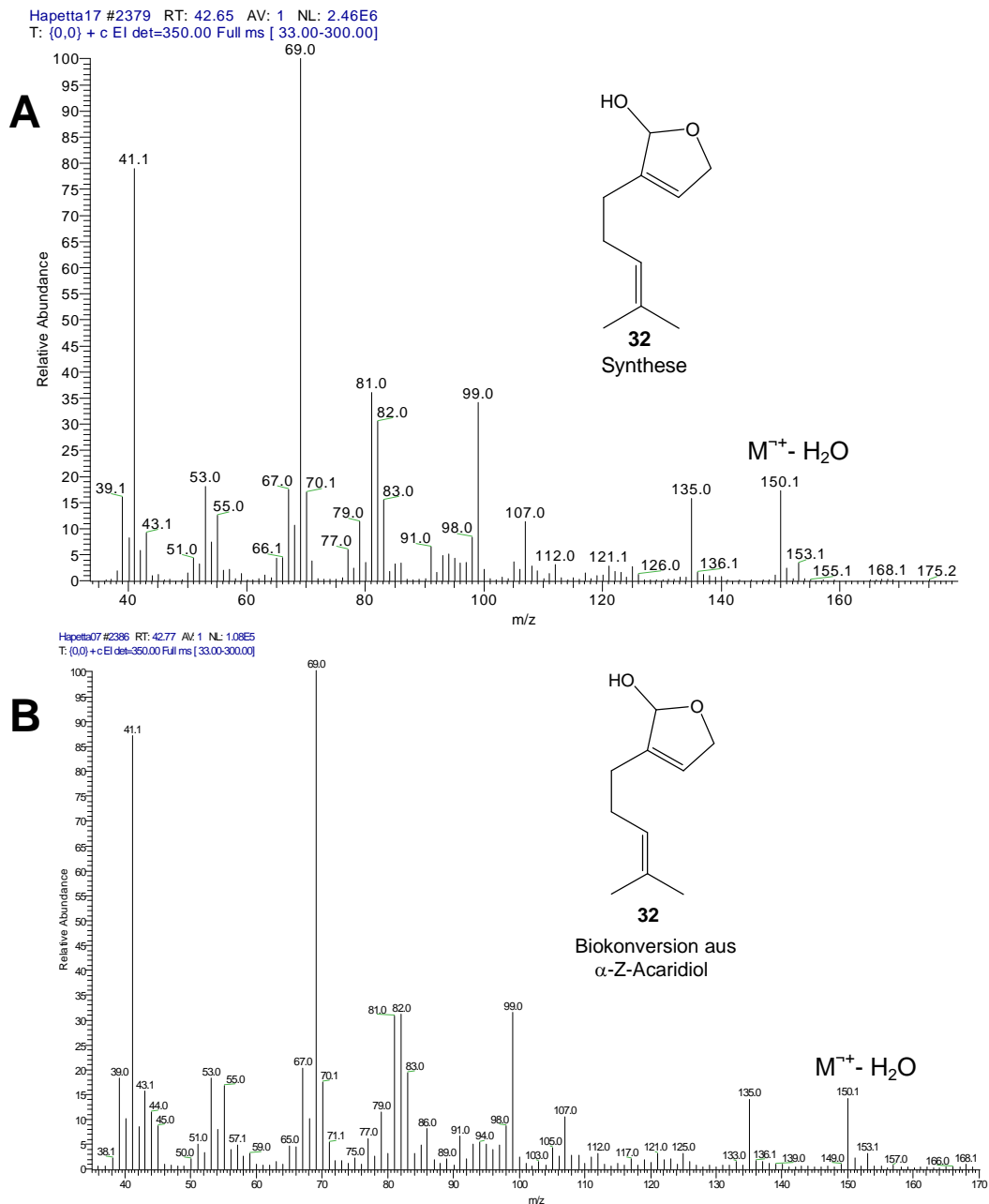


Abbildung 2.58: Massenspektren von α,α -Acarilactol **32** als Synthese- **A** und Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol **B** in nicht markierter Form; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

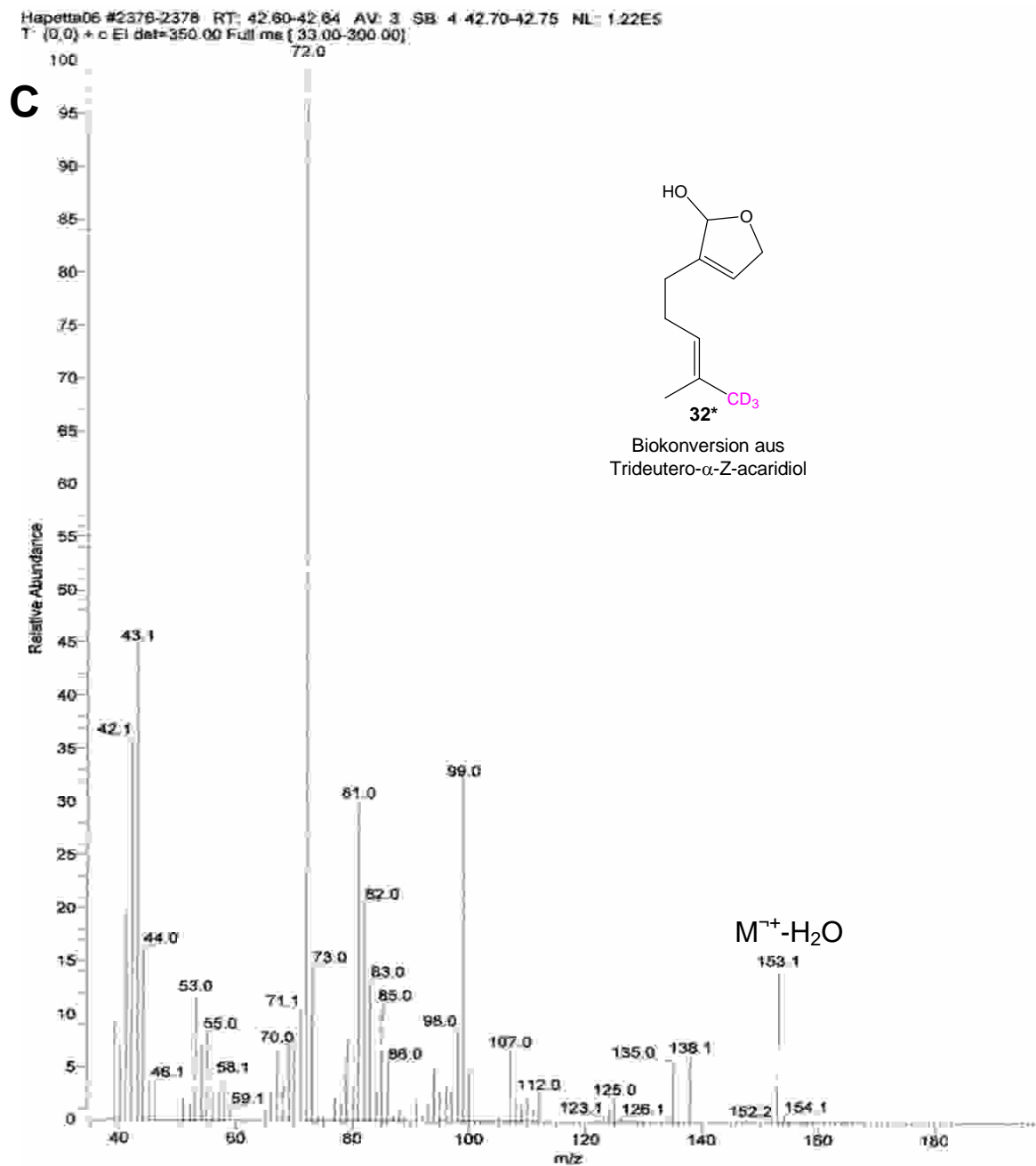


Abbildung 2.58: Massenspektrum von α,α -Acarilactol **32** als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol in trideuterierter Form **C**; GC-MS-Messung [Quadrupol, EI, 70eV]

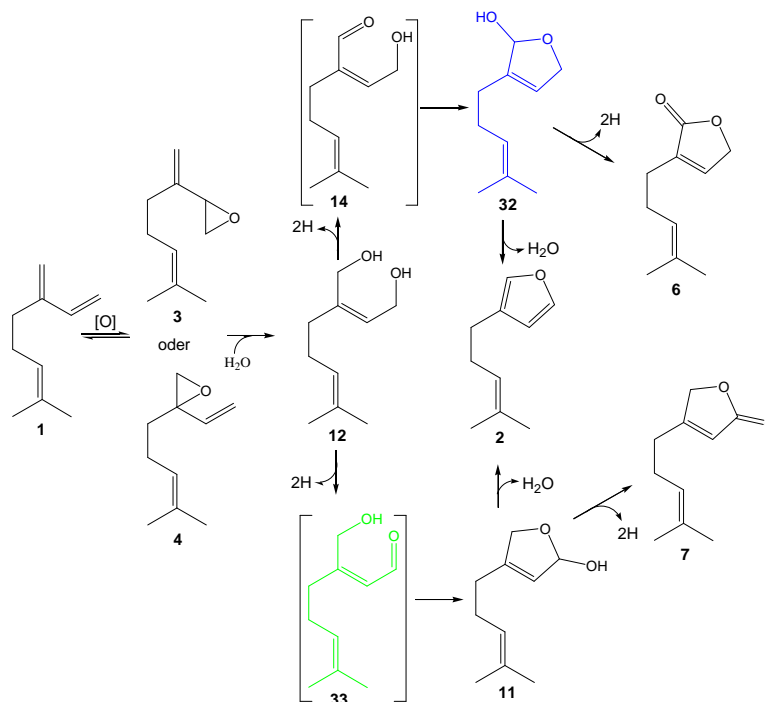


Abbildung 2.59: Abgeleitete Perillenbiogenese aus β -Myrcen **1** durch *P. ostreatus*: **3**: 1,2-Epoxy- β -myrcen, **4**: 3,10-Epoxy- β -myrcen **12**: α -Z-Acaridiol, **14**: α -Z-Acariolal, **33**: 10-Hydroxygeranial (wurde theoretisch abgeleitet), **32** und **11**: α,α - und α,β -Acarilactol; **6** und **7**: α,α - und α,β -Acariolid; grün: Verbindung wurde nicht nachgewiesen; blau: Verbindung wurde als Biokonversionsprodukt von α -Z-Acaridiol nachgewiesen

Zusammenfassung für 2.3

Zur Beweisführung der Perillenbiogenese erfolgten Dosierungsversuche mit Stabilisotopen markierten Vorstufen. Es folgten Dosierungen mit Trideutero- β -Myrcen und Trideutero- α -Z-Acaridiol, die bezogen auf die prenylische Doppelbindung als E-/Z-Isomere zum Einsatz kamen. Im Gegensatz zum Trideutero- α -Z-Acaridiol wurde das Trideutero- β -myrcen als Gemisch mit E- und Z-Ocimen, (\pm)-Limonen und 1-Methyl-4-(1-methylethyliden)-cyclohexen dosiert. Das Perillen in trideuteromarkierter Form wurde sowohl nach Biokonversion von Trideutero- α -Z-Acaridiol als auch von Trideutero- β -Myrcen nachgewiesen. Unter den identifizierten Biokonversionsprodukten von Trideutero- β -myrcen wurden neben Perillen auch 1,2-, 3,10- und 6,7-Trideutero- β -Myrcendihydrodiol, Trideutero- α -E-Acaridiol sowie Trideutero- α,α -Acariolid nachgewiesen. Zu den Metaboliten des Trideutero- α -Z-Acaridiols, die nachgewiesen und identifiziert wurden, gehörten Trideutero- α,α -Acarilactol sowie Trideutero- α,α - und Trideutero- α,β -acariolid.

2.4 Biokonversionen β -Myrcen nachgeordneter Schlüsselmetabolite und Kinetik der Produktbildungen

Für die nachfolgenden Dosierungen wurden synthetisierte Substrate mit einer Reinheit von mindestens 80 % verwendet. Eine Ausnahme stellte mit 40,5 % das für den chemischen Kontrollversuch verwendete 3,10-Epoxy- β -myrcen. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte mittels GC-FID nach der Methode des internen Standards mit n-Nonadecan.

2.4.1 Biokonversion von 1,2-, 3,10- und 6,7-Epoxy- β -myrcen

Epoxide sind Biovorstufen vicinaler Dirole, die durch 1,2-Addition von Wasser an den Oxiranring entstehen (Abb. 2.37). Epoxy- β -myrcene **3**, **4** und **5** (2.1.2.2 und 2.1.2.10) wurden in Biokonversionsextrakten nachgewiesen und damit als initiale Produkte der β -Myrcenbiokonversion postuliert. Zur Bestätigung als Perillenvorstufen wurden sie in Dosierungsversuchen als Substrate eingesetzt. 23,2 mg 1,2- und 47,9 mg 3,10-Epoxy- β -myrcen wurden je einer 100 mL-Schüttelkultur zudosiert. Die Probenahme erfolgte nach 1 und 5 h.

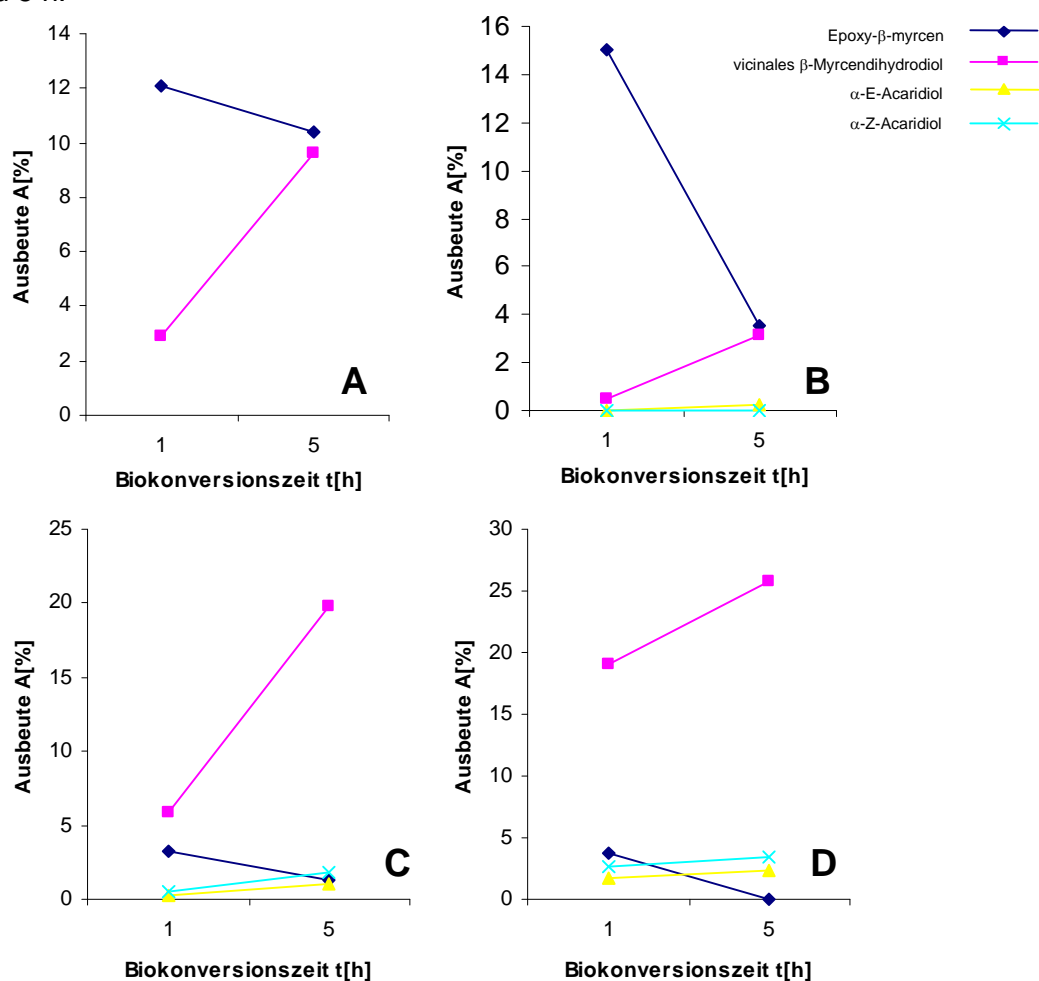


Abbildung 2.60: Hydrolysekinetik von 1,2-Epoxy- β -myrcen **3** (A: Kultivierung, B: chem. Kontrolle); Hydrolysekinetik von 3,10-Epoxy- β -myrcen **4** (C: Kultivierung, D: chem. Kontrolle);

Beide Dosierungsversuche wurden von chemischen Kontrolleexperimenten begleitet, bei denen die Kulturbrühe inaktiviert wurde (Autoklav).

Die Konzentration des 1,2-Epoxy- β -Myrcens nahm gegenüber seinem 3,10-Isomer wesentlich langsamer ab (Abb. 2.60 **A** und **B**). Die stärkere Konzentrationsabnahme des 1,2-Epoxids neben geringerer Bildungsrate seines Hydrolyseprodukts 1,2- β -Myrcendihydrodiol **8** zwischen der 1. und 5. Stunde bei chemischer Kontrolle deutet auf stärkere Verluste des 1,2-Epoxy- β -myrcens über die Gasphase in Abwesenheit aktiver Zellen hin. Innerhalb der 1. Stunde nahm dagegen die Konzentration des Substrats nahezu gleich schnell ab, während die Bildung des 1,2- β -Myrcendihydrodiols in Anwesenheit aktiver Zellen überwog. Das 3,10-Epoxy- β -myrcen zeigte während dessen in beiden Versuchen (Kultivierung und chemische Kontrolle) über die gesamte Biokonversionszeit nahezu gleiche Abbaukinetik (Abb. 2.60 **C** und **D**). Die Bildungskinetik des 3,10- β -Myrcendihydrodiols zeigte dagegen Unterschiede. Innerhalb der ersten Stunde nahm die Konzentration bei chemischer Kontrolle stärker zu, während in der Zeit zwischen der 1. und 5. Stunde die Bildung in Anwesenheit aktiver Zellen überwog. Signifikante Acaridiolbildung wurde lediglich nach der Dosierung des 3,10-Epoxy- β -myrcens beobachtet. Die bei der Dosierung des entsprechenden 1,2-Epoxids in Spuren entstandenen Acaridiale (Abb. 2.60 **A** und **B**) wurden ausschließlich bei chemischer Kontrolle (Abb. 2.60 **B**) nachgewiesen. In allen Versuchen überwog unter den Acaridiolen das Z-Isomer.

In der Abb. 2.61 und 2.62 sind die GC-MS-Profile der Konversionsextrakte nach 5 h Kultivierungszeit dargestellt. Das GC-Profil des chemischen Kontrollversuches und des Kultivierungsversuches mit lebenden Zellen war in beiden Fällen nahezu identisch (Abb. 2.61 und 2.62). Die Ausbeute an 1,2- β -Myrcendihydrodiol aus dem 1,2-Epoxid **3** war in Anwesenheit aktiver Zellen zwei- bis dreimal so hoch wie die im chemischen Kontrollversuch (Tab. 2.8, Abb. 2.60 **A** und **B**), während für 3,10- β -Myrcendihydrodiol aus dem 3,10-Epoxid **4** in beiden Versuchen gleiche Ausbeuten gemessen wurden (Tab. 2.9, Abb. 2.60 **C** und **D**). Daraus folgt, dass die Hydrolyse beider Epoxide auch unabhängig von aktiven Zellen erfolgt. Das 3,10-Epoxy- β -myrcen erwies sich instabiler als das 1,2-Epoxy- β -myrcen, da dessen Hydrolyse in chemischem Kontrollversuch wie in Anwesenheit lebender Zellen gleich schnell erfolgte (Abb. 2.60 **C** und **D**). Zwecks Charakterisierung der Hydrolyse zu vicinalen Diolen wurden chirospezifische GC-Trennungen durchgeführt. Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse ergab für das 1,2-Diol den ee-Wert 71,5 % und für das entsprechende 3,10-Diol den ee-Wert 20,1 %. Da bei der Dosierung racemische Epoxide eingesetzt wurden, zeigt die Epoxidhydrolyse zu vicinalen Diolen die Bevorzugung einer bestimmten absoluten Konfiguration, so dass Enzymbeteiligung von Epoxidhydrolasen aufgrund dieser Enantioselektivität anzunehmen ist. Die stark abweichenden ee-Werte

deuten darauf hin, dass die chemische Hydrolyse beim 3,10-Epoxid im Gegensatz zu seinem 1,2-Isomer gegenüber der Enzymkatalyse größeren Anteil annimmt.

Die Ausbeute an α -Acaridiolen überwog in den chemischen Kontrollversuchen gegenüber den Kultivierungsexperimenten (Tab. 2.8 und 2.9, Abb. 2.60 **B** und **D**). Für diese Umsetzungen kann deshalb eine Enzymabhängigkeit nicht zwingend postuliert werden. Auch bezüglich der Stereoselektivität der chemischen 1,4-Addition von Wasser an das jeweilige Vinylepoxid konnten Unterschiede zwischen den beiden Epoxiden beobachtet werden. 1,2-Epoxy- β -myrcen bildete bevorzugt die E-Konfiguration des α -Acaridiols, während aus dem entsprechenden 3,10-Epoxy-Derivat beide Stereoisomere in nahezu ausgeglichenem Verhältnis von durchschnittlich 1:1,3 (α -E-Acaridiol : α -Z-Acaridiol) entstanden (Tab. 2.9, Abb. 2.60).

Die GC-MS-Profile in Abb 2.62 und 2.63 blieben im Verlauf der Kultivierungszeit nahezu unverändert. Bezüglich der α -Z-Acaridiol- und Perillenbildung erwies sich nur 3,10-Epoxy- β -myrcen als Vorstufe relevant. Der Nachweis von α -Z-Acaridiol in signifikanten Mengen zeigt eindeutig die Zugehörigkeit des 3,10-Epoxy- β -myrcens zur Perillenbiogenese, da das α -Z-Acaridiol wiederum die Biovorstufe der Perillenbildung darstellt (2.3.2.2). Das Positionsisomer 1,2-Epoxy- β -myrcen ergab kein Perillen in nachweisbaren Mengen als Produkt und das α -Z-Acaridiol wurde lediglich in Spuren nachgewiesen, so dass das 1,2-Epoxy- β -myrcen für die Perillenbiogenese praktisch ohne Bedeutung ist. Perillen wurde zwar in Spuren auch beim chemischen Kontrollversuch mit 3,10-Epoxid als Substrat nachgewiesen, in Anwesenheit lebender Zellen entstand es jedoch in höherer Konzentration. In der Abb. 2.63 sind die zugehörigen Chromatogramm-Regionen nach Kultivierung und chemischer Kontrolle für Perillen und α -Z-Acaridiol dargestellt.

Zur Aufstellung von Bildungs- und Abbaukinetiken wurde der Dosierungsversuch mit dem Substrat 3,10-Epoxy- β -myrcen mit stündlicher Probenahme wiederholt. Die Gesamtkonversionszeit erstreckte sich dabei über 5 h. In der Abb. 2.64 (**C**) ist die Abbaukinetik von 3,10-Epoxy- β -myrcen dargestellt. Interessant war, dass der Abbau durch die Anwesenheit lebender Zellen verzögert wurde.

Mit dieser Verzögerung ging insgesamt die prozentuale Ausbeute an α -Z-Acaridiol auf nahezu die Hälfte zurück (Abb. 2.64 **B**). Die beiden Kinetiken deuten somit auf eine Umsetzung von 3,10-Epoxy- β -myrcen, bei der ein Seitenweg zum α -Z-Acaridiol beobachtet wird. Ein entsprechendes Ergebnis lieferte die Bildungskinetik von 3,10- β -Myrcendihydrodiol (Abb. 2.64 **A**). Im chemischen Kontrollversuch erfolgte die Hydrolyse schneller als in Anwesenheit lebender Zellen.

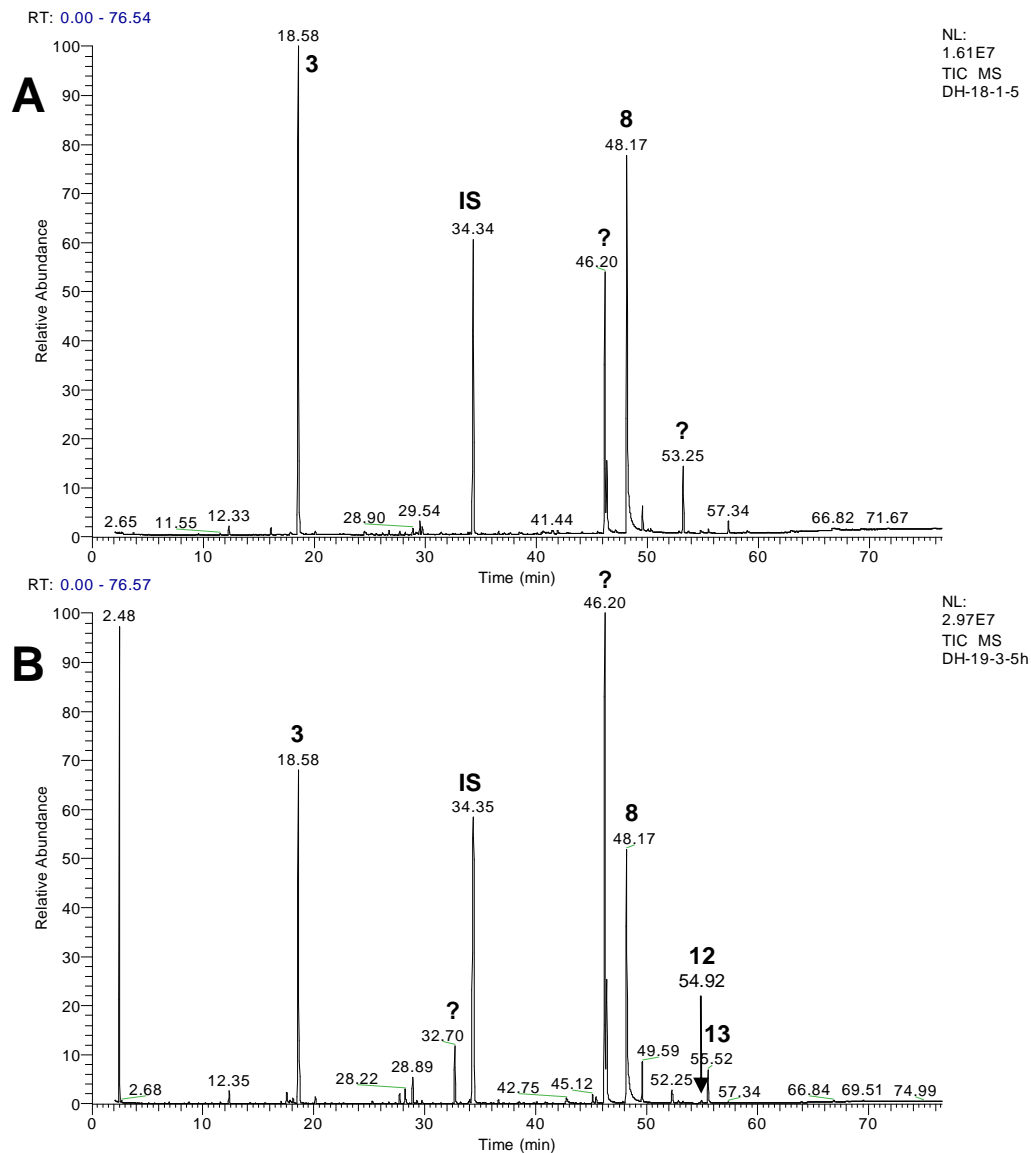


Abbildung 2.61: GC-MS-Chromatogramme der Biokonversionsextrakte mit Dosierung von 1,2-Epoxy- β -myrcen **3**; Probenahme: 5h; Säule: ZB-Wax; **A** : Dosierung in lebende Kultur; **B** : chem. Kontrollversuch mit inaktiviertem Mycel

Tabelle 2.8: Analytik des Biokonversionsextraktes nach Dosierung von 1,2-Epoxy- β -myrcen **3** in Bezug auf Abb. 2.61; GC-FID; Probenahme: 5 h; Dosierung in lebende Kultur: $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1526 \mu\text{mol L}^{-1}$); Dosierung in eine inaktivierte Kultur (chemische Kontrolle): $280 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1842 \mu\text{mol L}^{-1}$)

A: Ausbeute

	1,2- β -Myrcen-dihydrodiol 8	α -Z-Acaridiol 12	α -E-Acaridiol 13	1,2-Epoxy- β -myrcen 3
Kultivierungsversuch mit lebenden Zellen	$25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($147 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \mathbf{A = 9,6 \%}$)	Spuren	Spuren	$24,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($159 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \mathbf{A = 10,4 \%}$)
Chemischer Kontrollversuch	$9,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($58 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \mathbf{A = 3,8 \%}$)	Spuren	$0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \mathbf{A = 0,3 \%}$)	$9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($64 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \mathbf{A = 4,2 \%}$)

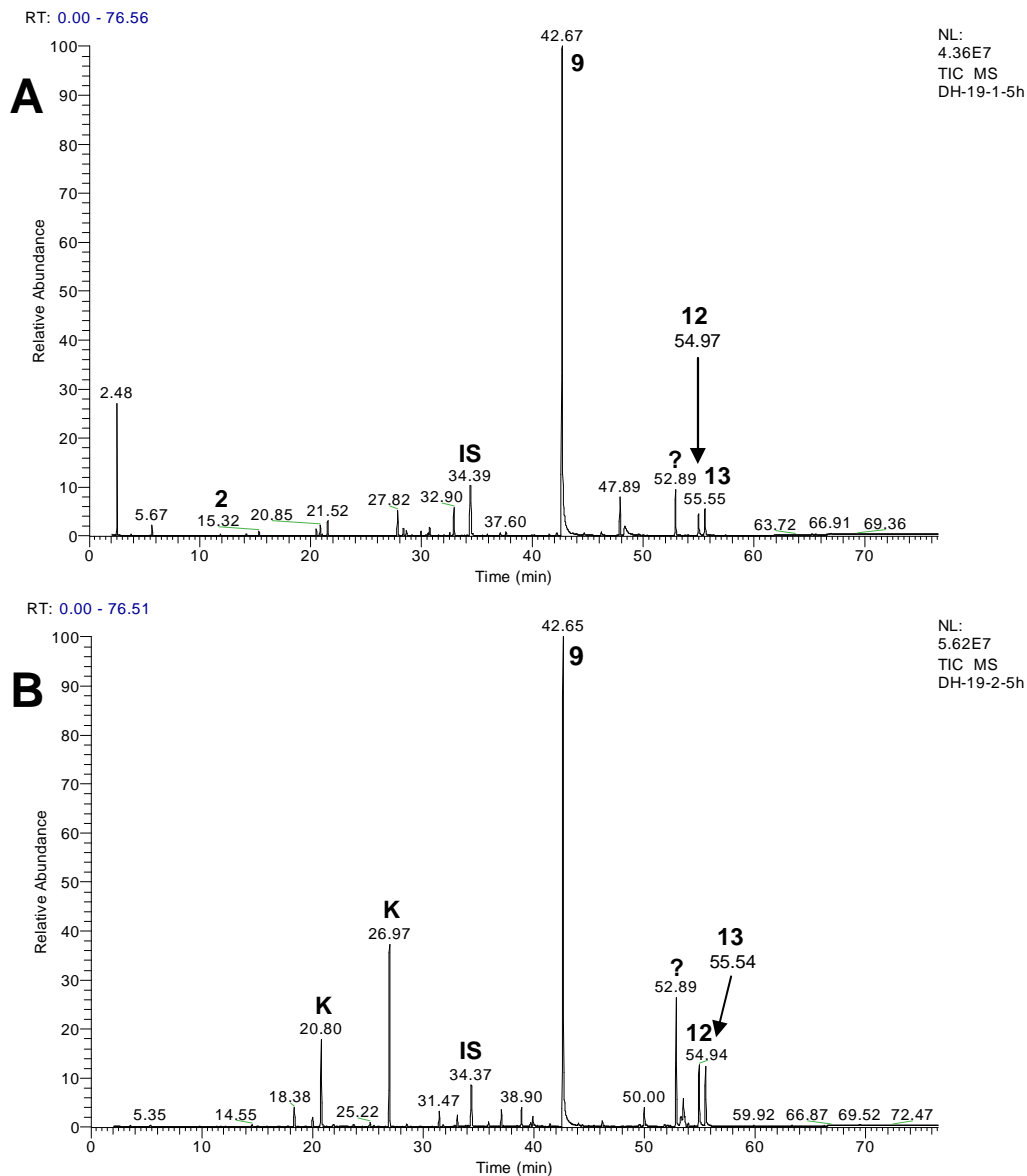


Abbildung 2.62: GC-Chromatogramm des Biokonversionsextraktes mit Dosierung von 3,10-Epoxy- β -myrcen **3**; Probenahme: 5 h; Säule: ZB-Wax; **A** : Dosierung in lebende Kultur; **B** : chem. Kontrollversuch mit inaktiviertem Mycel; **IS**: interner Standard (n-Nonadecan); **K**: Kontamination

Tabelle 2.9: Analytik des Biokonversionsextraktes nach Dosierung von 3,10-Epoxy- β -myrcen **4** in Bezug auf Abbildung 2.62; GC-FID; Probenahme: 5 h; Dosierung in lebende Kultur: $230 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1513 \mu\text{mol L}^{-1}$); Dosierung in eine inaktivierte Kultur (chemische Kontrolle): $335 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2204 \mu\text{mol L}^{-1}$);

A: Ausbeute

	3,10- β -Myrcen-dihydrodiol 9	α -Z-Acaridiol 12	α -E-Acaridiol 13	3,10-Epoxy- β -myrcen 4
Kultivierungsversuch mit lebenden Zellen	$68,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($404 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 26,7 \%$)	$4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($24 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 1,6 \%$)	$3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($19 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 1,3 \%$)	-
Chemischer Kontrollversuch	$96,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($567 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 25,7 \%$)	$13,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($77 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 3,5 \%$)	$8,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($51 \mu\text{mol L}^{-1} \Rightarrow \text{A} = 2,3 \%$)	Spuren

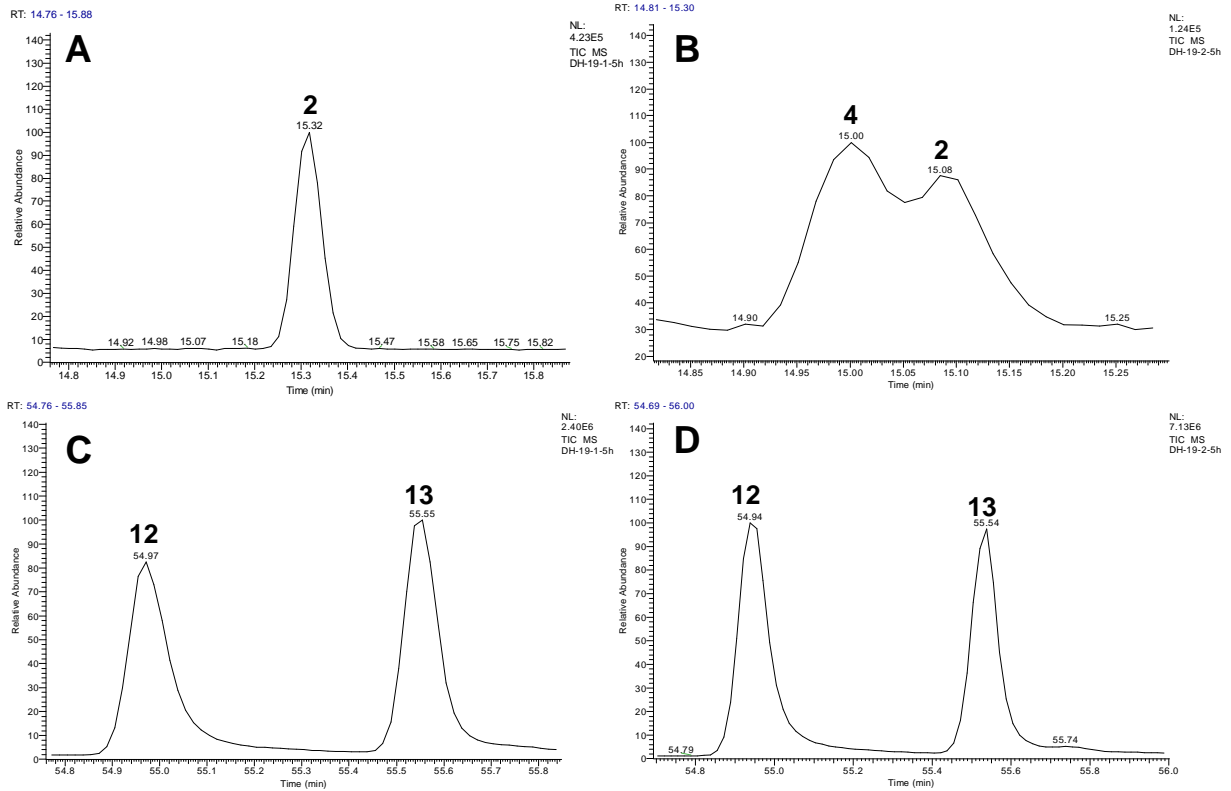


Abbildung 2.63: Chromatogramm-Regionen von Perillen **2**, 3,10-Epoxy- β -myrcen **4** α -Z-Acaridiol **12** und α -E-Acaridiol **13** beim Dosierungsversuch mit 3,10-Epoxy- β -myrcen als Substrat; Probenahme: nach 5 h Kultivierungszeit; GC-MS-Messung; Säule: ZB-Wax; **A, C**: Dosierung in lebende Kultur; **B, D**: chemischer Kontrollversuch mit inaktivierten Zellen

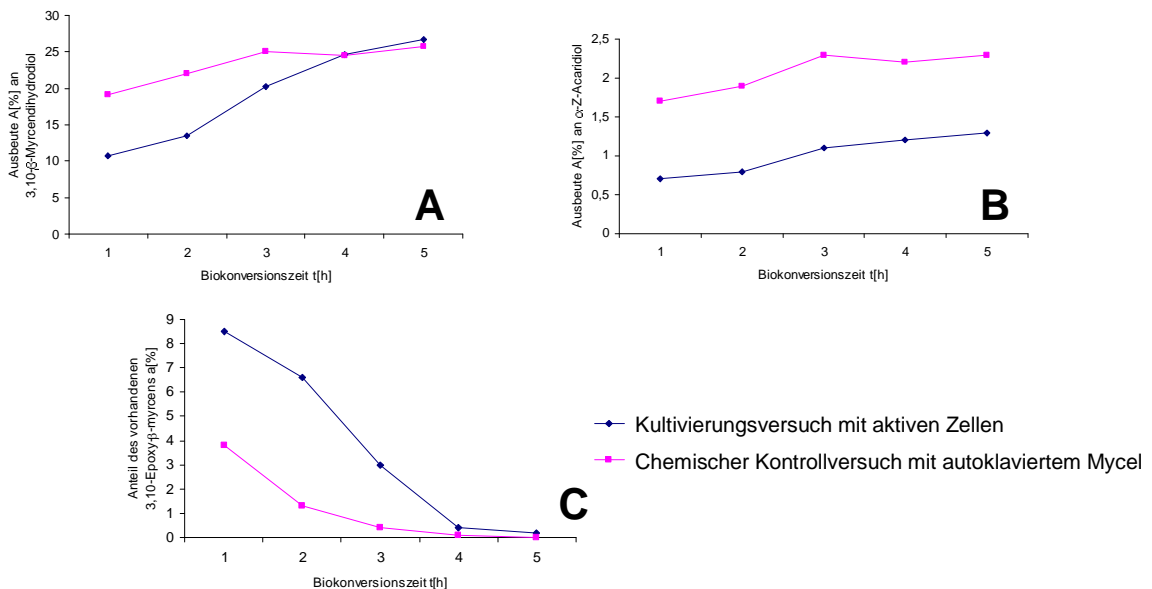


Abbildung 2.64: Biokonversionskinetik von 3,10-Epoxy- β -myrcen **4**; Bildung von 3,10- β -Myrcendihydrodiol **9** (**A**) und von α -Z-Acaridiol **12** (**B**), Abbau des Substrats **4** (**C**); Dosierungsversuch mit Schüttelkultur; Dosierung im Kultivierungsversuch mit aktiven Zellen: 23 mg 100 mL⁻¹ (151,3 μ mol 100 mL⁻¹); Dosierung im chemischen Kontrollversuch: 33,5 mg 100 mL⁻¹ (220,4 μ mol 100 mL⁻¹)

Die Gesamtwiederfindung nach 5 h betrug im Kultivierungsversuch 50 % und im chemischen Kontrollversuch 62 %. Aufgrund der Flüchtigkeit von Epoxiden könnte die entstandene Bilanzlücke durch den Verlust über die Gasphase erklärt werden.

Dosierungsversuche mit 6,7-Epoxy- β -myrcen als Substrat wurden ebenfalls zwecks Untersuchung der zugehörigen Hydrolyse-Kinetik durchgeführt. (Abb. 2.65). Die Konzentrationsabnahme des 6,7-Epoxids (Abb. 2.65 **B**) verzögerte sich auch hier in Anwesenheit aktiver Zellen gegenüber chemischer Kontrolle (vgl. Abb. 2.64 **C** und 2.60). Die Konzentration sank jedoch in beiden Fällen innerhalb von zwei Tagen auf null.

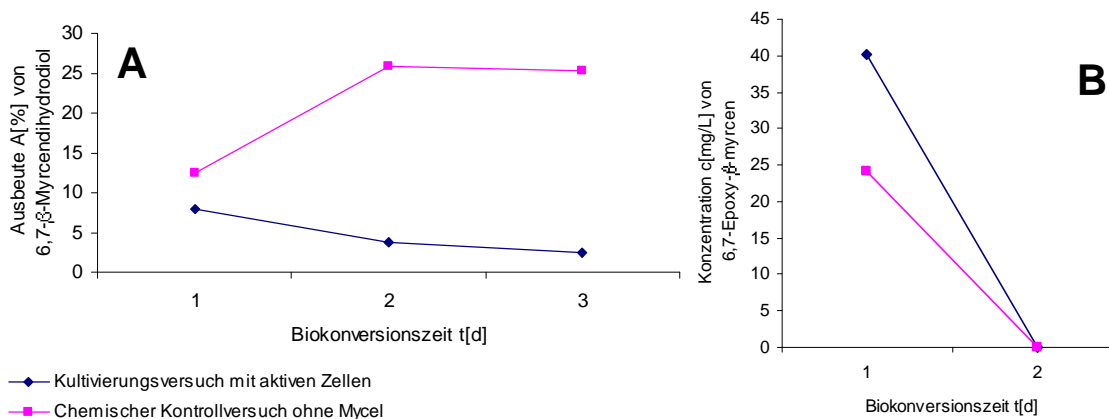


Abbildung 2.65: Bildungskinetik von 6,7- β -Myrcendihydrodiol **10** (Hydrolyse-Kinetik) ausgedrückt in prozentualer Ausbeute nach einmaliger Dosierung von 6,7-Epoxy- β -myrcen **5** in Schüttelkultur; Dosierung im Kultivierungsversuch mit aktiven Zellen: 159 mg 200 mL⁻¹ (935,3 μ mol 200 mL⁻¹) Dosierung im chemischen Kontrollversuch: 152,9 mg 200 mL⁻¹ (899,4 μ mol 200 mL⁻¹); **A:** Bildungskinetik des 6,7- β -Myrcendihydrodiols; **B:** Abbaukinetik von 6,7-Epoxy- β -myrcen

Im Gegensatz zu den vicinalen Diolen des konjugierten Doppelbindungssystems wurde das 6,7- β -Myrcendihydrodiol in Anwesenheit lebender Zellen von Anfang an umgesetzt. So sank die Konzentration von 66,7 mg L⁻¹ am 1.Tag (A[%] = 7,6 %) auf 21,9 mg L⁻¹ am 3.Tag (A[%] = 2,5 %) (Abb. 2.65 **A**). Dies erklärt, warum das 6,7- β -Myrcendihydrodiol im Nährmedium nicht akkumulierte und lediglich mit niedriger Konzentration nach β -Myrcendosierung nachgewiesen wurde. Nahezu keine Umsetzungsrate wurde im chemischen Kontrollversuch gemessen. Hier akkumulierte das 6,7- β -Myrcendihydrodiol mit einer Ausbeute von 25,8 %, die bereits am zweiten Tag erreicht wurde. Bis zum dritten Tag blieb die Konzentration nahezu konstant, da bis zum zweiten Tag das 6,7-Epoxy- β -myrcen in Anwesenheit und Abwesenheit des Mycels vollständig umgesetzt wurde und für die Hydrolyse nicht mehr zur Verfügung stand (2.66 **A**). Eine Umsetzung des 6,7- β -Myrcendihydrodiols wurde nicht weiter untersucht. Diese betraf vermutlich das konjugierte Doppelbindungssystem.

2.4.2 Biokonversion von α -Z-Acaridiol

Ein Dosierungsversuch mit α -Z-Acaridiol als Substrat führte im Kulturüberstand zur Perillenbildung in transienten Konzentrationen (2.3.2.2). Im chemischen Kontrollversuch wurde das Perillen nur in Spuren nachgewiesen. Zur Ermittlung der tatsächlichen Ausbeute und zwecks vollständiger Bilanzierung der Biokonversion wurde der Dosierungsversuch in einem Rührkesselreaktor mit Lewatit-Säule im Abluftraum wiederholt. Die Versuchsanordnung entsprach der in Kapitel 2.1.3. Die erste Dosierung erfolgte einen Tag nach der Inokulation des SNL-Mediums und dann täglich mit 29 mg pro 2 L Kulturmedium. Das Dosierungsexperiment erstreckte sich über 10 Tage mit täglicher Probenahme aus dem Kulturüberstand und adsorptiver Isolierung des Perillens aus dem Abluftraum sowie mit täglicher Analytik. Die Abb. 2.66 **A** zeigt die Bildungskinetik von Perillen.

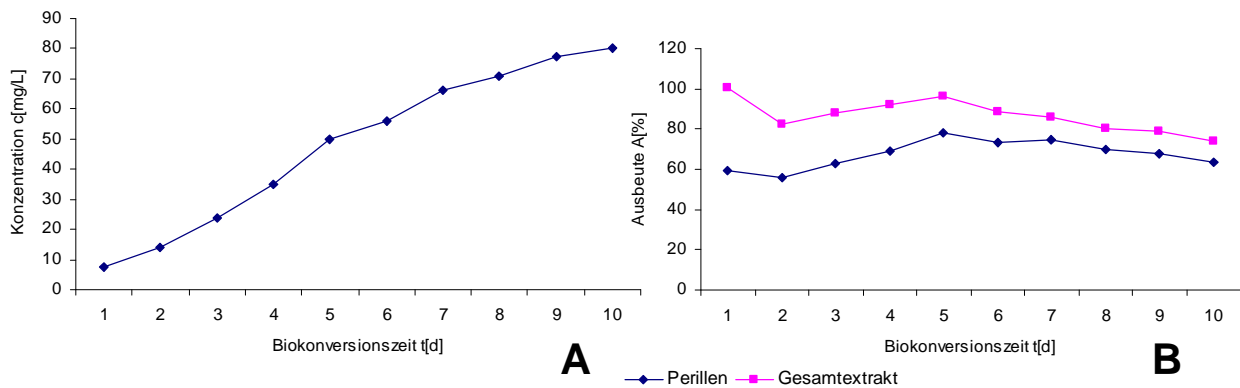


Abbildung 2.66: Biokonversion von α -Z-Acaridiol **12** in 2 L - Rührkesselreaktor; Bildungskinetik von Perillen (aufsummiert) **A**, Ausbeute von Perillen und Gesamtwiederfindung über den gesamten Kulturverlauf **B**; tägliche Dosierung: 29 mg je 2 L SNL-Medium; A[%] : Ausbeute des Gesamtextraktes in [%]; A_p[%] : Ausbeute an Perillen in [%]

Die Gesamtmenge an Perillen, die über 10 Tage produziert wurde betrug 160,6 mg entsprechend 80,3 mg L⁻¹ (Abb. 2.66 **A**) und fand sich zu fast 100 % auf der Lewatit-Säule wieder. Für die vollständige Bilanzierung und Bestimmung der Perillenausbeute wurde für jeden Tag die Summe der bis dahin produzierten Perillenmenge und die Gesamtsumme aller flüchtigen Komponenten herangezogen. Unter der Gesamtwiederfindung ist die Gesamtheit aller GC-gängigen, mit n-Pentan/Ether extrahierbaren Komponenten des Kulturüberstandes und der Lewatit-Säule gemeint. In der Abb. 2.66 **B** kann die Gesamtwiederfindung flüchtiger Stoffe und die Ausbeute des Perillens über den gesamten Kulturverlauf von 10 Tagen zeitlich verfolgt werden.

Die Ausbeute an Perillen erreichte am fünften Tag ihren maximalen Wert. Die ebenfalls am fünften Tag erreichte Gesamtwiederfindung betrug 96,2 % (Abb. 2.66 **B**) und wies damit lediglich eine kleine Bilanzlücke auf. Das Hauptprodukt von α -Z-Acaridiol war Perillen und erzielte am fünften Tag eine Ausbeute von 78,2 % (Abb. 2.66 **B**). Die Gesamtwiederfindung sank bis zum zehnten Kultivierungstag auf 73,8 %, die des Perillens auf 63,4 %.

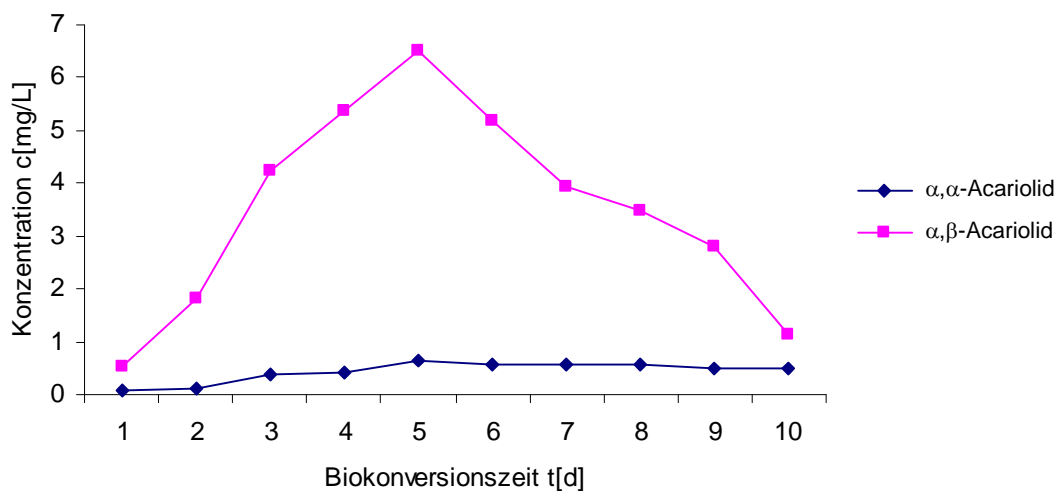


Abbildung 2.67: Bildungskinetik von α, α - und α, β -Acariolid **6** und **7** nach Biokonversion von α -Z-Acaridiol **12** im 2 L-Rührkesselreaktor; tägliche Dosierung: $14,5 \text{ mg L}^{-1}$ SNL-Medium

Interessant war auch das Konzentrationsverhältnis der Acariolide zueinander (Abb. 2.67). Beide erreichten mit $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ für α, α - und $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ für α, β -Acariolid ein Maximum am 5.Tag. Das Maximum für α, α -Acariolid war dabei weniger ausgeprägt. Dessen Konzentration blieb ab dem 5.Tag nahezu konstant. Das α, β -Acariolid wurde gegenüber seinem α, α -Isomer am 5.Tag in einem knapp zehnfachen Überschuss nachgewiesen. Das Acariolid-Verhältnis zeigte somit eine klare Bevorzugung des α, β -Reaktionsweges bei der Cyclisierung des α -Z-Acaridiols.

2.4.3 Biokonversion von α,α -Acarilactol

Das α,α -Acarilactol **32** dehydratisiert spontan zum Perillen (Locas *et al.*, 2004). Ein Dosierungsversuch mit α,α -Acarilactol wurde deshalb zwecks Untersuchung auf Oxidierbarkeit zum α,α -Acariolid **6** durchgeführt (Abb. 2.68). Die zuletzt genannte Verbindung wurde im Biokonversionsextrakt unter α,α -Acarilactol-Dosierung nachgewiesen. In der Abb. 2.68 **A** ist die entsprechende Bildungskinetik über einen zeitlichen Kulturverlauf von 4 Tagen dargestellt.

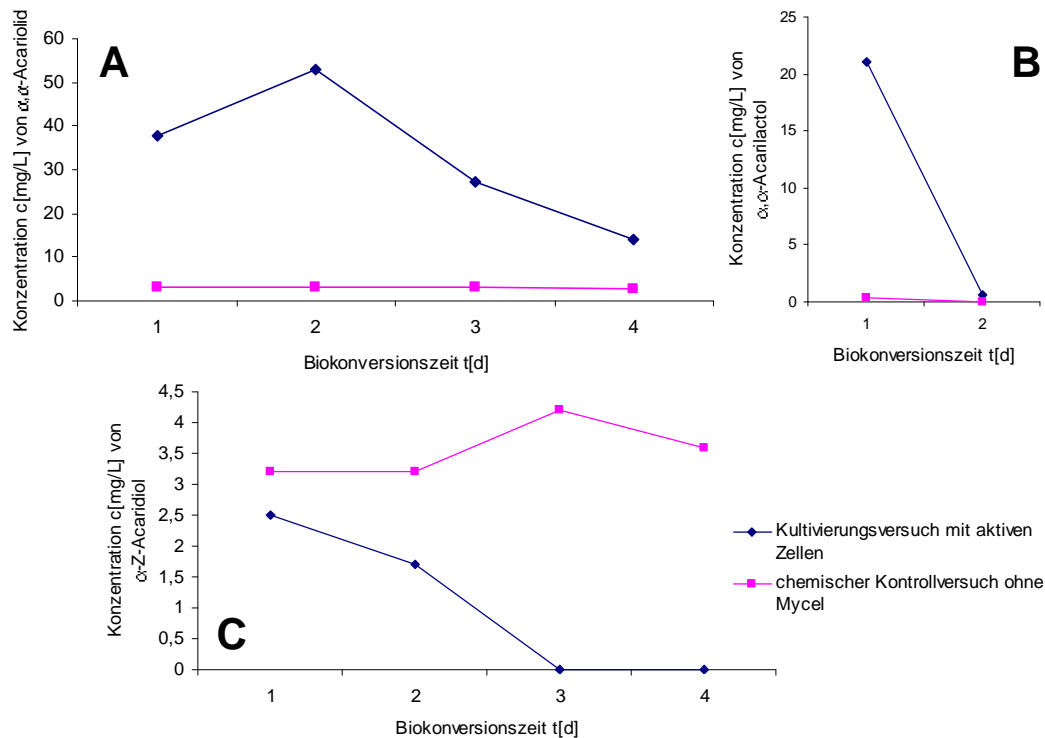


Abbildung 2.68: Biokonversion von α,α -Acarilactol **32** in Schüttelkultur; Bildungskinetik von α,α -Acariolid **A** und α -Z-Acariolid **C**; Abbaukinetik des Substrats **B**; einmalige Dosierung von 37,9 mg α,α -Acarilactol je 100 mL SNL-Medium

Da die Konzentration von α,α -Acariolid in Gegenwart aktiver Zellen höher als bei chemischer Kontrolle war, wird dort von einer enzymabhängigen Umsetzung des α,α -Acarilactols zum α,α -Acariolid ausgegangen. Die Produktkonzentration erreichte am zweiten Tag ein Maximum von 53,1 mg L⁻¹, entsprechend einer Ausbeute von 14,2 % (Abb. 2.68 **A**). Am vierten Tag lag die α,α -Acariolid-Konzentration nur noch bei 14,0 mg L⁻¹. Ab dem 2.Tag trat somit der Abbau des α,α -Acariolids stärker hervor, da das Substrat (α,α -Acarilactol **32**) am am 2.Tag nahezu vollständig umgesetzt war (Abb. 2.68 **B**) und für eine Produktneubildung nicht mehr zur Verfügung stand.

Im chemischen Kontrollversuch wurde dagegen über den gesamten Kulturverlauf eine konstante Konzentration des α,α -Acariolids von nur $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen. Auch α -Z-Acaridiol wurde im SNL-Medium in gleicher Konzentration ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$) nachgewiesen (Abb. 2.68 C, 2.70). Dessen Bildungskinetik wurde deshalb ebenfalls aufgenommen. Nahezu gleiche Konzentrationen des α,α -Acariolids **6** und des α -Z-Acaridiols **12** deuten auf eine partielle Disproportionierung des Substrats hin. Die Abb. 2.69 zeigt einen möglichen Mechanismus.

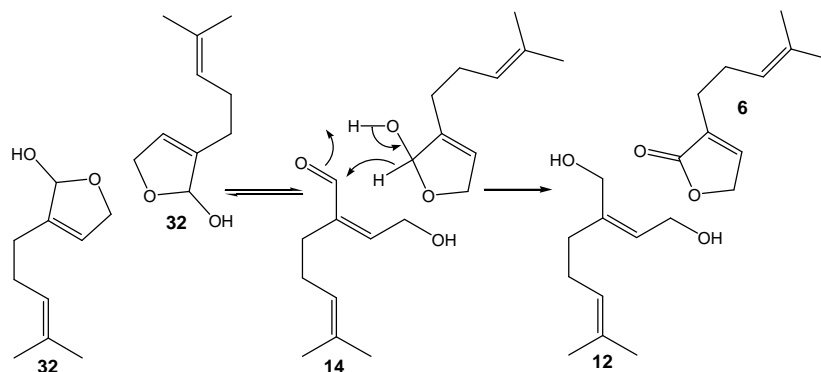


Abbildung 2.69: Formulierung einer Disproportionierungsreaktion von α,α -Acariolactol **32** im SNL-Medium (chemischer Kontrollversuch); **14**: α -Z-Acariolal; **12**: α -Z-Acaridiol; **6**: α,α -Acariolid

Diese Reaktion kann mit oder ohne Ringöffnung erfolgen. Da α -Z-Acariolal **14** im chemischen Kontrollmedium in Spuren nachgewiesen wurde, ist die Reaktion unter Ringöffnung anzunehmen (Abb. 2.69). Eine Hydrid-Übertragung vom Lactolring auf die Aldehyd-Gruppe des α -Z-Acariolals **14** wird dabei postuliert. Die Bildungskinetik von α -Z-Acaridiol zeigt dessen weitere Umsetzung in Gegenwart aktiver Zellen, nicht aber bei chemischer Kontrolle (Abb. 2.68 C). Das α -Z-Acaridiol wurde dabei innerhalb weniger Tage umgesetzt. Dies korreliert mit dem Ergebnis des Bioreaktorversuches in Kapitel 2.4.2, bei dem eine Perillenbildung aus α -Z-Acaridiol in Gegenwart aktiver Zellen gemessen wurde (Abb. 2.66). Umgekehrt war es bei der Abbaukinetik von α,α -Acariolactol (Abb. 2.68 B). Im chemischen Kontrollversuch erfolgte der Abbau schneller als im Kultivierungsversuch mit lebenden Zellen.

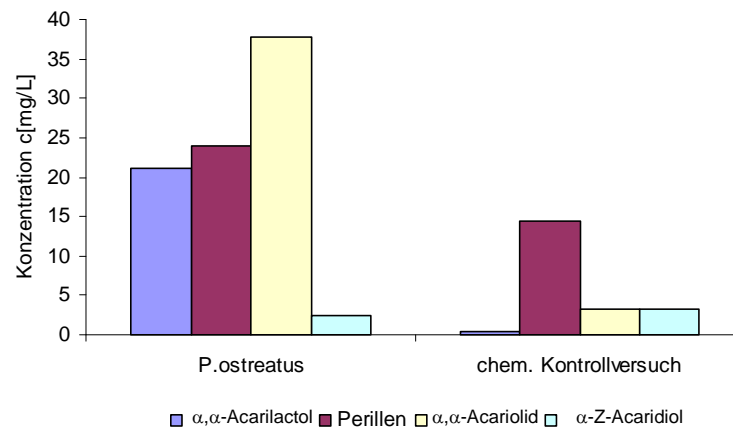


Abbildung 2.70: Zusammenstellung der Produktkonzentrationen nach einmaliger Dosierung von 37,9 mg α, α -Acarilactol **32** je 100 mL SNL-Medium; Biokonversionszeit: 24 h; Ausschnitt der Abb. 2.68

In Abb. 2.70 sind die Konzentrationen der Produkte und des Substrates am ersten Tag nach der Dosierung zusammengestellt. Hier war die Bildung von α, α -Acariolid eine der Hauptumsetzungen des Kultivierungsversuches (Abb. 2.70, links). Die Quantifizierung des Perillens bei Schüttelkulturen ist aufgrund der Verluste über die Gasphase nicht möglich (Abb. 2.34 **B**). Die gemessenen Konzentrationen entsprechen nicht den tatsächlich gebildeten Mengen an Perillen. Es ist anzunehmen, dass das α, α -Acarilactol nahezu quantitativ zum Perillen dehydratisiert wurde. Deutlich zu sehen sind ferner die gleichen Konzentrationen an α -Z-Acaridiol und α, α -Acariolid, die die bereits erwähnte Disproportionierung des α, α -Acarilactols belegen.

2.4.4 Folgekonversionen von Perillen

Eine Untersuchung der Biokonversion von Perillen war vor allem notwendig, um festzustellen in wie weit Produktverluste auf chemischem Weg auftreten. Interessant waren Fragestellungen, die sowohl das Ausmaß als auch die genaue Charakterisierung der Folgekonversionen betreffen. Der Versuch im Rührkesselreaktor (2.4.2) zeigte bereits die Möglichkeit auf, durch den aktiven Austrieb des flüchtigen Perillens mit dem Luftstrom Folgekonversionen weitgehend zu unterbinden. Um eventuelle Produkte von Perillen zu erfassen, wurde eine 100 mL-Schüttelkultur ohne aktive Sauerstoffbegasung eingesetzt. Der Kultivierungsversuch erfolgte mit Probenahmen am ersten, zweiten und vierten Tag mit einmaliger Perillen-Dosierung von 11,9 mg 100 mL⁻¹ SNL-Medium.

Als Hauptprodukt des Perillens bei *P. ostreatus* entstand das α, α -Acariolid **6**, während sein α, β -Isomer gar nicht nachgewiesen wurde. Die Abb. 2.71 **A** gibt die dazu gehörige Bildungskinetik wieder.

Das α,α -Acariolid **6** erreichte am zweiten Tag nach der Dosierung ein Konzentrationsmaximum von $5,2 \text{ mg L}^{-1}$. Nachdem das Perillen infolge seiner Biokonversion und dem Verlust über die Gasphase ab dem zweiten Tag für chemische Umsetzungen nicht mehr verfügbar war, erfolgte der Abbau von α,α -Acariolid, dessen Konzentration am vierten Tag einen Wert von $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ erreichte (Abb. 2.71 **A**). Da Produkte im chemischen Kontrollversuch nur in Spuren nachgewiesen wurden, kann eine enzymabhängige Oxidation des Perillens zum α,α -Acariolid angenommen werden. Die Biokonversion von Perillen zum α,α -Acariolid erklärt den bei der Dosierung von β -Myrcen (Abb. 2.33) aufgetretenen Überschuss an α,α -Acariolid gegenüber seinem α,β -Isomer sowie den umgekehrten Überschuss an α,β -Acariolid bei der Dosierung von α -Z-Acaridiol. Bei geringen Perillenbildungsraten (Abb. 2.34), wie sie durch Biokonversion von β -Myrcen gemessen wurden (siehe limitierende Schritte in Abb. 2.73), steht das Perillen insgesamt den aktiven Zellen gegenüber länger und im größeren Anteil für Umsetzungen zur Verfügung als bei der Biokonversion von α -Z-Acaridiol, bei der überdurchschnittliche Perillenmengen schnell gebildet werden und zum großen Teil in die Gasphase übergehen. Im ersten Fall wird das Perillen in größerem Ausmaß zum α,α -Acariolid umgesetzt als im zweiten Fall.

Besonders auffallend war bei der Untersuchung der Perillenkonversion die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme von Perillen im SNL-Medium. Anders als bei den β -Myrcenepoxiden und α,α -Acarilactol sank die Perillenkonzentration im Kulturmedium in Gegenwart aktiver Zellen schneller als im SNL-Medium des chemischen Kontrollversuches (Abb. 2.71, **B**).

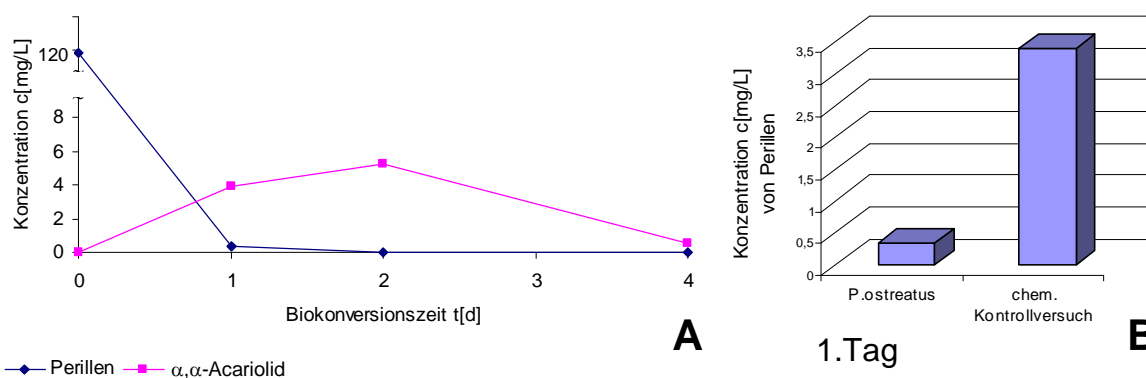


Abbildung 2.71: Bildungskinetik von α,α -Acariolid in Anwesenheit aktiver Zellen **A** und Zusammenstellung der Perillenkonzentrationen des chemischen Kontrollversuches und des Kultivierungsversuches mit aktiven Zellen **B** am ersten Tag nach der Dosierung von $11,9 \text{ mg}$ Perillen je 100 mL SNL-Nährmedium

Die Konzentration am ersten Tag im chemischen Kontrollversuch lag mit $3,4 \text{ mg L}^{-1}$ gegenüber $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ im Kultivierungsversuch um den Faktor 10 höher. Offensichtlich war die Biokonversion zum α,α -Acariolid für die Konzentrationsabnahme im Kulturmedium

mitverantwortlich, während im SNL-Medium des chemischen Kontrollversuches das Perillen als eine stabile Verbindung keiner chemischen Umsetzung unterlag. Andere Produkte des Perillens wurden nur im Spurenbereich nachgewiesen, so dass auf eine graphische Darstellung der Bildungskinetiken verzichtet wurde. Insgesamt sind Perillenverluste durch Folgekonversionen mit Ausnahme der biochemischen Oxidation zum α,α -Acariolid zu vernachlässigen.

2.4.5 Monoterpenalkohole und -aldehyde als Vorstufen einer Furanbildung

Zum Ausschluss einer Cyclisierung von Geraniol **64** und 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **23** zum Perillen wurden beide Verbindungen ebenfalls in Dosierungsversuchen eingesetzt. Für keinen der beiden Alkohole wurde jedoch eine Cyclisierung zum Perillen beobachtet. Biokonversionen waren insgesamt sehr schwach ausgeprägt. Die genannten Reaktionswege wurden deshalb ausgeschlossen. Auch die entsprechenden Aldehyde Geranial, Neral und 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22** ergaben keine Cyclisierung zu Furanen (Perillen bzw. Rosenfuran). Die einzige Konversion, die nicht auch im chemischen Kontrollversuch auftrat, war die Cyclisierung des Aldehyds **22** zum α,α -Acariolid (Abb. 2.72). Dieses 2(5H)-Furanon entstand jedoch nur in Spuren.

Da Neral und Geranial als Biokonversionsprodukte von β -Myrcen nicht identifiziert wurden, ist ein Zusammenhang mit der hier beschriebenen Perillenbiogenese unwahrscheinlich.

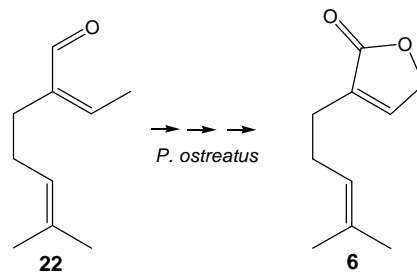


Abbildung 2.72: Nachgewiesene Biokonversion von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal **22** zum α,α -Acariolid **6** durch *Pleurotus ostreatus*

Zusammenfassung für 2.4

Dosierungen der (1,2-, 3,10- und 6,7-) Epoxy- β -myrcene zu Kulturen von *P. ostreatus* ergaben vicinale Diole als Hauptkonversionsprodukte. Unter ihnen wurde jedoch nur das 3,10-Epoxy-Derivat als Perillenvorstufe identifiziert. GC-Profile der chemischen Kontrollversuche mit inaktivierten Zellen und Kultivierungsversuche mit lebenden Zellen zeigten untereinander kaum Unterschiede. Da die Acaridiol-Bildung im chemischen Kontrollversuch überwog, kann auch für die 1,4-Hydrolyse des 3,10-Epoxids ein chemischer Schritt angenommen werden. Die Konversion von 3,10-Epoxy- β -myrcen erfolgte in Anwesenheit aktiver Zellen schneller als im chemischen Kontrollversuch.

Im Bioreaktor erfolgte nach täglicher Dosierung von α -Z-Acaridiol eine kontinuierliche, quantitative in-situ-Abtrennung des Perillens in einer Gesamtmenge von 80,3 mg L⁻¹. Die Biokonversionszeit betrug 10 Tage. Die maximale Ausbeute erreichte am fünften Tag einen Wert von 78,2 %. Das Mengenverhältnis beider Acariolide steht mit $\alpha,\alpha : \alpha,\beta = 1 : 11$ und zeigt, dass der α,β -Weg bevorzugt ist.

Der Dosierungsversuch mit α,α -Acarilactol wurde zur Klärung des Biokonversionsweges zum α,α -Acariolid durchgeführt. Dessen Nachweis im Biokonversionsextrakt in höheren Konzentrationen als im chemischen Kontrollversuch und dessen Bildungskinetik ließ eine enzymabhängige Umsetzung erkennen. Neben einer Bildung wurde auch ein Abbau des α,α -Acariolids beobachtet, welcher im gesonderten Dosierungsversuch mit dem α,α -Acariolid bestätigt wurde. Aufgrund der über den gesamten Kulturverlauf konstanten Konzentrationen an α,α -Acariolid und α -Z-Acaridiol im chemischen Kontrollversuch wurde eine spontane Disproportionierung des α,α -Acarilactols postuliert. α -Z-Acaridiol wurde jedoch in Anwesenheit lebender Zellen vollständig abgebaut.

Zur Untersuchung auf Folgekonversionen des Perillens wurde ebenfalls ein Dosierungsversuch durchgeführt. Als Hauptprodukt entstand α,α -Acariolid, dessen Abbau im späteren Kulturverlauf gemessen werden konnte. Da Produkte im chemischen Kontrollversuch nur in Spuren nachgewiesen wurden, wird von einer enzymabhängigen Oxidation des Perillens zum α,α -Acariolid ausgegangen. Die Konzentration des Perillens nahm in Anwesenheit aktiver Zellen schneller ab als im chemischen Kontrollversuch ohne Mycel. Als Ursache ist der biochemische Abbau zum α,α -Acariolid anzunehmen.

Durch weitere Dosierungsversuche wurden die Monoterpenalkohole Geraniol und 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol als auch die Aldehyde Geranial und 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal als Zwischenstufen der Perillenbiogenese ausgeschlossen.

2.5 Validierter Mechanismus der Perillenbiogenese

Durch Dosierungsversuche mit den Substraten 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol **22**, 1,2- **3** und 3,10-Epoxy- β -myrcen **4** erwies sich nur das 3,10-Epoxid **4** als initiale Zwischenstufe der Perillenbiogenese. Unter mehreren Hydrolyse-Produkten des 3,10-Epoxids **4** wurde auch α -Z-Acaridiol nachgewiesen, das jedoch nur als Nebenprodukt gebildet wurde. Durch Biokonversion des α -Z-Acaridiols resultierte Perillen mit einer Ausbeute von nahezu 80 %. Dieses Substrat gilt somit als Schlüsselmetabolit der Perillenbiogenese. Die Reihenfolge der ersten beiden Schritte wurde eindeutig belegt. Die enzymatische Epoxidierung der konjugierten Doppelbindung zwischen C3 und C10 erfolgte vor der Hydratisierung des resultierenden Vinylepoxids. An der geringen Bildungsrate des α -Z-Acaridiols und der allgemein geringen Produktausbeute der β -Myrcenbiokonversion zeigt sich eine Limitierung der ersten beiden Transformationsschritte (Abb. 2.73). Das Auftreten von α,α - und α,β -Acariolid **6** und **7** bzw. α,α - und α,β -Acarilactol **32** und **11** als Konversionsprodukte deutete auf die Koexistenz zweier Reaktionswege bei der Cyclisierung des α -Z-Acaridiols **12** zum Perillen. Eine Dosierung dieses Schlüsselmetabolites **12** ergab, dass der α,β -Weg bevorzugt ist. Die Identifizierung des α -Z-Acarialols **14** als Biokonversionsprodukt des β -Myrcens und des α -Z-Acaridiols belegte das α -Z-Acarialol als Zwischenstufe. Die Oxidation des α -Z-Acaridiols zum jeweiligen 4-Hydroxy-2-butenal **14** bzw. **33** ist als enzymatischer Schritt anzunehmen. Die anschließende Cyclisierung zu den jeweiligen Halbacetalen α,α - **32** und α,β -Acarilactol **11** und die nachfolgende Aromatisierung zum furanoiden Perillen laufen spontan ab und stellen nicht enzymatische Schritte dar (Perez Locas *et al.*, 2004).

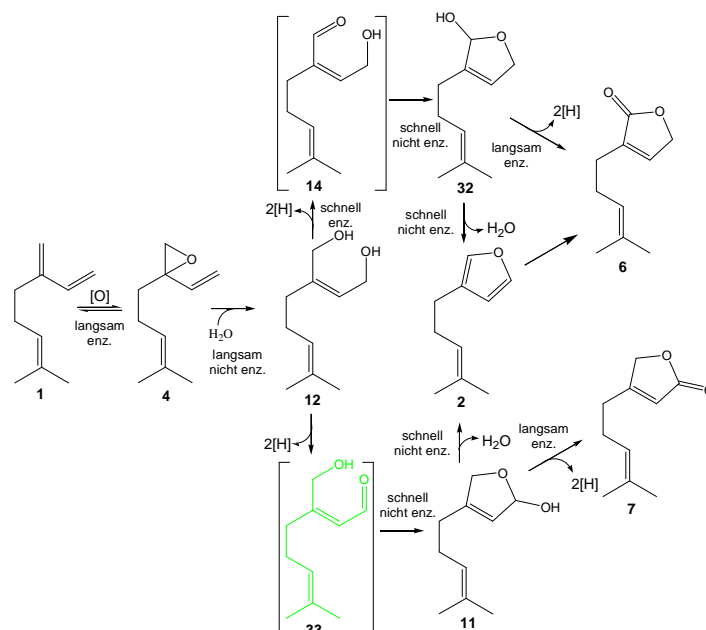


Abbildung 2.73: Abgeleiteter Mechanismus der Perillenbiogenese aus β -Myrcen mit *P. ostreatus*

Die Bildung der beiden Acariolide **6** und **7** aus α -Z-Acaridiol stellte je eine Seitenreaktion bei der Perillenbiogenese aus β -Myrcen dar. Das Biokonversionsschema ist in der Abb. 2.73 dargestellt.

2.6 Analoge Biokonversion von β -Ocimen

β -Ocimen ist ein Konstitutionsisomer des β -Myrcens. Beide Monoterpene unterscheiden sich in ihren Strukturen durch die Position einer der konjugierten Doppelbindungen. Vom β -Ocimen existieren zwei Stereoisomere [E/Z] (Abb. 2.74).

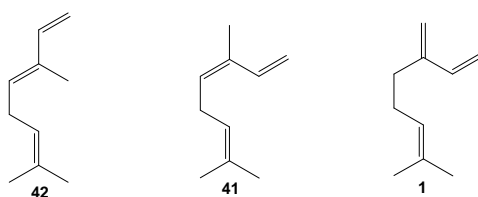


Abbildung 2.74: Strukturformeln von β -Myrcen **1**, Z- **41** und E-Ocimen **42**

Da bei der Perillenbildung aus β -Myrcen eine Cyclisierung am konjugierten Doppelbindungssystem erfolgt, stellte sich die Frage, ob auch andere Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungssystemen durch *P. ostreatus* zu furanoiden Spezies cyclisiert werden können. Eine verfügbare Verbindung, deren Biokonversion untersucht wurde, war β -Z-Ocimen, welches in Gemisch mit Limonen im Verhältnis 7/2,5 (w/w) kommerziell bezogen wurde. Die zur Perillenbildung analoge Cyclisierung am Doppelbindungssystem des β -Ocimens führt zum Rosenfuran. In der Abb. 2.75 sind die entsprechenden Reaktionen von β -Myrcen und β -Z-Ocimen formuliert.

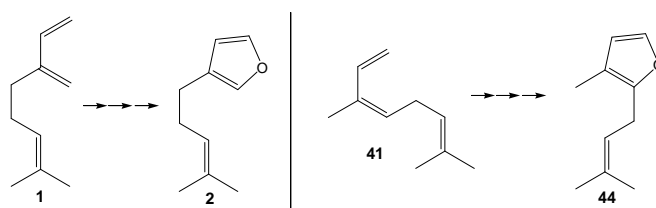


Abbildung 2.75: Cyclisierung eines Doppelbindungssystems zum Furanoid am Beispiel von β -Myrcen **1** zum Perillen **2** und β -Z-Ocimen **41** zum Rosenfuran **44**

Um eine Rosenfuranbildung aus β -Ocimen nachzuweisen, wurde ein Dosierungsversuch mit β -Z-Ocimen als Substrat durchgeführt. Zwei Tage nach der Dosierung erfolgte eine *flüssig-flüssig*-Extraktion des SNL-Mediums mit n-Pentan/Ether-Azeotropgemisch. Eine gaschromatographische Untersuchung des Extraktes mittels GC-FID, GC-MS und GC-O

diente der Produktcharakterisierung. In der Abb. 2.76 **A** ist das zugehörige GC-MS-Profil dargestellt.

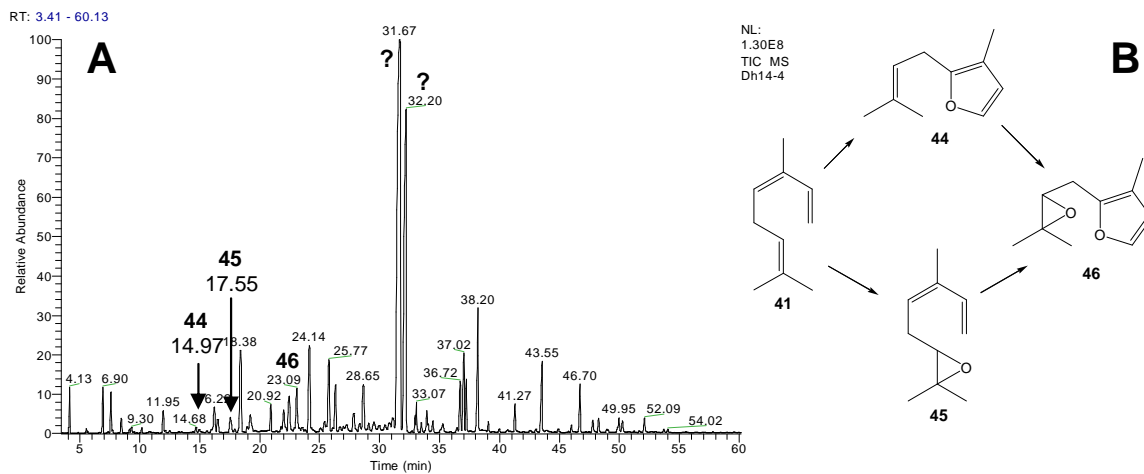


Abbildung 2.76: Biokonversion von β -Z-Ocimen/(-/+)-Limonen; Dosierung je 100 mL SNL-Nährmedium: 28,9 mg β -Z-Ocimen und 10,3 mg (-/+)-Limonen; GC-MS-Chromatogramm des Biokonversions-extraktes **A** und das zugehörige Biokonversionsschema **B**; **44**: Rosenfuran, **46**: Epoxyrosenfuran, **45**: 6,7-Epoxy- β -Z-ocimen

Unter den Biokonversionsprodukten wurde das Rosenfuran **44** in Spuren sowie das Epoxyrosenfuran **46** in deutlich höherer Konzentration nachgewiesen. Daneben wurde auch das 6,7-Epoxy- β -Z-ocimen **45** als Produkt identifiziert (Abb. 2.76 **B**). Mit Hilfe der verfügbaren Daten ließ sich jedoch nicht feststellen, ob die Epoxidierung vor oder nach der Cyclisierung des konjugierten Doppelbindungssystems erfolgt. Trotz sterischer Hinderung an der trisubstituierten, konjugierten Doppelbindung konnte eine Cyclisierung des Doppelbindungssystems auch am β -Z-Ocimen nachgewiesen werden. Eine Epoxidierung tritt jedoch als störender Seitenreaktionsweg auf. Im chemischen Kontrollversuch mit β -Z-Ocimen wurden unter gleichen Bedingungen die hier genannten Oxidationsprodukte nicht nachgewiesen. Mittels einer GC-O-Untersuchung wurden den Verbindungen **45** und **46** charakteristische Aromanoten zugeordnet. So wurden Epoxyrosenfuran mit einer minzigen Note und 6,7-Epoxy- β -Z-ocimen mit einer fruchtigen Note nach Litchi charakterisiert. Die Hauptprodukte mit den Retentionszeiten 31,67 min und 32,2 min, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden mit Attributen „nach Parfum, Shampoo, Lavendel und Citrone“ beschrieben. Die Abb. 2.76 **B** gibt die Biokonversionen des β -Z-Ocimens wieder.

In der Abb. 2.77 sind die einzelnen Massenspektren der β -Z-Ocimen-Produkte aufgeführt. Das Rosenfuran **44** wurde nur in Spuren nachgewiesen und koeluierte mit einer weiteren Substanz. Die Koelution lieferte ein überlagertes Massenspektrum, in dem die Signale m/z 43, 57 und 85 nicht zum Massenspektrum des Rosenfurans gehören (vgl. Abb. 2.77 **A**). Alle

anderen Massenpeaks ergaben jedoch ein Fragmentierungsmuster, das durch Vergleich mit Literaturdaten (Ly *et al.*, 1977) dem Rosenfuran **44** zugeordnet wurden. Auch Epoxyrosenfuran **46** und Epoxy-Z-ocimen **45** wurden durch direkten Massenspektrenvergleich eindeutig identifiziert, jedoch **45** zusätzlich durch Epoxidierung mittels mCPBA aus Z-Ocimen synthetisch erhalten wurde (Abb. 2.77, vgl. auch 2.1.2.10 und 5.4.9)

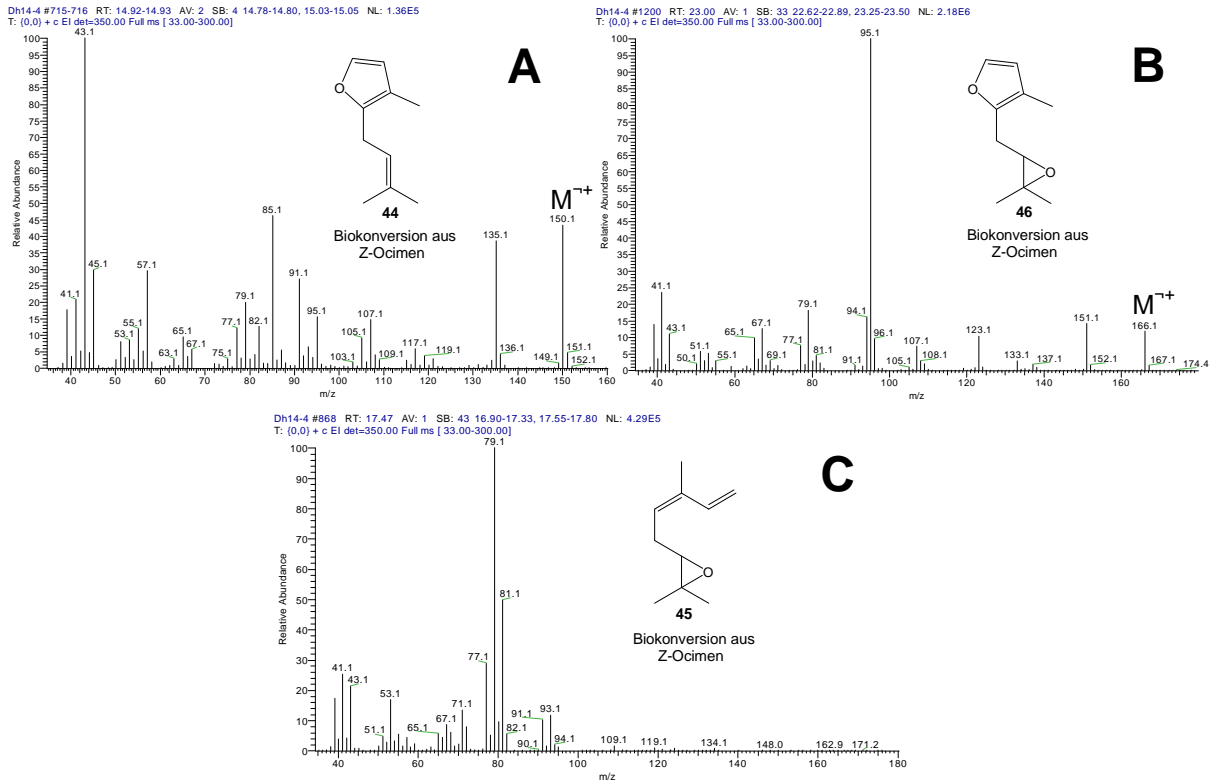


Abbildung 2.77: Massenspektren von Rosenfuran **44** (A), Epoxyrosenfuran **46** (B) und Epoxy-Z-ocimen **45** (C); [Quadrupol, EI, 70eV]

Zusammenfassung für 2.6

Zur Überprüfung, ob auch andere Verbindungen mit konjugiertem 1,3-Diensystem fähig sind zu Furanoiden zu cyclisieren, wurde eine Biokonversion von β -Z-Ocimen durchgeführt. Als Metabolite konnten neben Rosenfuran auch Epoxyrosenfuran und 6,7-Epoxy- β -Z-ocimen identifiziert werden. Beide weisen angenehme Aromanoten auf. Darüber hinaus wurden zwei Hauptprodukte mit attraktiven Parfum-Noten nachgewiesen, die jedoch nicht identifiziert wurden.

3 Diskussion

3.1 Vorkommen und Bedeutung von β -Myrcen in der Natur

β -Myrcen kommt in der Natur als Bestandteil vieler pflanzlicher Öle ubiquitär vor. Einer der Hauptlieferanten aus dem Lebensmittelbereich ist mit 63 % das etherische Öl des Hopfens (Ohloff *et al.*, 1994). Hohe Gehalte an β -Myrcen weisen jedoch auch etherische Öle der Sitka-Fichte *Sitka spruce* mit 95 % (Hayward *et al.*, 2001) sowie mehrere Curcuma-Arten mit ca. 80 % (Wong *et al.*, 1999; Singh G. *et al.*, 2002) auf.

Das Monoterpen wird in der Natur durch Kopf-Schwanz-Kondensation von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) biosynthetisiert. Die Biosynthese kann auf zwei Wegen erfolgen, dem Mevalonat-abhängigen (Abb. 3.1) sowie einem Mevalonat-unabhängigem Weg über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat **57** (Abb. 3.2). Der Mevalonat-Weg geht von der Kondensation dreier Acetyl-CoA-Moleküle **47** aus. Dabei entsteht zunächst das Acetoacetyl-CoA **48**, welches unter Addition eines dritten Acetyl-CoA und Hydrolyse der Thioester-Bindung zum β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA **49** (HMG-CoA) weiterreagiert. Hydrolyse der Thioester-Bindung und Reduktion liefert anschließend das Mevalonat **50**. In weiteren Schritten erfolgt dreifache Phosphorylierung zum 3-Phospho-5-pyrophosphomevalonat **52**, welches nach Decarboxylierung die beiden Vorstufen IPP **53** und DMAPP **54** liefert (Abb. 3.1).

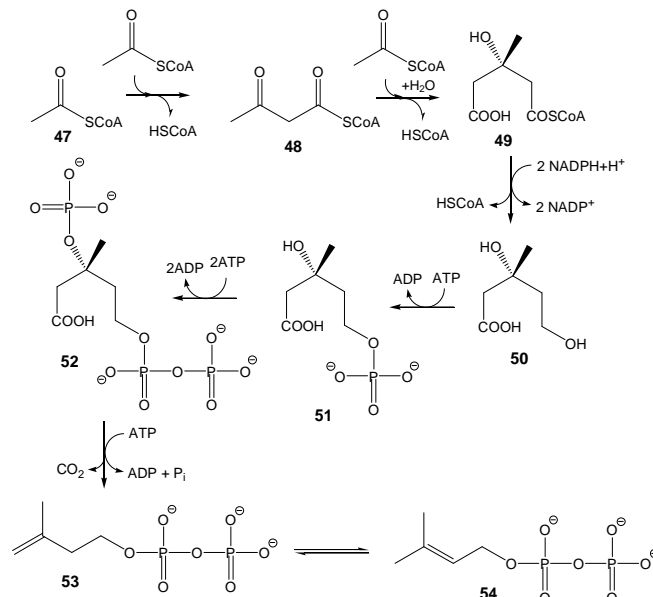


Abbildung 3.1: Mevalonat-abhängige Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat **53** (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat **54** (DMAPP) aus Acetyl-CoA **47** über Acetoacetyl-CoA **48**, β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) **49**, Mevalonsäure **50**, 5-Phosphomevalonat **51**, 3-Phospho-5-pyrophosphomevalonat **52** (Eisenreich *et al.*, 2004)

Der Desoxyxylulose-Weg wurde kürzlich in Pflanzen und bestimmten Eubakterieren entdeckt und kann entweder als alleiniger Weg oder neben dem in Abb. 3.1 dargestellten Mevalonat-Weg vorkommen.

Darin liefert die Addition von Pyruvat **55** an D-Glyceraldehyd-3-phosphat **56** das 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat **57**, welches einer Umlagerung und einer Reduktion zum 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat **58** unterliegt (Abb. 3.2). Die resultierende Verbindung **58** konvertiert anschließend in drei Stufen über 4-Diphosphocytidyl-Derivate **59** und **60** zum cyclischen Diphosphat **61**, welches in zwei Stufen über 1-Hydroxy-2-methyl-2-E-butenyl-4-diphosphat **62** zu IPP **53** und DMAPP **54** reduziert wird (Abb. 3.2).

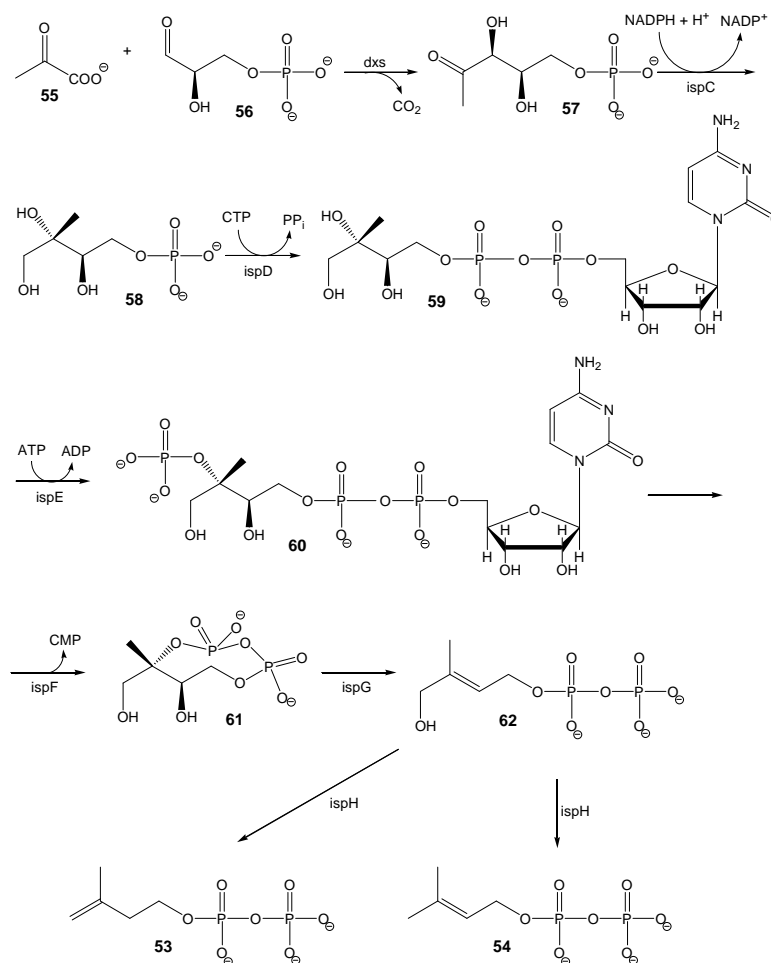


Abbildung 3.2: Desoxyxylulose-Weg der Biosynthese von IPP **53** und DMAPP **54** aus Pyruvat **55** und D-Glyceraldehyd-3-phosphat **56** über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat **57**, 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat **58**, 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol **59**, 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2-phosphat **60**, 2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat **61** und 1-Hydroxy-2-methylbutenyl-4-diphosphat **62** (Eisenreich *et al.*, 2004)

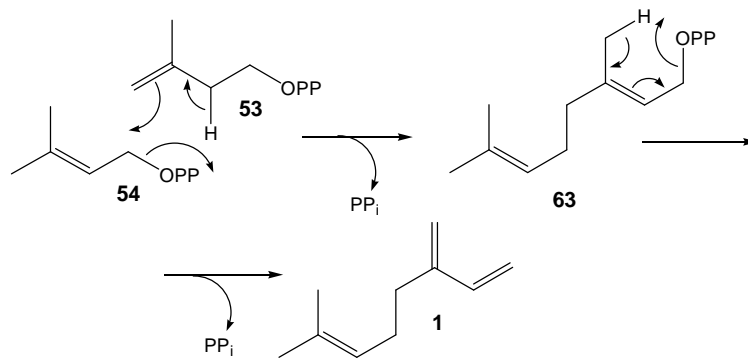


Abbildung 3.3: Mechanismus der β -Myrcen-Bildung aus IPP **53** und DAMPP **54** über Geranylpyrophosphat **63**; **1**: β -Myrcen (Seybold *et al.*, 2003)

Eine C-C-Verknüpfung von IPP **53** und DAMPP **54** ergibt anschließend Geranylpyrophosphat **63**, das nach Eliminierung des Pyrophosphats β -Myrcen **1** liefert (Abb. 3.3).

3.2 Biotransformationen und Biokonversionen von Terpenkohlenwasserstoffen

Biotransformationen sind mikrobielle Stoffumwandlungen, bei denen es sich um einzelne biochemische Schritte handelt. Beispiele hierfür sind die Einführung einer Hydroxylgruppe, eine Umlagerung, die Einführung einer Doppelbindung oder die Abspaltung einer Seitenkette. Eine Biokonversion wird dagegen als eine mehrstufige Umsetzung definiert und stellt demgegenüber eine Sequenz mehrerer aufeinander folgender Biotransformationsschritte dar (Berger, 1995). Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Biotransformationen handelt es sich um biokatalytische Oxyfunktionalisierungen des β -Myrcens wie z.B. die Hydroxylierung zum Ipsdienol. Solche Stoffumwandlungen zeichnen sich gewöhnlich durch hohe Regio- und/oder Stereoselektivität aus. Eine Grundlage hierfür stellen Enzymsysteme dar, die durch verschiedene Mikroorganismen bereitgestellt werden. Bei der Auswahl von Biokatalysatoren können somit neben aktiven Zellen auch reine Enzyme oder avitale Zellsysteme zum Einsatz kommen. Vitale Zellen besitzen jedoch den Vorteil mit einfachen Nährmedien kultiviert zu werden, während Enzyme und avitale Zellen oft bestimmte (Co-)Substrate benötigen. Der Nachteil aktiver Zellen ist jedoch die Komplexität des Systems und manchmal auch weitergehende Metabolisierung der erwünschten Produkte (van der Werf *et al.*, 1999).

Substrate für Biotransformationen stammen aus kostengünstigen, leicht verfügbaren Rohstoffquellen. Bei der Verarbeitung von Citrus-Früchten werden beispielsweise Monoterpenkohlenwasserstoffe und darunter auch β -Myrcen aufgrund ihres unerwünschten Aromawertes aus etherischen Ölen entfernt. Das β -Myrcen fällt weltweit als Abfallstoff in Mengen von 300 bis 600 t pro Jahr an (Feger *et al.*, 2003). Es stellt deshalb ein kostengünstiges Startmaterial für biotechnologische Umsetzungen dar. In den meisten etherischen Ölen treten Terpenkohlenwasserstoffe als Hauptbestandteile auf und stehen in größeren Mengen für biotechnologische Ansätze zur Verfügung. Eine besondere wirtschaftliche Bedeutung haben Biokonversionen bereits bei der Erzeugung von Steroiden erlangt. Hier ist insbesondere die Produktion von Cortison-Präparaten mit antiarthritischer und entzündungshemmender Wirkung sowie von Östrogenen, Diuretica und Anabolika zu nennen (Dellweg, 1987). Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen werden auch zur Aromenherstellung genutzt. Sie bieten die Möglichkeit zur Oxyfunktionalisierung dieser Verbindungen an und führen dann zu einer sensorischen Bioaktivität dieser Moleküle. Für diese Aromaaktivität ist neben einem hohen Dampfdruck vor allem das Vorhandensein einer hydrophoben und einer hydrophilen Molekülregion erforderlich. Da Biokonversionen oft zu Produkten mit solchen strukturellen Voraussetzungen und daraus resultierenden sensorischen Eigenschaften führen, werden sie zur Aromenherstellung gerne genutzt. Die Isolierung einzelner Aromastoffe ausschließlich durch Extraktion von Pflanzenteilen sowie Chemosynthesen, aus denen lediglich naturidentische Aromastoffe resultieren, führen zu

hohen Kosten. Durch die Möglichkeit einer hohen Regio- und Stereospezifität von Biokonversionen kann eine hohe Produktreinheit mit wenigen Nebenprodukten erreicht werden. Mehrstufige Chemosynthesen können dadurch durch einstufige Biotransformationen ersetzt werden (Faber, 2004).

3.3 Vorkommen und Biogenese der β -Myrcenmetabolite

β -Myrcen kommt in vielen etherischen Ölen pflanzlicher Herkunft (Ohloff, 1994) vor, und unterliegt dort sowie in einigen Arthropoden oxyfunktionalisierenden Biokonversionen. Der Basidiomycet *Pleurotus ostreatus* wächst von Natur aus an Stümpfen und lebenden Stämmen verschiedener Laubhölzer und sogar, wenn auch selten, an Nadelholz. Der Pilz war deshalb dem β -Myrcen als einem der natürlichen Holzbestandteile durchgehend in der Vergangenheit exponiert. Im Laufe der Evolution konnte er deshalb ein metabolisierendes Potential entwickeln das β -Myrcen in funktionalisierte Spezies umzuwandeln. Je nach Position der Sauerstoffefführung im Molekül lassen sich Umsetzungen am konjugierten 1,3-Diensystem und am Prenylrest unterscheiden.



Pleurotus ostreatus

3.3.1 Oxyfunktionalisierungen am konjugierten Doppelbindungssystem des β -Myrcens

Unter den am leichtesten durchführbaren Biokonversionen an konjugierten Doppelbindungen sind Oxyfunktionalisierungen zu vicinalen Dihydrodiolen (Yamazaki *et al.* 1988). Eine mikrobielle Biokonversion von β -Myrcen durch *Aspergillus niger* ergibt beispielsweise die drei (1,2-, 3,10- und 6,7-) β -Myrcendihydrodiol (Yamazaki *et al.*, 1988). Biokonversionen zu vicinalen Dihydrodiolen des β -Myrcens sind auch bei Kaninchen (Ishida *et al.*, 1981) und bei der Larve *Spodoptera litura* (Miyasawa *et al.*, 2000) bekannt. In Rotalgen der Familie Rhizophyllidaceae und Plocamiaceae, die unter anderem reich an halogenierten Monoterpenen sind, wurden auch hydroxylierte Monoterpene nachgewiesen. Dichlormethanextrakte von *Chondrococcus hornemannii* enthielten neben 3,10- β -Myrcendihydrodiol auch α -Z-Acaridiol (Coll *et al.*, 1989), eine Zwischenstufe der Perillenbiogenese bei *Pleurotus ostreatus*. Die Biogenesewege der beiden Diol sind jedoch unbekannt. Vermutlich werden sie als pflanzliche Metabolite *de novo* aus Isopren-Einheiten biosynthetisiert. Die α -Acaridiale kommen ansonsten sehr selten in der Natur vor. Daneben entfalten die durch Oxidation resultierenden α -Acaridiale Pheromonwirkung bei verschiedenen Milbenarten. So wurde nachgewiesen, dass α -E-Acaridial die Aktivität eines Sex-Pheromons von *Rhizoglyphus robini* besitzt und zusammen mit dem Alarmpheromon Nerylformiat in der Opisthosomaldrüse gebildet und freigesetzt wird (Mizoguchi *et al.*, 2003). Es ist einzigartig, dass Alarm- und Sex-Pheromon in derselben Drüse gebildet und

freigesetzt werden. Das Alarmpheromon blockiert dabei die Wirkung des Sex-Pheromons in höherer Dosis.

α,α - und α,β -Acariolide sind ebenfalls seltene Naturstoffe. In den 70-er Jahren wurde das α,β -Isomer als mikrobielles Biokonversionsprodukt von Geraniol **64** durch *Pseudomonas incognita* entdeckt (Rama Devi *et al.*, 1977). Ähnliche Biokonversion wurde in den Blättern des griechischen Tabaks gefunden, indem die reduzierte Form des α,β -Acariolids 3-(4-Methylpentyl)-2-buten-4-olid **66** nachgewiesen wurde. Gestützt durch die Anwesenheit von Geraniol **64** und Geraniumsäure wurde eine Biokonversion zu dem 2(5H)-Furanon **66** aus Geraniol postuliert (Abb. 3.4). Die Umsetzung beinhaltet je einen Oxidationsschritt an C1 und C10 sowie eine selektive Reduktion der prenylischen Doppelbindung zwischen C6 und C7 (Abb. 3.4).

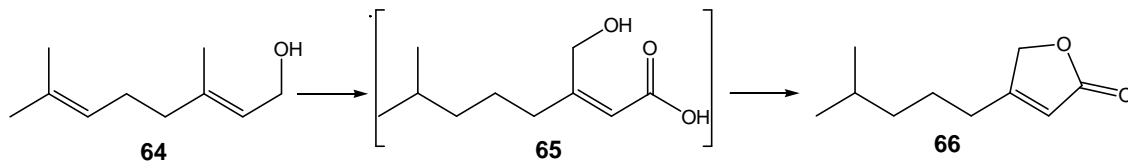


Abbildung 3.4: Postulierte Biogenese von Dihydro- α,β -Acariolid 3-(4-Methylpentyl)-2-buten-4-olid **66** aus Geraniol **64** über 6,7-Dihydro-10-hydroxygeraniumsäure **65** als Zwischenstufe in den Blättern des griechischen Tabaks (Pettersson *et al.*, 1993)

Kürzlich wurden beide Acariolide unter den Komponenten der Opisthosomaldrüsen verschiedener Milbenarten gefunden. So wurde in *Schwiebea araujoae* das α,α -Acariolid und in einer undefinierten Rhizoglyphus-Art das α,β -Acariolid nachgewiesen (Tarui *et al.*, 2002). Untersuchungen auf Bioaktivität zeigten jedoch innerhalb der beiden Milbenarten keine Wirkungen. Als Biogenese wird eine Canizzaro-Reaktion von α -Z-Acaridial **67** vermutet, welches ebenfalls unter den Komponenten der Opisthosomaldrüse nachgewiesen wurde (Abb. 3.5). Diese Hypothese kann durch die gleichzeitige Anwesenheit von Perillen **2**, das als Nebenprodukt ebenfalls in der Drüse entsteht, gestützt werden (Abb. 3.5).

Studien an verschiedenen Basidiomyceten ergaben eine enorme Vielfalt an geruchsaktiven β -Myrcenmetaboliten. Neben einer Perillenbildung wurden Hydratisierungen und/oder Isomerisierungen beobachtet. Unter den Produkten, die durch Biokonversionen am konjugierten 1,3-Diensystem entstehen, wurden Nerol **70**, Linalool **37** und 7-Methyl-3-methylen-6-octen-1-ol **71** nachgewiesen (Busmann und Berger, 1994). Für Oxyfunktionalisierungen sind besonders *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus flabellatus* und *Pleurotus sajorcaju* geeignet. Die Strukturformeln sind der Abb. 3.6 zu entnehmen. Biokonversionen am Prenylrest treten häufiger auf und werden in Kapitel 3.3.2 gesondert behandelt.

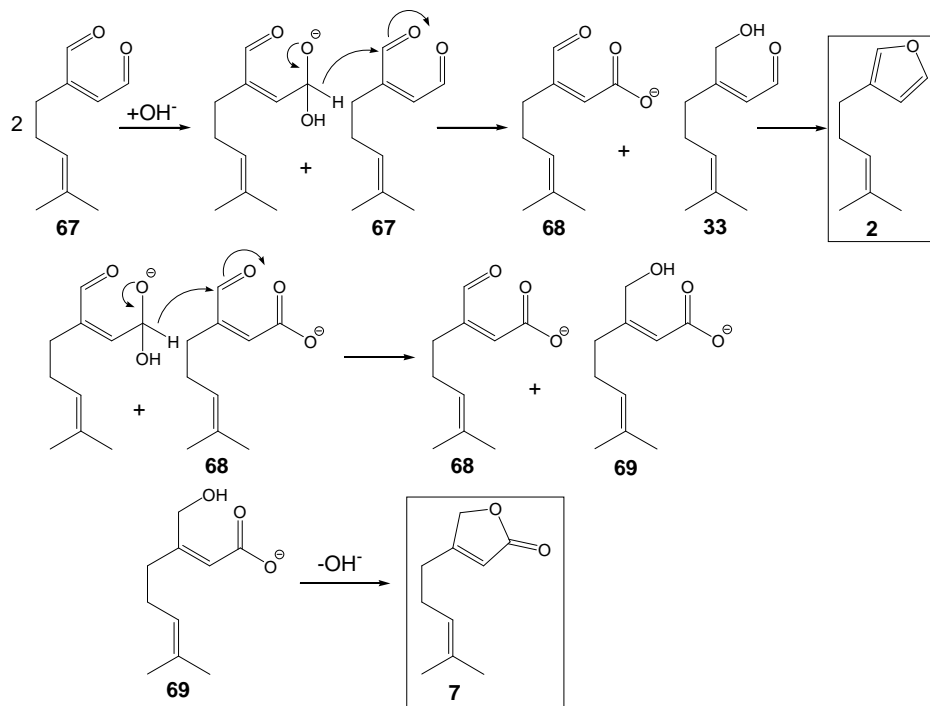


Abbildung 3.5: Postulierter Mechanismus der Reaktionswege von α -Z-Acaridial **67** zum α,β -Acariolid **7** durch eine Cannizzaro-Reaktion; **68**: 10-Oxogeraniumsäure, **33**: 10-Hydroxygeranial, **69**: 10-Hydroxygeraniumsäure (Tarui *et al.*, 2002)

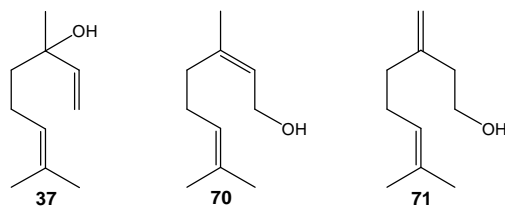


Abbildung 3.6: Biokonversionsprodukte von β -Myrcen bei verschiedenen Basidiomyceten (Oxyfunktionalisierungen am konjugierten Doppelbindungssystem); **37**: Linalool, **70**: Nerol, **71**: 7-Methyl-3-methylen-6-octen-1-ol (Busmann und Berger, 1995)

3.3.2 Oxyfunktionalisierungen des β -Myrcens am Prenylrest

Die meist untersuchte Biokonversion des β -Myrcens am Prenylrest ist die Oxyfunktionalisierung an C5 zum Ipsdienol **15** mit nachfolgender Dehydrogenierung zum Ipsdienon **16** (Abb. 2.39).

Besonders Borkenkäfer der *Dendroctonus*- und *Ips*-Arten sind zu derartigen Hydroxylierungen fähig (Seybold *et al.*, 2003). Eingehende Studien mit deuteromarkiertem β -Myrcen als Substrat zeigten eine Biokonversion zum Ipsdienol mit nachfolgender Dehydrogenierung zum Ipsdienon durch *Ips paraconfusus* auf (Fish *et al.*, 1979). Zahlreiche biochemische Studien zeigten ferner, dass Vertreter der Familie Scolytidae auch zur *de novo* Synthese von Ipsdienol fähig sind (Seybold *et al.*, 2003). Die Synthese erfolgt aus Acetyl-CoA über Mevalonat zum β -Myrcen und anschließend durch eine Biokonversion des β -Myrcens zum Ipsdienol.

Unter den Konversionsprodukten von β -Myrcen bei verschiedenen Basidiomyceten finden sich zahlreiche Verbindungen, die infolge vielfältiger Umsetzungen am Prenylrest entstehen. Unter den untersuchten Stämmen erwiesen sich *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus flabellatus* und *Pleurotus sajorcaju* für Oxyfunktionalisierungen am geeignetsten (Busmann und Berger, 1994). In der Abb. 3.7 sind einige Metabolite aufgeführt.

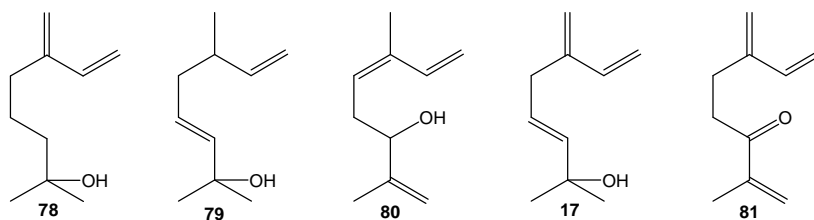


Abbildung 3.7: Oxyfunktionalisierungen von β -Myrcen am Prenylrest bei verschiedenen Basidiomyceten (Ausschnitt aus Busmann und Berger, 1994); **78:** Myrcenol, **79:** 2,6-Dimethylocta-3,7-dien-2-ol, **80:** 2,6-Dimethylocta-1,5,7-trien-3-ol, **17:** 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol, **81:** 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-on

Das Ziel dieser Arbeiten war die Identifizierung von Duft- und Aromastoffen, die aus β -Myrcen biotechnologisch hergestellt werden können. So wurden den Verbindungen **78** und **17** blumige Noten zugeschrieben, während **80** mit den Attributen „blumig, würzig“ charakterisiert wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol **17** neben 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-ol **18** als Biokonversionsprodukt von β -Myrcen nachgewiesen. Als Biogenese-Zwischenstufen der beiden Verbindungen werden allylische Carbokationen vorgeschlagen, die durch nachfolgende Hydratisierung die beiden Metabolite **17** und **18** ergeben (Abb. 3.8; Busmann und Berger, 1994).

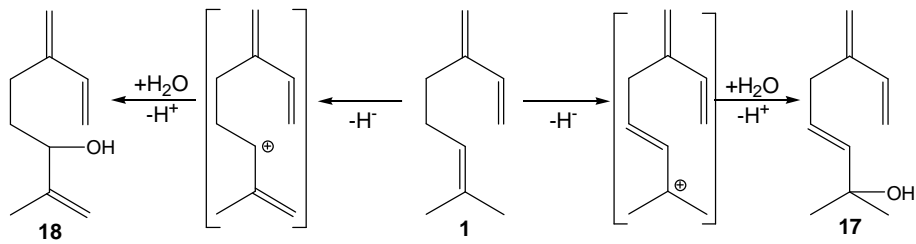


Abbildung 3.8: Vorgeschlagener Mechanismus der Konversion von β -Myrcen zu den Alkoholen 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol **17** und 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-ol **18** (Busmann und Berger, 1994)

Möglich ist auch eine Reaktion mit Singulett-Sauerstoff oder eine Dioxygenase-Reaktion zu den Hydroperoxiden **82** und **83**. In Gegenwart katalytischer Mengen an Schwermetallionen können diese zu den Alkoholen **17** und **18** zersetzt werden (Abb. 3.9; Baeckström *et al.*,

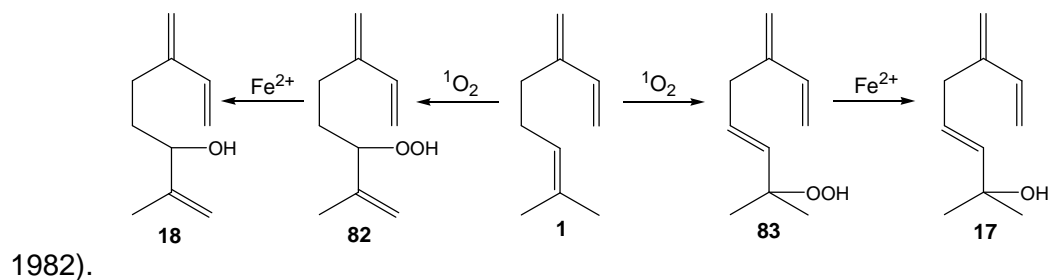


Abbildung 3.9: Postulierter Mechanismus der Biokonversion von β -Myrcen zu den Alkoholen 2-Methyl-6-methylenocta-3,7-dien-2-ol **17** und 2-Methyl-6-methylenocta-1,7-dien-3-ol **18** als direkte Oxidation über Hydroperoxide als Zwischenstufen (Baeckström *et al.*, 1982).

3.3.3 Perillenbiogenese

Die erste Isolierung von Perillen erfolgte 1919 durch Kondo und Yamaguchi aus dem etherischen Öl der Blätter von *Perilla citriodora* (Kondo und Yamaguchi, 1919). Der bedeutendste Organismus bezüglich hoher Perillengehalte ist *Perilla frutescens*, eine ostasiatische Pflanze der Familie Lamiaceae.

Es ist eine Heil- und Gewürzpflanze, deren etherisches Öl neben pharmakologisch wirksamen Isoprenoiden beträchtlichen Anteil an essentiellen ω -3-Fettsäuren enthält. Mehrere Sorten wurden in Japan zu fünf Chemotypen entsprechend der Hauptkomponenten des jeweiligen etherischen Öls klassifiziert. So werden Perillaldehyd-, Perillaketon-, Elsholtziaketon-, Citral-, Phenylpropanoid- und Perillen-Typen unterschieden (Yuba *et al.*, 1995).

Auf der Basis dieser Chemotypen wurde ein Mechanismus der Biosynthese von Perillen und anderer furanoiden Monoterpene postuliert (Yuba *et al.*, 1995). Das entsprechende Biokonversionsmuster ist der Abb. 3.10 zu entnehmen. Die Cyclisierung zu je einer Furanspezies erfolgt demnach am Geranial



21a oder Neral **21b**, wobei im ersten Fall Perillen **2** und im zweiten Fall das Oxorosenfuran Naginataketon **73** entsteht. Das Naginataketon **73** wird anschließend zum Elsholtziaketon **74** hydrogeniert. Das Perillen wird gegebenenfalls zum Egomaketon **75** oxidiert, das anschließend zum Isoegomaketon **76** isomerisiert oder zum Perillaketon **77** hydrogeniert wird. Es wurden Gene postuliert, die bestimmte Schritte durch Aktivierung und/oder Inhibierung kontrollieren (Abb. 3.10). Im perillenreichen Chemotyp ist das für die Oxofunktionalisierung in Position 6 verantwortliche Gen J homozygot rezessiv, so dass die Voraussetzung für eine anderweitige Metabolisierung des Perillens fehlt. Entsprechend den Ergebnissen bei der Kreuzung zwischen dem Perillaketon- und dem Perillen-Typ erfolgt die Cyclisierung von Geranial zum Perillen durch Kontrolle von zwei polymeren Genen, die mit Fr_1 und Fr_2 bezeichnet werden (Honda *et al.*, 1994, Abb. 3.10). Die Cyclisierung des Nerals zum Naginataketon bzw. Elsholtziaketon wird durch das Gen N kontrolliert, das homozygot rezessiv oder dominant sein kann. Im Fall des rezessiven Gens ist der Weg zum Naginataketon blockiert und die Cyclisierung des Geranials zum Perillen ist bevorzugt.

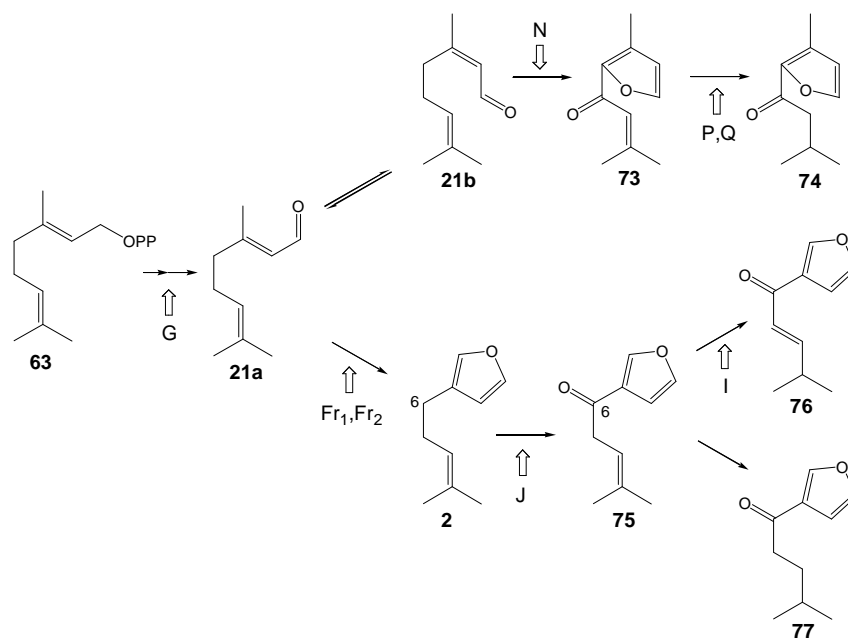


Abbildung 3.10: Hypothetische Biosynthese-Wege furanoider Monoterpene für Bestandteile des etherischen Öls von *Perilla frutescens*; inhibierende Gene: I; aktivierende Gene: G, Fr₁/Fr₂, J, N, P/Q (Yuba *et al.*, 1996)

Eine weitere bedeutende Perillenquelle stellt das etherische Öl der Pflanze *Elsholtzia polystachya* aus der Familie Labiatae dar. Weit verbreitet ist die Pflanze in Himalaya und gedeiht besonders gut um das Gebiet Nainital und in der Region zwischen Kashmir und Sikkim (Mathela *et al.*, 1991). Der Perillengehalt des etherischen Öls hängt dabei von der geographischen Lage der wachsenden Pflanze ab. So beträgt der Perillengehalt des etherischen Öls von *Elsholtzia polystachya* aus Khati 61,2 %, während das etherische Öl aus dem Gebiet um Nainital nur einen Perillengehalt von 0,4 % aufweist.

Das etherische Öl einer anderen eng verwandten Pflanzenart, *Elsholtzia stauntonii*, enthält wiederum Perillen nur in einer Konzentration von 0,3 %, jedoch zählen die geruchsaktiven Bestandteile Rosenfuran mit 41,7 % und Rosenfuranepoxid mit 40,4 % zu den Hauptkomponenten (Tucker *et al.*, 1995).

Wegen höherer Konzentration an Perillen verdient die Pflanze *Brugmansia × Candida* aus der Familie Solanaceae, bekannt unter dem Handelsnamen „die Engelstropfete“, besondere Beachtung. Es ist ein Hybrid zwischen *Brugmansia aurea* und *Brugmansia versicolor* und steht wegen enthaltener Tropan-Alkaloide unter Verdacht, bei inhalativer Exposition Intoxikationen beim Menschen hervorzurufen. Headspace-Untersuchungen emittierter flüchtiger Verbindungen der grünen Blätter ergaben einen Perillengehalt von bis zu 25 %, doch unter den Blütenbestandteilen wurde kein Perillen nachgewiesen (Kite *et al.*, 1995).

Perillen wurde in Spuren ferner in den Blättern des Birnbaums der Sorten Bartlett und Bradford (Miller *et al.*, 1989), im Fruchtfleisch der Grapefruit *Citrus paradisi*, nicht aber der Pampelmuse *Citrus grandis* (Njoroge *et al.*, 2005), sowie in den etherischen Ölen der Pflanzen *Sideritis germanicopolitana* (Kirimer *et al.*, 1992), *Sideritis athoa* (Özek *et al.*, 1993), *Cleistocalyx operculatus* (Dung *et al.*, 1994) und *Lomatium torreyi* (Bedrossian *et al.*, 1998) nachgewiesen. Obwohl das Perillen im Pflanzenreich weit verbreitet ist, wurde die zugrunde liegende Biogenese bislang nicht endgültig aufgeklärt.

Perillen kommt auch in tierischen Organismen vor. 1967 wurde es zum ersten Mal aus dem Sekret der Mandibulardrüsen der Ameise *Dendrolasius fuliginosus* isoliert (Bernardi *et al.*, 1967). Spätere Entdeckungen erfolgten bei der Ameise *Tetramorium angulinode* (Longhurst *et al.*, 1979) sowie der Milbenart *Acarus siro* L. (Curtis *et al.*, 1981). Als Bestandteil des Opisthosomaldrüsenextraktes der Milbenart *Tyrophagus neiswanderi* kann das Perillen neben Rosenfuran diagnostischen Zwecken dienen und zur Identifizierung einzelner Tyrophagus-Arten, deren Pheromonextrakte je ein charakteristisches GC-Profil aufweist, herangezogen werden (Leal *et al.*, 1989). Unter den Tyrophagus-Spezies *T. neiswanderi*, *T. putrescentiae*, *T. perniciosus* und *T. similis*, ist nur *T. neiswanderi* rosenfuran- und perillenhaltig (Leal *et al.*, 1989). Entsprechende Untersuchungen wurden in den 80-er Jahren in Japan im Hinblick auf die Bekämpfung der in der Landwirtschaft aufgetretenen Milbenplage durchgeführt. Perillen fungiert dort und bei anderen Arthropoden als Pheromon. Bei der Mehlmilbe *Acarus siro* wirkt es beispielsweise als Alarmpheromon. Im Sekret von *Leeuwenia pasanii* eines unter dem Namen „Fransenflügler“ bekannten Insekts wurde ebenfalls Perillen als Alarmpheromon identifiziert (Suzuki *et al.*, 1986). Der Gehalt an Perillen ist dort mit 17,7 % relativ hoch. Die höhere Konzentration ist jedoch verständlich, da Alarmpheromone aufgrund ihrer biologischen Funktion ständig in größerer Menge vorrätig und gezielt bei Bedarf freigesetzt werden müssen.

3.3.4 Sonstige Biokonversionen

Zahlreiche andere Biokonversionen von β -Myrcen ergeben bei verschiedenen Basidiomyceten cyclische und bicyclische Monoterpene. Unter den Metaboliten von *Pleurotus ostreatus* konnten jedoch diese nicht identifiziert werden. Die Abb. 3.11 zeigt einige Produkte, die in Gegenwart von *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus flabellatus* und *Pleurotus sajorcaju* entstehen.

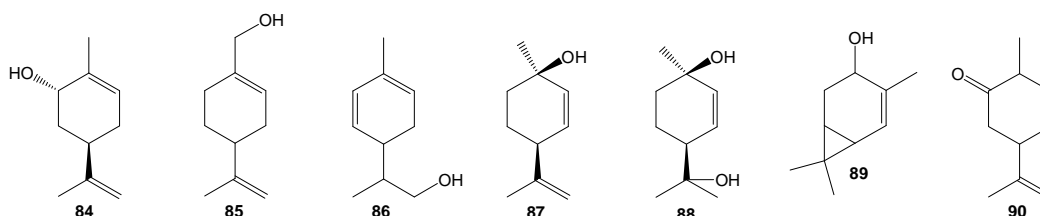


Abbildung 3.11: Biokonversionsprodukte von β -Myrcen durch Cyclisierungsreaktionen bei verschiedenen Basidiomyceten (Ausschnitt aus Busmann und Berger, 1994); **84:** E-Carveol, **85:** Perillaalkohol, **86:** p-Mentha-1,5-dien-8-ol, **87:** Z-p-Mentha-2,8-dien-1-ol, **88:** Z-p-Mentha-2-en-1,8-diol, **89:** trans-Carenol, **90:** Dihydrocarvon

Geruchsaktiv sind unter ihnen vor allem E-Carveol (minzig, fruchtig), Perillaalkohol (grün) und Dihydrocarvon (minzig, frisch). Als Biogenese wurde eine Cyclisierung des Carbocations mit Ladung am terminalen C-Atom des Prenylrestes zum p-Menthadien-Gerüst vorgeschlagen (Busmann und Berger, 1994). Verschiedene Allylumlagerungen mit anschließenden Hydratisierungen führen zu der in Abb. 3.12 dargestellten Vielfalt an cyclischen Monoterpen-Alkoholen.

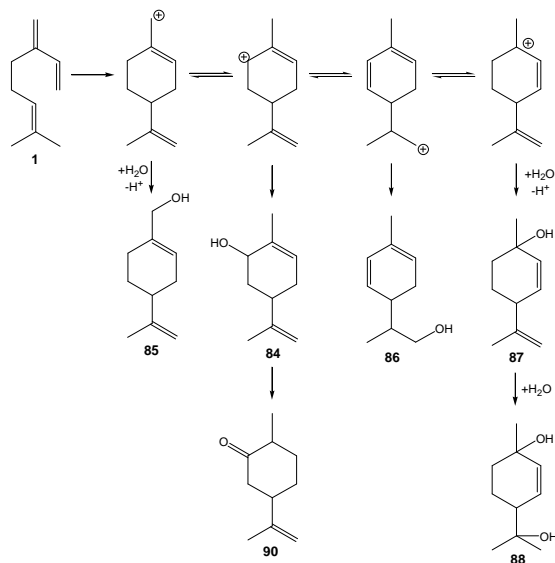


Abbildung 3.12: Postulierter Mechanismus der Biokonversion von β -Myrcen zu cyclischen Metaboliten bei verschiedenen Basidiomyceten über Carbocationen als Zwischenstufen (verändert nach Busmann und Berger, 1994)

3.4 Mechanismus der Terpenmetabolisierung

Monoterpene weisen als lipophile Substanzen toxische Eigenschaften auf. Diese beruhen auf bevorzugter Einlagerung in die Zellmembran und der daraus resultierenden Schädigung der Zellstrukturen bzw. der Zellfunktionen. Die Lipophilie lässt sich durch einen Verteilungskoeffizienten $\text{LogP}_{O/W}$ beschreiben. Je höher dieser Wert ist, um so stärker lagert sich die Substanz in die Membran ein und wirkt dabei cytotoxisch. Lebende Organismen verfügen jedoch über Detoxifizierungssysteme, die dazu fähig sind durch Oxyfunktionalisierung und/oder Glycosylierung (z.B. bei Tieren) den LogP-Wert zu senken und die Fremdstoffe als hydrophilere Verbindungen auszuscheiden und/oder sie als C-Quelle für β -Oxidationen verfügbar zu machen (van den Werf *et al.*, 1999).

Die überragende Überlebensfähigkeit der Basidiomyceten ist an die schnelle Anpassung ihres Metabolismus an unterschiedliche C- und N-Quellen gekoppelt. Ihre metabolische Flexibilität wird durch die enorme Vielzahl an verschiedenen Enzymen gewährleistet. An der Metabolisierung von Monoterpenen durch *Pleurotus ostreatus* können sowohl Exoenzyme als auch zelluläre Enzyme beteiligt sein. Exoenzyme sind bei Bakterien und niederen Eukaryonten weiter verbreitet als im pflanzlichen Sekundärmetabolismus, wo vielmehr zelluläre Enzyme eine größere Rolle spielen.

Es ist bekannt, dass Weißfäulepilze, zu denen auch *Pleurotus ostreatus* gehört, mehrere ligninolytische Isoenzyme wie Ligninperoxidasen, Laccasen und manganabhängige Peroxidasen exprimieren. Es sind Oxidoreduktasen, die Einelektron-Oxidationen katalysieren und eine wichtige Funktion im Ligninabbau erfüllen (Palmieri *et al.*, 2003). Damit tragen sie entscheidend zur Erschließung von Nahrungsquellen bei, die als Biopolymere nicht biologisch verfügbar wären. Die Enzyme vermögen ein sehr breites Substratspektrum zu oxidieren, so dass neben den Biopolymeren katalytische Aktivitäten an Monoterpenen wie β -Myrcen zu erwarten sind. Weitere fremdstoffmetabolisierende Oxidoreduktasen, die für die Metabolisierung von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus* relevant sein könnten und auch in Detoxifizierungssystemen höherer Organismen eine Rolle spielen, sind Monooxygenasen, Epoxidhydrolasen und Dehydrogenasen. Im Folgenden sollen diese Enzyme näher behandelt werden.

3.4.1 Laccasen

Laccasen sind kupferhaltige Enzyme, die Einelektron-Oxidationen von Substraten wie Polyphenolen, Diaminen, L-Ascorbinsäure, methoxysubstituierte Phenole und andere Verbindungen katalysieren. Phenolische Verbindungen werden direkt oxidiert, jedoch für Oxidationen an nicht phenolischen Spezies erfolgt ein Elektronentransfer über so genannte Radikalmediatoren (Abb. 3.13 **A**). Diese fungieren selbst als Substrate und werden zunächst in Radikale überführt, welche nicht enzymatisch weiterreagieren (Antorini, 2000). Es gibt Verbindungen, die im industriellen Ligninabbau als Mediatoren Verwendung finden. Am weitesten verbreitet sind 1-N-Hydroxy-benzotriazol (HOBT) **91**, Violursäure (Vio) **92** und N-Hydroxy-acetanilid **93** (Abb. 3.13 **B**). HOBT **91** wird von der Laccase beispielsweise zum Nitroxid-Radikal oxidiert und kann dadurch Substrate unspezifisch weiteroxidieren. Als elektronenreiche Spezies könnte auch das β -Myrcen als Mediator fungieren und als Radikal entweder vor oder nach Cyclisierung mit Wasser zu oxyfunktionalisierten Spezies oder mit anderen β -Myrcenmolekülen zu Di-, Oligo- und Polymeren weiterreagieren.

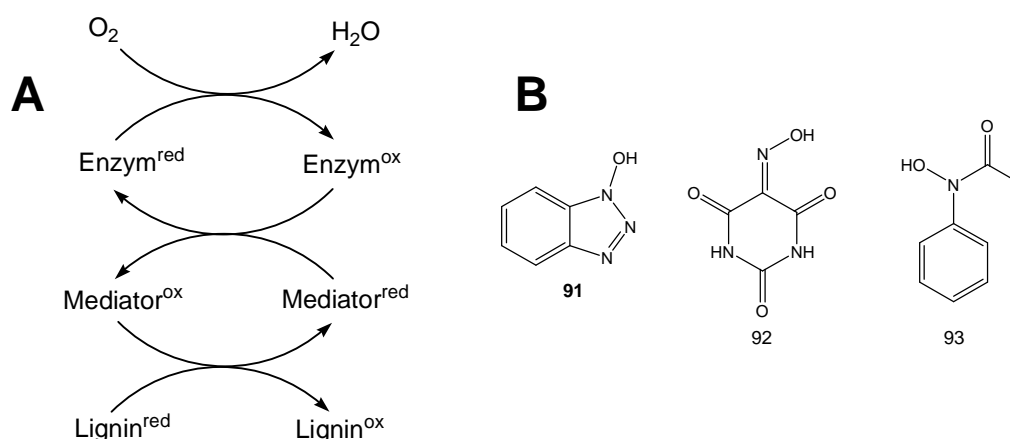


Abbildung 3.13: Reaktionsfolge einer Laccase-vermittelten Ligninoxidation **A** und Strukturformeln verschiedener Mediatoren **B** (Call *et al.*, 1997)

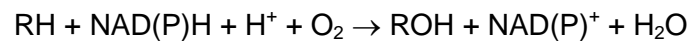
3.4.2 Peroxidasen

Peroxidasen gehören zur Gruppe von Oxidoreduktasen, die organische Hydroperoxide oder Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptoren nutzen und ähnlich wie Laccasen Phenole, andere Aromaten und Lipide über ein intermediäres Radikalkation oxidieren. Sowohl eisen- als auch manganabhängige Peroxidasen sind in Basidiomyceten weit verbreitet und treten besonders bei Stickstoffmangel auf (Iodophase). Eisen- bzw. Mangan-Kationen dienen dabei als Cofaktoren. Auch diese Enzyme spielen beim Ligninabbau der Weißfäulnispilze eine wichtige Rolle.

3.4.3 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)

Prinzipiell besteht die enzymatische Aktivität der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenase im Transfer eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff auf ein Akzeptormolekül. Das zweite Sauerstoffatom wird unter Verbrauch von NAD(P)H zu Wasser reduziert. Die katalysierte Umsetzung resultiert in einer Epoxidierung, Hydroxylierung, Desaturierung, Desalkylierung oder Heteroatom-Oxygenierung (Arand *et al.*, 2004).

Es werden von bis zu siebzig CYP-Genen in Basidiomyceten vermutet, die je nach Habitat aktiviert werden. CYP-Enzyme bilden somit eine große Superfamilie von strukturell verwandten Isoenzymen. Obwohl diese eine ganze Reihe von Reaktionen katalysieren, gibt es eine Reaktionsgleichung, die allen Biokonversionen gemeinsam ist:



Zur NAD(P)H-Regenerierung wird ein Elektronendonator-System benötigt. Dieses liegt in mitochondrialen und prokaryotischen Enzymen als Zwei-Protein-System (Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase) vor, während es in eukaryotischen Enzymen, die im endoplasmatischen Retikulum membranständig lokalisiert sind, als Einzelprotein (Cytochrom-P450-Reduktase) vorliegt. Da Basidiomyceten zu den Eukaryonten gehören, sind deren CYP-Enzyme in den meisten Fällen im ER lokalisiert (van den Brink *et al.*, 1998). Die CYP-katalysierte Monooxygenierung verläuft über mehrere Stufen. Im Grundzustand liegt die prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum als Hämin (Fe^{3+}) vor, das keine Tendenz zur Sauerstoffbindung aufweist. Es wird davon ausgegangen, dass durch Substratbindung ein Übergang des Hämin-Eisens von *low-spin*- in die *high-spin*-Konfiguration begünstigt wird. Die *high-spin*-Konfiguration bewirkt dann die Reduktion des Hämins (Fe^{3+}) zum Häm (Fe^{2+}) und der molekulare Sauerstoff lagert sich in Form eines $[\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2]$ -Komplexes an. Nach erneuter Reduktion resultiert der hochreaktive $[\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2]$ -Komplex, von dem nach zweifacher Protonierung und heterolytischer Spaltung der O-O-Bindung ein Wassermolekül abdissoziiert. Es bleibt ein Ferryl-Sauerstoff-Komplex $[\text{FeO}]^{3+}$ zurück, der ein hohes Sauerstofftransfer-Potential besitzt und das Substrat daraufhin oxygeniert (Arand *et al.*, 2004; Abb. 3.14).

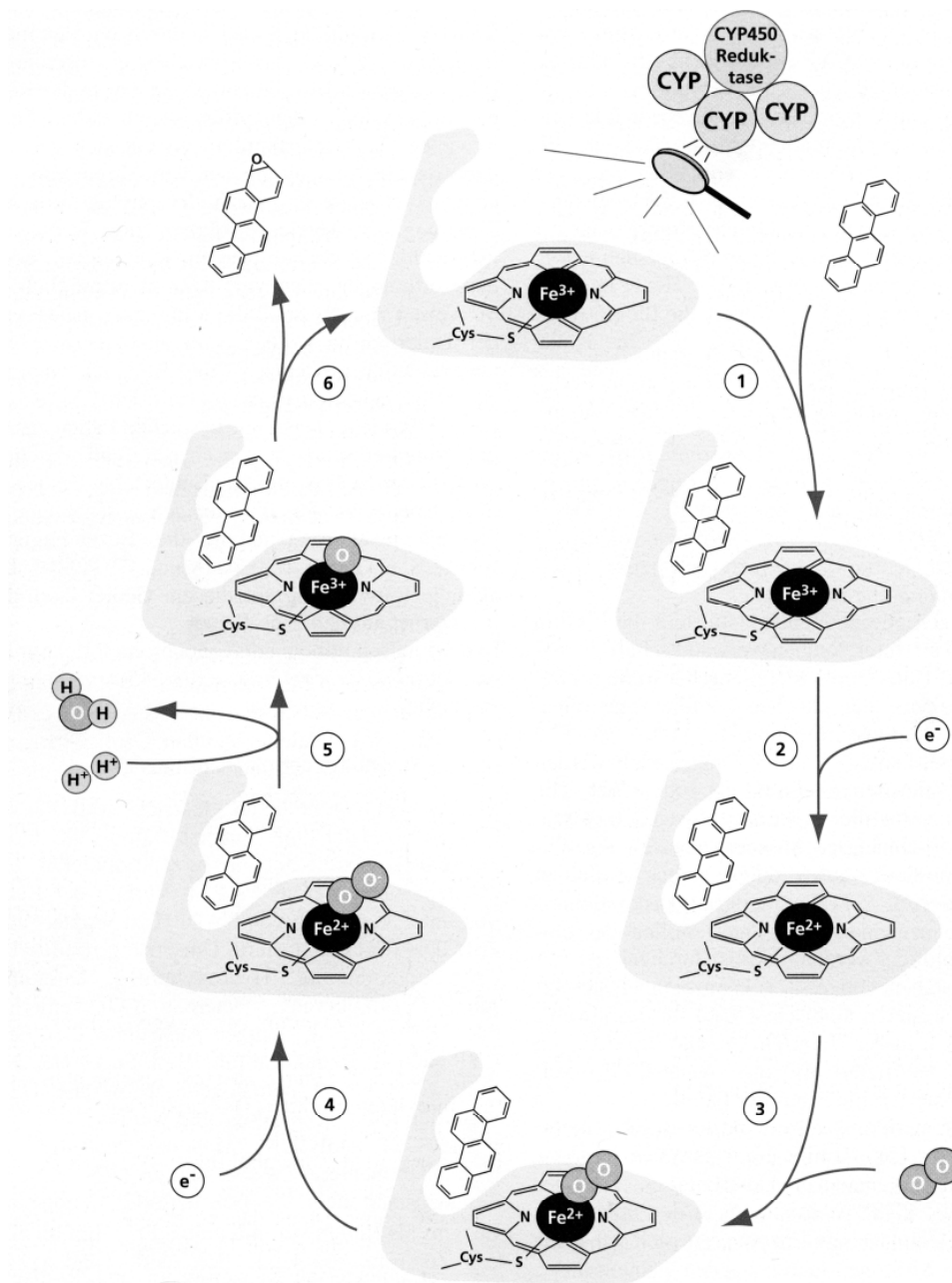


Abbildung 3.14: Cytochrom-P450-abhängige Oxidation am Beispiel von Chrysen; h Bindung des Substrat-Moleküls; i Reduktion des Hämins zum Häm durch Cytochrom-P450-abhängige Monoxygenase; j Bindung des O-Atoms an das Häm; k aktivierender Ein-Elektronen-Reduktionsschritt durch CYP-Reduktase oder Cytochrom b5; l Heterolytische O-O-Spaltung nach zweifacher Protonierung; m O-Atom-Transfer auf das Substrat-Molekül und Freisetzung des Produkts (Arand *et al.*, 2004)

Laut „International Committee on the Nomenclature of Cytochrome P450 Enzymes“ werden CYP-Enzyme in Abhängigkeit von Aminosäuresequenz-Homologie in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Der gleichen Familie werden CYP-Enzyme zugeordnet, wenn ihre Sequenzhomologie > 40 % beträgt. Oberhalb 55 % sind CYP-Enzyme gleicher Unterfamilie zuzuordnen. Trotz geringer Sequenzhomologie besitzen alle CYP-Enzyme charakteristische, konservierte Sequenzen. Diese betreffen die Substratbindungsregion und eine Häm-Bindungsregion am C-Terminus sowie eine N-terminale Region mit Sequenzen lipophiler Aminosäuren zur Verankerung des Enzyms in der Zellmembran des ER.

3.4.4 Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO)

Eine zweite Familie membranständiger Monooxygenasen sind die Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO). Aufgrund ihres enzymatischen Mechanismus weisen sie jedoch gegenüber CYP ein deutlich geringeres Sauerstoffübertragungspotential auf und sind deshalb auf eine gewisse basale Reaktivität ihrer Substrate angewiesen. Die Substrate können somit chemisch als weiche Nucleophile klassifiziert werden, die meistens Stickstoff oder Schwefel als Heteroatom tragen. Da β -Myrcen diese Anforderungen nicht erfüllt, scheint die Fähigkeit des FMO-Enzyms zu dessen Metabolisierung unwahrscheinlich zu sein.

3.4.5 Sonstige Cytochrom-P450-unabhängige Monooxygenasen

Es sind weitere Monooxygenasen bekannt, die weder Häm in noch Flavin als Cofaktoren enthalten und Sauerstoff in Substrate einführen. Eine Tetrahydropteridin-abhängige Hydroxylase aromatischer Aminosäuren sowie eine Kupfer-haltige Dopamin- β -hydroxylase gehören zu den am besten charakterisierten Systemen. Ein in *Pseudomonas oleovorans* gefundenes Enzym ist eine eisenhaltige, hämunabhängige Oxidase. Sie vermag die Epoxidierung terminaler Olefine, Hydroxylierung terminaler Methylgruppen linearer Kohlenwasserstoffe und O-Demethylierung aliphatischer Methylether zu katalysieren (Holland, 1992). Dieses könnte somit bei der Epoxidierung des β -Myrcens eine Rolle spielen.

3.4.6 Dehydrogenasen

Dehydrogenasen gehören zu Enzymen, die ihre Substrate durch formale Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen oxidieren. Als Elektronenakzeptoren dienen die Cofaktoren NAD(P)⁺ oder FAD. Das bekannteste Enzym dieser Familie ist die Alkoholdehydrogenase (ADH), welche bei der Detoxifizierung von Ethanol in Säugetieren eine entscheidende Rolle spielt. Das hepatische Enzym wandelt dabei Ethanol in Acetaldehyd um. Alkoholdehydrogenasen können jedoch auch Diole oxidieren (Faber, 2004), von denen einige bei der β -Myrcenmetabolisierung entstanden sind (2.1.2.1, 2.1.3).

3.4.7 Epoxidhydrolasen

Epoxide sind elektrophile Verbindungen, die unter Ringöffnung mit nucleophilen biologischen Makromolekülen reagieren können. Besonders betroffen sind DNA-Basen, deren Modifikationen zu Mutationen führen können. Epoxidhydrolyse stellt daher einen sehr wichtigen Detoxifizierungsschritt für lebende Organismen dar. Epoxidhydrolasen sind deshalb von besonderer toxikologischer Relevanz, da sie die Hydrolyse von Epoxiden im Fremdstoffmetabolismus katalysieren.

Im aktiven Zentrum enthält das Enzym gewöhnlich eine katalytische Triade bestehend aus zwei Tyrosinresten und einem Aspartat. Das Substrat bindet in einer hydrophoben Bindungstasche des Enzyms. Ein wesentlicher Teil des Erkennungsmechanismus besteht wahrscheinlich in der Ausbildung von H-Brücken zwischen dem Epoxidsauerstoff und den Hydroxylgruppen der beiden Tyrosinreste (Abb. 3.15). Nach der Substratbindung entsteht unter Ringöffnung ein Enzym-Substrat-Ester, wobei das Alkoholat-Anion protoniert wird. Diesem Schritt folgt ein durch Histidin katalysierte Hydrolyse des Esters, die ein vicinales Diol freisetzt und das Enzym regeneriert (Abb. 3.16; Arand *et al.*, 2004).

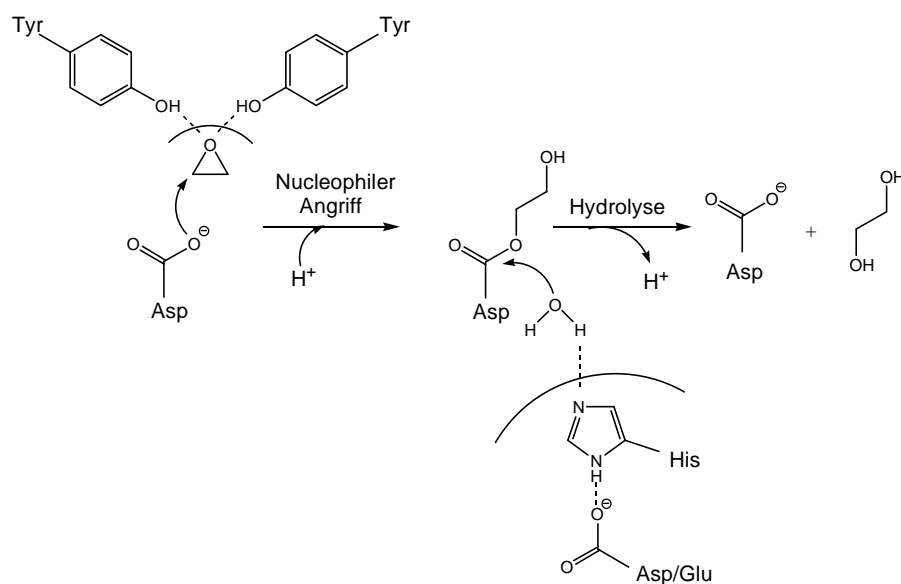


Abbildung 3.15: Katalyse-Mechanismus von Epoxidhydrolasen (Arand *et al.*, 2004); Tyr: Tyrosin; Asp: Aspartat

3.5 Metabolisierungsmechanismus von β -Myrcen durch *P.ostreatus*

3.5.1 Epoxidierung von β -Myrcen

Von den initialen Transformationsschritten an β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus* dominierten Epoxidierungen gegenüber allylischen Hydroxylierungen. Die sehr geringen Gesamtumsatzraten von 0,3 bis 0,5 % (gemessen über eine Transformationszeit von 5 Tagen) deuten auf langsame und damit geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritte hin. Da im chemischen Kontrollversuch im Gegensatz zu Kultivierungsversuchen weder Epoxide noch die vicinalen Diole nachgewiesen wurden, werden bei diesen Epoxidierungen enzymatische Reaktionsschritte angenommen. Die dafür bekannten Enzyme sind die bereits erwähnten Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen oder auch bestimmte zur Epoxidierung fähige Oxidasen (Holland, 1992). Formale Addition eines O-Atoms an Doppelbindungen kann jedoch auch durch andere Enzyme erfolgen. H_2O_2 -abhängige Peroxidasen können beispielsweise kurzkettige Carbonsäuren wie Essig- oder Propionsäure enzymatisch in entsprechende Peroxycarbonsäuren überführen, die dann Alkene unspezifisch epoxidieren können. Peroxycarbonsäuren können sogar in Gegenwart einer Lipase entstehen. Hier findet eine Perhydrolyse des Acyl-Lipase-Intermediates mit nucleophilem Wasserstoffperoxid statt (Abb. 3.16; Faber, 2004).

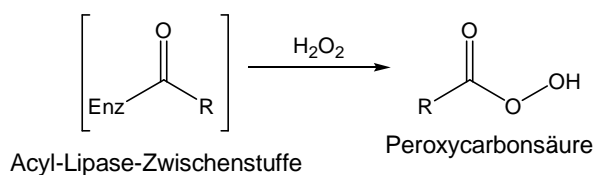


Abbildung 3.16: Bildung der Peroxycarbonsäure durch Perhydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates einer Lipase (Faber, 2004)

Das Konzentrationsverhältnis der drei β -Myrcendihydrodiolen mit 1 : 3,5 : 12,5 (6,7-Diol : 1,2-Diol : 3,10-Diol) zeigte, dass 3,10- β -Myrcendihydrodiol gegenüber seinen Isomeren bevorzugt angereichert wurde (Abb. 2.31, 2.34). Der gemessene Enantiomerenüberschuss (ee) zwischen 40 und 47 % innerhalb jeder Spezies (2.1.2.1) deutet zusätzlich auf die Bevorzugung einer bestimmten absoluten Konfiguration hin. Obwohl Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen als Bestandteile eines Detoxifizierungssystems mehr oder weniger breite Substratspezifitäten aufweisen, zeigen sie als Enzyme bei asymmetrischen Verbindungen auf der Seite der Produkte oder Edukte dennoch eine gewisse Bevorzugung einer absoluten Konfiguration. An den Epoxidierungen können somit Enzyme durchaus beteiligt sein. Die gleichzeitige Bildung von 1,2- und 6,7-Diolen sowie die geringen Enantiomerenüberschüsse können durch die gleichzeitige Aktivität mehrerer

Monoxygenasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten sowie nachfolgende chemische und/oder enzymatische Hydrolyse erklärt werden.

3.5.2 Hydrolyse der β -Myrcenepoxide zu β -Myrcendihydrodiolen

Die Hydrolyse des 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcens erfolgte im SNL-Kulturmedium in Gegenwart aktiver und inaktiver Zellen. Dabei unterschieden sich die jeweiligen GC-Profile nur geringfügig (Abb. 2.61, 2.62). Der Befund deutet hiermit auf eine enzymunabhängige Umsetzung hin, obwohl parallel eine stereoselektive Hydrolyse durch Epoxidhydrolasen nach Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der β -Myrcendihydrodiol-Beleg ist (2.4.1). Auch 6,7-Epoxy- β -myrcen führte zum vicinalen Diol, das jedoch im Laufe der Biokonversion im Gegensatz zu seinen Positionsisomeren vom Basidiomyceten weiter umgesetzt wurde. Die Umsetzung des 6,7- β -Myrcendihydrodiols könnte das konjugierte Doppelbindungssystem des Moleküls betreffen.

In Bezug auf die Gesamtbiogenese des Perillens stellen diese Diol-Bildungen Seitenreaktionswege dar. Als Nebenprodukte der chemischen Hydrolyse von 1,2- und 3,10-Epoxy- β -Myrcen entstanden auch α -Acaridiale (Abb. 2.38), von denen das Z-Isomer in Gegenwart des aktiven Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* zum Perillen cyclisierte (Abb. 2.73). Das Produktverhältnis der beiden α -Acaridiale sah in Abhängigkeit vom dosierten Epoxy-Derivat unterschiedlich aus. Aus dem 1,2-Epoxid **3** entstand fast ausschließlich das α -E-Acaridiol, während 3,10-Epoxid **4** beide E-/Z-Stereoisomere zu fast gleichen Anteilen lieferte (Abb. 2.60 bis 2.63). Untersuchungen an Geranial **21a** und Neral **21b** zeigten, dass im alkalischen Milieu in Gegenwart einer Aminosäure eine 1,4-Addition von Wasser an das konjugierte *enal*-System der beiden Aldehyde erfolgt (Abb. 3.19; Wolken *et al.*, 2000). Ähnlich der Ringöffnung des Vinylepoxids **3** bzw. **4** entsteht zunächst eine zwitterionische Resonanzstruktur der beiden Aldehyde **21a** und **21b**, die von der Aminosäure stabilisiert wird. Anschließende H₂O-Addition zum Hydroxyenol-Derivat **95**, das sich anschließend zum stabileren 3-Hydroxycitronellal umlagert, spaltet zu den Verbindungen 6-Methyl-6-hepten-2-on **98** und Acetaldehyd **97** (Abb. 3.19). Entscheidend bei dieser Konversion ist die Aminosäure katalysierte Addition von Wasser an das konjugierte Doppelbindungssystem des α,β -ungesättigten Aldehyds. Dieses weist eine Analogie zur Vinylepoxidstruktur der 1,2- und 3,10-Epoxy- β -myrcene auf (Abb. 3.17, 3.18) und kann als Hinweis auf eine ähnliche Katalyse bei der Ringöffnung des Epoxids interpretiert werden.

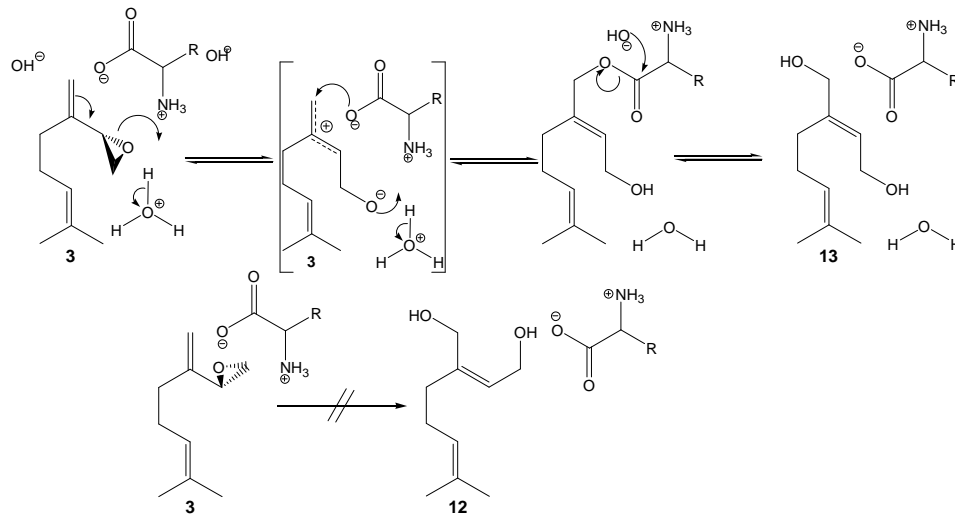


Abbildung 3.17: Postulierter Mechanismus der Hydrolyse von 1,2-Epoxy- β -myrcen **3** zum α -E-Acaridiol **13** in Gegenwart von Aminosäuren im SNL-Nährmedium; **12**: α -Z-Acaridiol; Analogie zu Wolken *et al.* (2000)

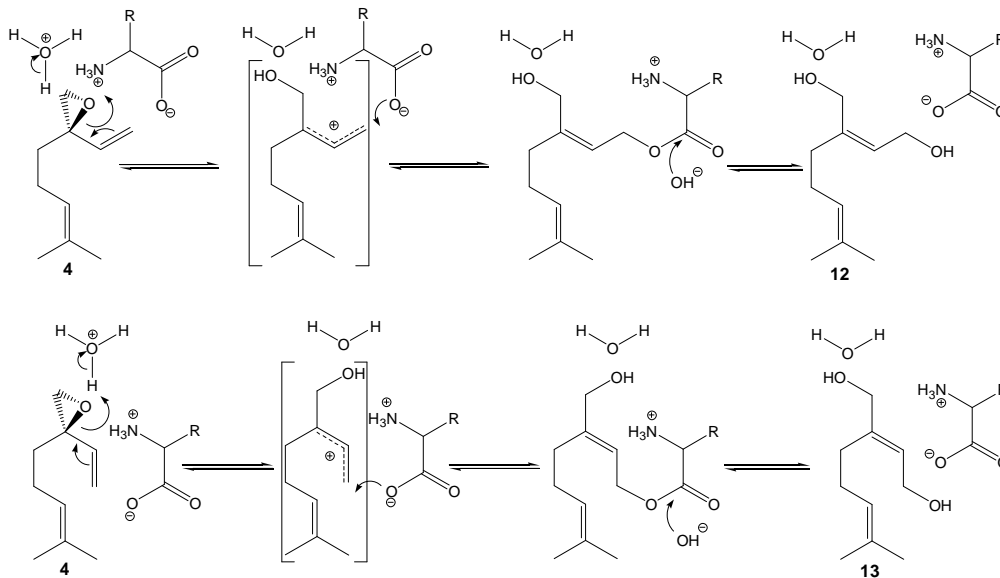


Abbildung 3.18: Postulierter Mechanismus der Hydrolyse von 3,10-Epoxy- β -myrcen **4** zu den α -Acaridiolen **12** und **13** in Gegenwart einer Aminosäure im SNL-Nährmedium; Analogie zu Wolken *et al.*, (2000)

Durch die Aminosäurekatalyse lässt sich jedoch die Bevorzugung einer E-Konfiguration bei der 1,4-Addition des Wassers an das 1,2-Epoxy- β -myrcen zum α -E-Acaridiol nicht erklären. Die höhere Umsatzrate bei der Hydrolyse des 3,10-Epoxy- β -myrcens **4** gegenüber seinem 1,2-Isomer **3** (2.4.1) lässt sich durch eine effektivere Stabilisierung des nach Ringöffnung resultierenden Carbokations erklären.

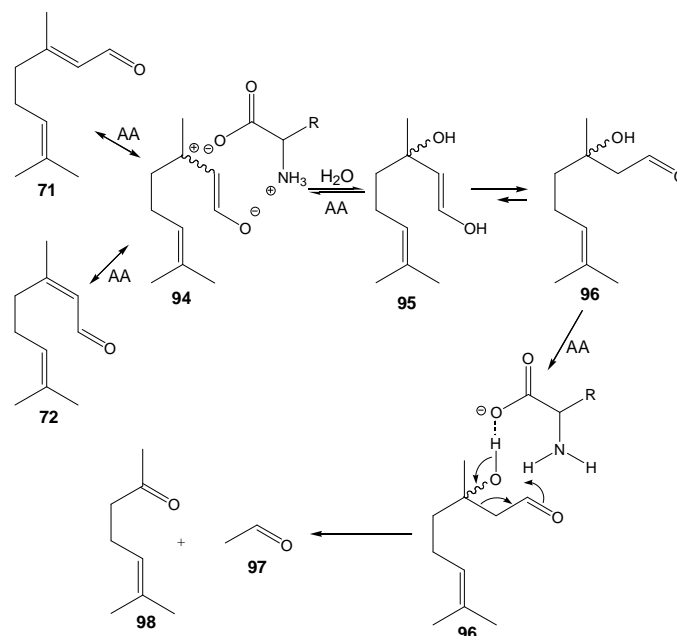


Abbildung 3.19: Postulierter Mechanismus der Isomerisierung von Geranial **71** und Neral **72** sowie deren Konversion zum 6-Methyl-5-hepten-2-on **98** und Acetaldehyd **97** über 3-Hydroxycitronellal **96** in Gegenwart einer Aminosäure als Katalysator (Wolken *et al.*, 2000)

Aus dem 3,10-Epoxid **4** entsteht ein tert. Carbokation, während das 1,2-Epoxid **3** ein sek. Carbokation ergibt. Durch den induktiven Effekt des zusätzlichen Alkenylrestes beim 3,10-Epoxid wird das tert. Carbokation zusätzlich stabilisiert. Die Ringöffnung ist damit schneller und die Hydrolyse weist eine höhere Umsatzrate auf.

3.5.3 Cyclisierung des α -Z-Acaridiols zu furanoiden Spezies

In Gegenwart von *Pleurotus ostreatus* führte die Cyclisierung des α -Z-Acaridiols zum Furanderivat Perillen sowie den Furanonen α,α - und α,β -Acariolid (Abb. 2.73).

Es wurde gezeigt, dass die Bildung der drei Spezies mit der Oxidation einer der beiden alkoholischen Hydroxylgruppen beginnt, wobei ein kurzlebiges 4-Hydroxy-2-butenal-Derivat **14** oder **33** entsteht. Dieses cyclisiert spontan über zwei Stufen zum Perillen. Das zwischenzeitlich gebildete halbacetalische Acarilactol **11** und **32** dehydratisiert dabei unter Aromatisierung. Die Cyclisierung des α -Z-Acaridiols zum Perillen kann auch chemisch durch eine Synthese realisiert werden. Die Behandlung des α -Z-Acaridiols mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) in Dichlormethan bei RT führt zur Perillenbildung mit Ausbeuten von bis zu 85 % (Nishiyama *et al.*, 1981). Als Mechanismus wird ebenfalls eine spontane Cyclisierung des kurzlebigen 4-Hydroxy-2-alkenals **14** oder **33** zum inneren Halbacetal mit anschließender Dehydratisierung zum Perillen vorgeschlagen. Die Dehydratisierung ist hier durch genügend saure Eigenschaften des Oxidationsmittels PCC begünstigt.

4-Hydroxy-2-alkenale treten in Lebensmitteln bei der Maillard-Reaktion oder Lipidperoxidationen oft als Zwischenstufen auf und unterliegen dort auch spontanen Cyclisierungen, die über 2,5-Dihydro-2-furanol-Strukturen (innere Halbacetale) zur Bildung von Furanderivaten führen (Belitz *et al.*, 2001; <http://www.hc-sc.gc.ca>). 4-Hydroxy-2-alkenale sind dabei cyto- und genotoxisch, da sie fähig sind Proteine, DNA und *low-density*-Lipoproteine (LDL) zu modifizieren (Perez Locas *et al.*, 2004). Diese werden jedoch in Lebensmitteln durch spontane Cyclisierungen zu Furan-Spezies detoxifiziert.

Ein zweiter, mit der Furanbildung des entsprechenden Halbacetals konkurrierender Oxidationsschritt ist die Dehydrierung des 2,5-Dihydro-2-furanol-Derivates zu einem 2(5H)-Furanon, entsprechend der Biokonversion von α,α -Acarilactol zum α,α -Acariolid. Solche Dehydrierungsschritte sind jedoch in Lebensmitteln nicht bekannt. Eine aus der Leber vom Pferd isolierte Alkoholdehydrogenase (ADH) ist jedoch dafür bekannt symmetrische *meso*-1,4-Diole **99** zweimal bis zum Lacton **102** zu dehydrieren, entsprechend dem in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Mechanismus der Acariolid-Bildung. Bei der isolierten ADH finden beide Oxidationsschritte ausschließlich an der Hydroxylgruppe der (S)- bzw. pro-(S)-konfigurierten Seite statt. Die Umsetzung ist daher enantiospezifisch (Abb. 3.20; Faber, 2004).

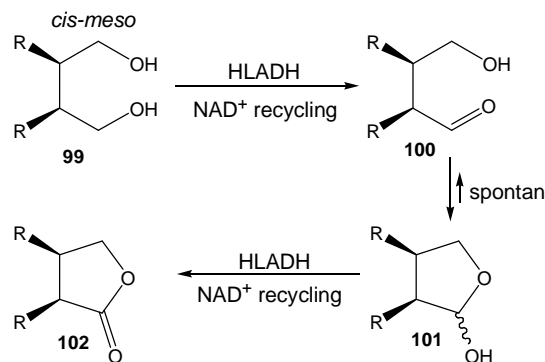


Abbildung 3.20: Desymmetrierung von *meso*-1,4-Diolen **99** in Gegenwart einer Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH: horse liver alcohol dehydrogenase) durch Cyclisierung zum γ -Butyrolacton **102** über 4-Hydroxyaldehyd **100** und γ -Butyrolactol **101** als Zwischenstufen (Faber, 2004)

Die Cyclisierung des sich intermediär bildenden 4-Hydroxyaldehyds **100** zum Lactol **101** erfolgt spontan. Eine anschließende Aromatisierung des Lactols zum Furan-Derivat findet aufgrund der fehlenden Doppelbindung im Ring nicht statt. Bei einer Eliminierung von zwei Wassermolekülen ist für die Spontanität dieser Reaktion in dem Fall der erste Wassereliminierungsschritt energetisch zu aufwendig. Verbindungen mit 4-Hydroxy-2-butenal-Strukturen cyclisieren dagegen spontan und schnell zu Furanoiden. Viele furanoide Verbindungen in Lebensmitteln werden nach diesem Mechanismus gebildet. Diese treten bei der Maillard-Reaktion, bei Reaktionen von Monosacchariden in stark saurer

Lösung und bei der Peroxidation mehrfach ungesättigter Acyllipide auf. 5-Pentylfuran wurde beispielsweise in oxidierten Sojaölen nachgewiesen und wird dort als Ranzigkeitsmarker verwendet. Bei der Genese wird eine Cyclisierung von 4-Hydroxy-2-nonenal angenommen (Sayre *et al.*, 1993). Mehrere Furanderivate, die bei der Maillard-Reaktion entstehen, sind 5-Methylfurfural, Furanmethanol, 2-Acetylfuran, 2-Methyldihydro-3(2H)-furanon und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon. Kürzlich wurde Furan selbst in zahlreichen thermisch behandelten Lebensmitteln unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen. So ist eine dieser Furanquellen in Lebensmitteln der thermische Abbau von Kohlenhydraten wie Glucose, Lactose und Fructose. Jedoch auch mehrere Monosaccharid/Aminosäure-Mischungen (mit Serin, Cystein, Alanin, Threonin und Asparaginsäure) sowie Proteinmodellssysteme (z.B. Casein) und Vitamine (Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, Thiamin) sind unter thermischer Belastung zur Furanbildung befähigt. Auf der Basis von Pyrolyseversuchen mit ^{13}C -markiertem Serin und Glucose wurde ein Mechanismus für die Furanbildung vorgeschlagen (Abb. 3.21; Perez Locas *et al.*, 2004).

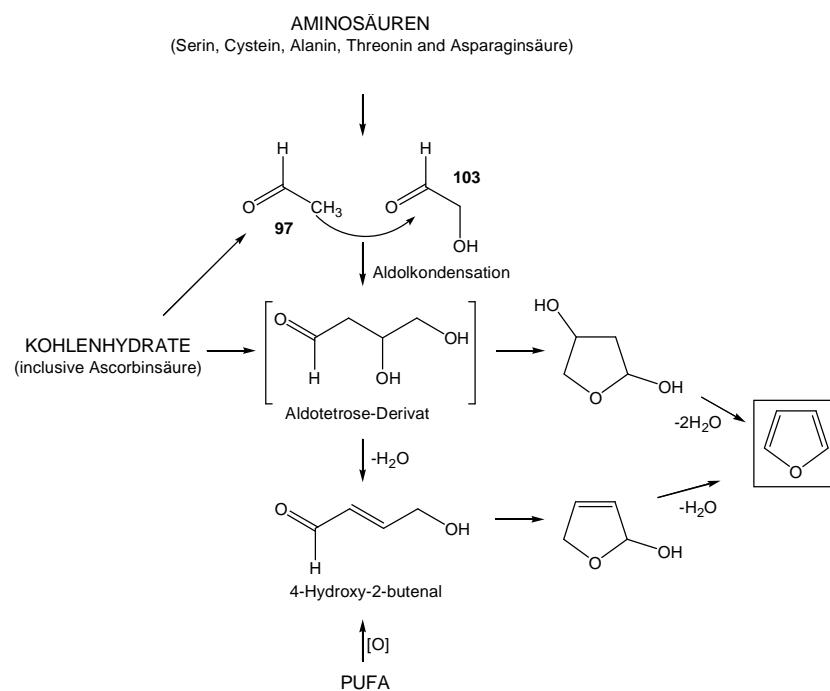


Abbildung 3.21: Mechanismus der Furanbildung bei der Pyrolyse von Kohlenhydraten und/oder Aminosäuren sowie bei der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren; [O] : Oxidation; PUFA : polyunsaturated fatty acids (Perez Locas *et al.*, 2004)

Bei der Pyrolyse von Serin erfolgte demnach eine Aldolkondensation zwischen Acetaldehyd **97** und Glycolaldehyd **103**, bei der als Zwischenstufe ein Aldotetrose-Derivat entsteht, das bis zum Furan insgesamt zwei Dehydratisierungen und eine Cyclisierung durchläuft (Abb. 3.21).

Bildungen furanoider Spezies sind auch mit Singulett-Sauerstoff durch direkte Peroxidation an konjugierten 1,3-Diensystemen möglich. Indiz hierfür ist eine Synthese des furanoiden Monoterpens Perillenal [E-2-Methyl-5-(3-furyl)-2-pental] **109** (Abb. 3.22), das als Hauptdrüsenbestandteil von Kiefernbuschhornblattwespen der Art *Neodiprion sertifer* identifiziert wurde (Baeckström et al., 1982). Es konnte eine Photooxygenierung von β -Myrcen unter UV-Bestrahlung (< 320 nm) zu den Endoperoxiden **105** und **106** durchgeführt werden (Abb. 3.22).

Die Peroxidation des Prenylrestes ist gegenüber der Endoperoxid-Bildung schneller, da die Reaktivität von Singulett-Sauerstoff mit isolierten Doppelbindungen stärker als mit konjugierten 1,3-Diensystemen ist. Erst bei längerer UV-Bestrahlung kommt es zur Bildung der cyclischen Endoperoxide **105** und **106**, die bei der Behandlung mit Eisensulfat in Furanspezies 2-Methyl-5-(3-furyl)-3-penten-2-ol **107** und 2-Methyl-5-(3-furyl)-1-penten-3-ol **108** übergehen (Abb. 3.22, Baeckström et al., 1982).

Die unter autoxidativen Bedingungen beobachtete Konversion des β -Myrcens in furanoide Spezies führt zu der Frage, ob es möglich ist, auch Perillen über das entsprechende Endoperoxid zu bilden.

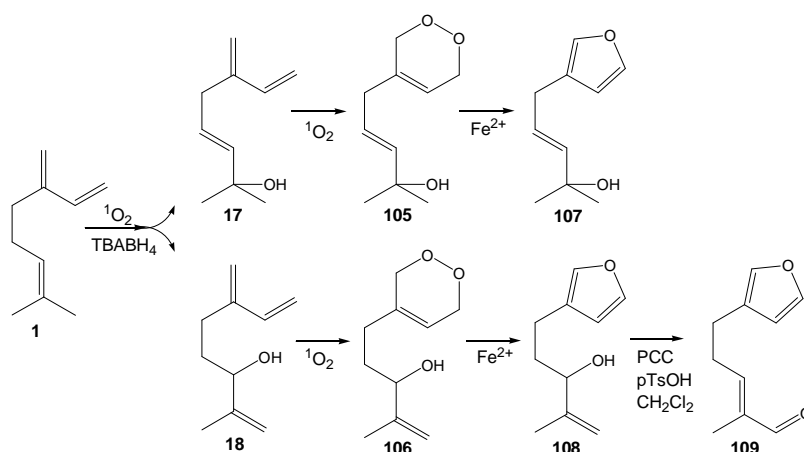


Abbildung 3.22: Synthese von Perillenal [E-2-Methyl-5-(3-furyl)-2-pental] **109** durch Photooxygenierung von β -Myrcen **1** unter simultaner Reduktion der Hydroperoxide mit Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH_4); PCC: Pyridiniumchlorochromat; pTsOH: p-Toluensulfonsäure (Baeckström et al., 1982)

Es wurde jedoch bislang nicht beobachtet, dass das Perillen auf autoxidativem Weg durch Reaktion von β -Myrcen mit $^1\text{O}_2$ und Fe^{2+} entsteht, da die prenylische Doppelbindung stets schneller umgesetzt wird als das konjugierte Doppelbindungssystem. Es sind bislang auch keine Enzyme bekannt, die selektiv solche Endoperoxidbildungen katalysieren würden. Diese Art der Biokonversion kam somit bei der Biokonversion durch *Pleurotus ostreatus* nicht postuliert werden.

3.6 Chemosynthetische Alternativen zur Herstellung von Perillen

Es existiert bislang kein wirtschaftlich anwendungsfähiges Verfahren zur Herstellung von Perillen, obwohl das Interesse, diese Verbindung als Duftstoff zu nutzen, seit langem besteht. In den letzten Jahrzehnten sind einige Synthesestrategien entwickelt worden, mit Hilfe deren naturidentisches Perillen und einige Analoga im Labormaßstab hergestellt werden können. Wirtschaftlich gesehen zeichnen sich diese Verfahren durch hohe Kosten aus. Diese entfallen hauptsächlich auf Chemikalien und die erforderlichen Reinigungsschritte. Das Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln stellt darüber hinaus im Gegensatz zu biotechnologischen Verfahren eine Umweltbelastung dar. Biochemische Umsetzungen sind gegenüber klassischen Chemosynthesen sowohl bezüglich der Regio- und Enantioselektivität als auch des erforderlichen Zeitaufwandes oft überlegen.

Eine stereoselektive Synthese beginnt beispielsweise mit der Addition der kupferorganischen Verbindung **110** an den Tetrahydropyranylether **111** zum Ethylester **112** (Abb. 3.23). Dieser entsteht zu 95 % in der erforderlichen Z-Konfiguration. Protonenkatalysierte intramolekulare Umesterung liefert anschließend das α,β -Acariolid **7**, das nach Reduktion mit DIBAL-H zum α,β -Acarilactol **11** und anschließende Säurebehandlung zum Perillen **2** führt (Abb. 3.23; Kramp *et al.*, 1986).

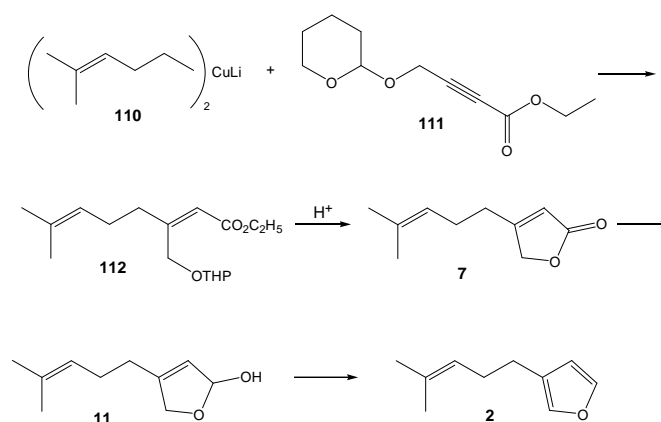


Abbildung 3.23: Synthese von Perillen nach Kramp und Bohlmann; (Ausschnitt aus Kramp *et al.*, 1986); **110:** Di-(4-Methyl-3-pentenyl)-lithium-kopfer; **111:** 4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-2-butansäureethylester; **112:** 10-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-geraniumsäureethylester

Das Perillen lässt sich auch durch Reduktion von α,α -Acariolid mit DIBAL-H und anschließende Säurebehandlung erhalten (2.1.2.5 und 5.4.5). Das α,α -Acariolid ist dabei nach der in der vorliegenden Arbeit (2.1.2.4 und 5.4.4) beschriebenen 4-stufigen Synthesevorschrift verfügbar.

Eine andere Vorschrift verfolgt eine 4-stufige Strategie mit Perillengesamtausbeuten von ca. 32 %. Die Synthese beinhaltet eine Wittig-Horner-Reaktion, deren Produkt nach Reduktion

mit $\text{LiAlH}_3(\text{OEt})$, Behandlung mit Natronlauge und anschließend mit Schwefelsäure zu einer Mischung aus α -E-Acariolal und Perillen umgesetzt wird (Suzuki *et al.*, 1992). Der Trivialname „Acariolal“ wurde hier aus der Publikation nach Shimizu *et al.* übernommen (Shimizu *et al.*, 2003).

Mehrere 3-substituierte Furane, darunter Perillen und Dendrolasin, können durch reduktive Cyclisierung des entsprechenden 1,1,1-Trichlorethylpropargylethers **113** katalysiert durch Cr(II) in Gegenwart eines regenerierenden Mn/TMSCl-Systems erhalten werden (Abb. 3.24, Barma *et al.*, 2002).

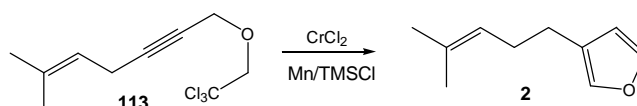


Abbildung 3.24: Synthese von Perillen nach Barma *et al.* (Barma *et al.*, 2002)

Die hier aufgeführten Beispiele der Perillensynthesen zeigen einen enormen Verbrauch an toxischen, umweltbelastenden und zum Teil auch sehr reaktiven Chemikalien. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Oxyfunktionalisierung von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus*, bedienen sich die meisten Chemosynthesen neuer C-C-Verknüpfungen, die aus niedermolekularen Vorstufen das Monoterpengerüst aufbauen. Eine Ausnahme stellt die Synthese von Perillen nach Veselovsky *et al.* (1993) dar, bei der das β -Myrcen mit Benzensulfonylchlorid durch eine Diels-Alder-Addition zu einem Z-Chlorosulfoxid umgesetzt wird. Das Zwischenprodukt cyclisiert anschließend nach mehreren Schritten zum Perillen (Veselovsky *et al.*, 1993; Moiseenkov *et al.*, 1987).

3.7 Möglichkeit zur Perillenproduktion durch Biokonversion von β -Myrcen

Synthetisch hergestelltes Perillen darf die Bezeichnung „natürlicher Aromastoff“ nicht erhalten. Um ein natürliches Perillen handelt es sich nur, wenn es entweder aus biologischen Rohstoffen isoliert oder durch enzymatische bzw. mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsverbindungen pflanzlicher oder tierischer Herkunft hergestellt wird (Aromenverordnung, 2001). Biologische Rohstoffe der Wahl sind meistens pflanzliche etherische Öle. Diese kommen jedoch in den jeweiligen Pflanzenteilen in einem Anteil von weniger als 5 % vor. Darüber hinaus sind etherische Öle komplex zusammengesetzt, so dass an die Isolierung einer einzelnen Verbindung hohe Ansprüche gestellt sind. Aus wirtschaftlicher Sicht kann somit die extraktive Gewinnung den Weltbedarf an Perillen nicht decken. Mehrere Vorteile bieten deshalb Biokonversionen. Diese können nicht nur den Zugang zum „natürlichen“ Perillen verschaffen sondern bieten in Form von biotechnologischen Verfahren auch eine alternative Produktionsstrategie an.

Das entstandene Oxidationsprodukt des β -Myrcens, 3,10-Epoxy- β -myrcen, hydrolysierte nur in sehr geringen Ausbeuten zu den beiden Stereoisomeren des α -Acaridiols (2.4.1) Die nachfolgende Oxidation des Z-Isomers zum Perillen erfolgte jedoch regioselektiv mit einer excellenten Reaktionsausbeute von nahezu 80 % (2.4.2). Durch die Anreicherung des 3,10-Epoxy- β -Myrcens sowie die Chemoselektivität der oxidativen Cyclisierung des α -Z-Acaridiols zum Perillen besteht bei der weitergehenden Prozessoptimierung die Chance, eine hohe Produktreinheit erzielen zu können. Zum Nachteil gehörte die Hydrolyse des 3,10-Epoxy- β -myrcens zum vicinalen Diol, das keine Konversion zum Perillen liefert (Abb. 2.36). Das α -Z-Acaridiol entstand in sehr geringer Ausbeute. Da das Perillen weder Chiralitätszentren noch Doppelbindungen mit E-/Z-Konfiguration enthält, wird die Produktisolierung weniger aufwendig als bei einer Auftrennung von Stereoisomeren sein. Unter den Biokonversionsprodukten war Perillen die einzige Verbindung, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit *in situ* über die Abluft abgetrennt werden konnte. Die Ausbeute an Perillen war jedoch bei der Metabolisierung von β -Myrcen bislang zu gering, um signifikante Mengen an Perillen über die Abluft zu gewinnen. Beim Einsatz des ebenso flüchtigen β -Myrcens entsteht ferner ein Aufreinigungsproblem. Beide Verbindungen werden in gleichem Ausmaß über die Gasphase abgetrennt und in der Adsorptionssäule angereichert, so dass in den Bioprozeßablauf ein zusätzlicher Trennschritt integriert werden muss. Die Auftrennung des β -Myrcen/Perillen-Gemisches ist dabei relativ anspruchsvoll. Bei der Dosierung von α -Z-Acaridiol konnte dagegen im Bioreaktor das Perillen *in situ* über die Abluft als Reinsubstanz erhalten werden. Hier soll betont werden, dass eine *in-situ*-Abtrennung aus wirtschaftlicher Sicht entscheidend zur Kostensenkung beitragen könnte. Eine Limitierung der Biokonversion von β -Myrcen trat bei der formalen Einführung des O-Atoms in den Monoterpenkohlenwasserstoff β -Myrcen (2.1.4) auf. Die Strategie zur Steigerung der

Produktbildungsraten wird somit durch diesen Schritt entscheidend bestimmt und wird in Kapitel 3.8.3 eingehender diskutiert.

3.8 Bedeutung des Verfahrens

3.8.1 Chemische Aspekte der Biokonversion

Aufgrund der zu geringen Ausbeute lässt sich die Biokonversion des β -Myrcens zum Perillen in einem industriellen Produktionsverfahren zu Zeit noch nicht anwenden. Ein Problem besteht zunächst in der unselektiven Hydrolyse des 3,10-Epoxy- β -myrcens zum α -Z-Acaridiol, die nur einen Seitenweg der Epoxidhydrolyse darstellt. Für die entsprechende 1,4-Hydratisierung des Vinylepoxids sind keine Enzyme bekannt. Alle bekannten Epoxidhydrolasen setzen Epoxide zu vicinalen Diolen um und die enzymatische Ausstattung des Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* stellt ausnahmslos diese fremdstoffmetabolisierenden Epoxidhydrolasen bereit. Eine selektive Epoxidhydrolase-Inhibierung könnte die Bildung vicinaler Diole verzögern. Die Kenntnis darüber, welche Komponenten im Nährmedium eine 1,4-Addition des Wassers an 3,10-Epoxy- β -myrcen katalysieren und nach welchem Mechanismus entsprechende Epoxidhydrolyse erfolgt, kann eventuell zu einer Steigerung der Produktbildungsrate beim Einsatz entsprechender Komponenten als Katalysatoren beitragen. Günstig wäre, einen selektiven Biokatalysator zu finden, der das 3,10-Epoxy- β -myrcen selektiv zum α -Z-Acaridiol umsetzt. Das Problem wäre mit der Produktion des natürlichen α -Z-Acaridiols gelöst, da die Biokonversion von α -Z-Acaridiol zum Perillen mit einer hohen Ausbeute keinen limitierenden Faktor für eine Etablierung im industriellen Maßstab darstellt.

Ein zweites Problem der Biokonversion liegt in der sehr schwachen Gesamtumsetzung des β -Myrcens zu funktionalisierten Spezies. Die formale Einführung des O-Atoms in das β -Myrcen-Molekül ist der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt (2.1.4). Neben einigen physikalischen Faktoren, die in Kapitel 3.8.2 näher diskutiert werden, besteht die Limitierung vermutlich in der mangelhaften Expression der monooxygenierenden Enzymsysteme. Eine Option bietet die heterologe Überexprimierung der betreffenden Gene durch Screening von cDNA Banken und Klonierung in einem geeigneten Vektorsystem wie *Escherichia coli* oder bestimmten Hefen. Fortschritte wurden bereits mit den Basidiomyceten *Lentinula edodes* (Akyjama *et al.*, 2002) und *Coriolus versicolor* (Ichinose *et al.*, 2002) erzielt. Am Institut konnte das Gen einer Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase aus *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris* heterolog exprimiert werden (Bouws *et al.*, 2006). Eine Enzymisolierung aus dem Zellmaterial ist andererseits schwierig, da Monooxygenasen instabil sind. Sie benötigen auch eine für die NADPH-Regenerierung erforderliche Reduktase, so dass diese mit dem CYP-Enzym nach Aufreinigung wieder rekonstituiert werden müssen.

3.8.2 Physikalische Aspekte der Bioprozesstechnik

Eine Problematik der Biokonversion im Bioreaktorsystem lag in der Hydrophobizität und Flüchtigkeit des Substrats. Etwa 36,6 % des β -Myrcens (Tab. 2.7) wurden nach 8 Tagen Biokonversionszeit als Verluste über die Abluft gemessen. Verstärkt wurde dieser Effekt durch eine aktive Sauerstoffversorgung des Bioreaktoransatzes mit einem Luftstrom von 0,3 vvm. Das Problem ist jedoch durch Wiedergewinnung und kontinuierliche Rückführung des Substrats ins Kulturmedium lösbar.

Eine Verteilung des β -Myrcens und dessen Konversionsprodukten zwischen dem Kulturüberstand und dem Mycel wurde mit 1:5,8 zugunsten des Mycels ermittelt (Tab. 2.7). Der überschüssige Anteil des Mycels bestand hauptsächlich aus β -Myrcen und dessen Dimeren. Vermutlich erfolgte die Akumulierung überwiegend in den Membranen, da sich Terpenkohlenwasserstoffe als lipophile Substanzen gut darin lösen. Die Akumulierung in der Membran kann auf eine deutlich langsamere Oxyfunktionalisierung des Monoterpens zurückgeführt werden. Die aktive Zelle erreicht hiermit eine letale Substratdosis. Die daraus resultierende toxische Wirkung besteht darin, dass die Einlagerung in die Zellmembran deren Integrität und so deren Funktion stört. Gleichzeitig nimmt die Membranfluidität zu. Die Störung der Membranintegrität kann zur Hemmung oder im Extremfall zur Entkopplung der Elektronentransportketten führen, da diese in der mitochondrialen Membran lokalisiert sind. Dies kann wiederum den Zusammenbruch des Protonengradienten und damit den Abbruch der oxidativen Phosphorylierung von ADP zufolge haben (Stryer, 2003). Der Energiestoffwechsel kommt dadurch zum Erliegen. Mit zunehmender Membranfluidität kommt es auch zur Störung der membrangebundenen Enzymsysteme wie der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen. Bereits geringe Fluiditätsschwankungen sind schon wirksam, da für einen Elektronentransfer am Cytochrom ein genügend stabiler Enzym-Substrat-Komplex verfügbar sein muss (Osborne *et al.*, 1990).

Als Mass für die Toxizität einer Verbindung im Nährmedium auf einen Mikroorganismus gilt der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen einer wässrigen und einer n-Octanol-Phase LogP_{OW} . Gemessen an der Aktivität des Biokatalysators durchläuft die Substrattoxizität bei Ganzzellkatalyse in einem LogP_{OW} -Intervall zwischen 3 und 5 ein Maximum. Mit zunehmender Hydrophilie oder Lipophilie des Substrats sinkt die Toxizität. Die oxyfunktionalisierten Biokonversionsprodukte werden aufgrund ihrer geringeren LogP-Werte bevorzugt ins Nährmedium ausgeschieden und das Substrat wird auf diese Weise detoxifiziert. Da β -Myrcen einen LogP-Wert > 5 aufweist, bleibt dessen Konzentration im Nährmedium für den Basidiomyceten toxikologisch unbedenklich, so dass eine Substrattoxizität für die geringe Produktbildung hier nicht verantwortlich sein kann. Das Substrat reichert sich infolge dessen auf der Oberfläche der wässrigen Phase an.

Die Detoxifizierung ist vermutlich schnell genug, um die Zellen aktiv zu halten. Die Substratdosierung kann deshalb im beliebigen Überschuss erfolgen. Das an der Oberfläche des Nährmediums angereicherte β -Myrcen di- und polymerisiert jedoch mit der Zeit, so dass eine kontinuierliche Substratdosierung von Vorteil ist. Diese verhindert, dass sich β -Myrcen an der Oberfläche des Nährmediums anreichert und verhindert dadurch dessen Polymerisierung. Ein Teil des β -Myrcens und dessen Dimeren lagern sich auch in den inaktiven Zellen ab, in denen sie einer weiteren Polymerisierung bzw. einer Autoxidation erliegen und damit einer Biokatalyse entzogen werden. Der Anteil an inaktiven Zellen im Medium und damit die Verluste durch Akkumulierung im Zellinneren nimmt im Laufe der Biokonversion zu. Ein kontinuierliches Verfahren mit einem eingestellten Fließgleichgewicht könnte dabei Abhilfe schaffen. Hier wird der Zu- und Abfluss des Kulturmediums gleich groß gewählt, so dass alle Parameter zeitlich invariant sind, die Organismen über längere Zeit in exponentiellen Wachstumsphasen kultiviert werden können und die Volumen-Zeit-Ausbeuten ihr Optimum erreichen (Dellweg, 1987).

3.8.3 Steigerung der Perillenumsatzrate

Die Biomasse stellt einen entscheidenden Parameter für die Steigerung der Produktbildung bei Biokonversionen dar. Im Folgenden werden Behandlungsmaßnahmen diskutiert, die für die Steigerung der Perillenbildungsrate von entscheidender Bedeutung sein können. Zu den Methoden gehören insbesondere Zellkonzentrierungen und Kulturvorbehandlungen. Durch Zellkonzentrierung kann beispielsweise die Kulturbrühe auf höhere Biokatalysatorkonzentrationen gebracht werden. Als Maßnahmen für Vorbehandlungen von Zellmassen kommen besonders die auf der Stufe der Vorkultur durchgeführte Substratinduktion und bestimmte Gefrierprozesse in Frage. Da diese Methoden auch zur Verbesserung der Perillenausbeute bei der Biokonversion von β -Myrcen durch *Pleurotus ostreatus* nützlich sein können, werden sie im Folgenden diskutiert.

3.8.3.1 Biokonzentrate

Biokonzentrate wurden besonders bei Kultivierungen von Bakterien etabliert. Mit Hochzelldichte wurde beispielsweise die Kultivierung eines photosynthetisierenden Bakteriums der *Rhodovulum*-Art durchgeführt (Watanabe *et al.*, 1998). Zellkonzentrierungen bei Pilzmycel sind jedoch weniger bekannt. Bei der Herstellung von γ -Linolensäure mit *Mucor*-Arten konnten Zelldichten von 100 g L^{-1} Trockenmasse erreicht werden (Park *et al.*, 1991). Eine Verbesserung wurde auch mit *Pycnoporus cinnabarinus* bei der Biokonversion von Ferulasäure zu Vanillin erzielt. Die Zelldichte mit 7 g L^{-1} lag dabei um den Faktor 4 über der normalen Zellmassenbildung (Oddou *et al.*, 1999). Durch eine Aufkonzentrierung der Biomasse von *Chaetomium globosum* konnte die Biokonversionsleistung im Volumen-Zeit-

Verhältnis bezüglich der Nootkatonbildung verbessert werden (Kaspera, 2004). Die effektive Biokonversionsrate, gemessen in mg Produkt je g Biotrockenmasse bleibt dabei stets die gleiche.

3.8.3.2 Kulturvorbehandlungen

Im Dosierungsversuch mit isotopenmarkiertem β -Myrcen wurde die Vorkultur mit geringen Mengen der nicht markierten Spezies supplementiert. Ziel dieser Maßnahme war die Induktion der metabolisierenden Enzyme während der Vorkultur. Die Induktionsperiode der nachfolgenden Experimentalkultur sollte dadurch verkürzt und die Biokonversion des β -Myrcens beschleunigt werden. Eine möglichst hohe Konversionsrate war vor allem wegen der Flüchtigkeit des β -Myrcens von entscheidender Bedeutung.

Eine weitere Vorbehandlung, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde, ist die Permeabilisierung aktiver Zellen. Bei einer Biokonversion durch Basidiomyceten müssen Substrate sowohl durch die Zellwand als auch die Zellmembran transportiert werden. Hier stellt insbesondere die Zellmembran eine osmotische Barriere dar und hemmt so den Stofftransport und damit auch die Biokonversion (van der Werf *et al.*, 1999). Zur Verbesserung der Biokonversionsrate von Limonen, Valencen und Farnesen durch Basidiomyceten wurde am Institut die Lyophilisierung als Permeabilisierungsmethode mit Erfolg eingesetzt (Kaspera, 2004).

Durch Lyophilisierung wird offensichtlich die Integrität der Membranstruktur unter Aufrechterhaltung der Enzymaktivität gestört, wodurch die Enzyme für Substrate zugänglicher werden. Es besteht jedoch die Gefahr, dass membrangebundene Enzyme wie Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen inaktiviert werden.

Die lyophilisierten Zellen können auch als *resting cells* bezeichnet werden. Es sind Zellen, deren Wachstum zwar unterbunden ist, die Enzyme jedoch weitgehend intakt bleiben. *Resting cells* können jedoch auch durch andere Behandlungsmethoden erzeugt werden. Als Beispiele können hier einfache Inkubationen in Pufferlösungen aufgeführt werden. Bei der Biokonversion von α -Pinen zum Verbenon mit *resting cells* von *Aspergillus niger* wurde beispielsweise eine Ausbeute von 16,5 % erreicht. Die Inkubation erfolgte im isotonischen Natriumphosphat-Puffer, so dass die Zellen während der Biokonversion inaktiv waren (Agrawal *et al.*, 2000). Durch Behandlung mit organischen Lösungsmitteln wie Toluol oder Chloroform können ebenfalls Zellen partiell aufgeschlossen werden. Im industriellen Maßstab sind ferner physikalische Methoden wie Extrusionen oder Ultraschallbehandlung üblich (Cabral, 2001).

4 Ausblick

Die Feststellung einer Perillenbildung aus β -Myrcen durch *Pleurotus*-Arten führt zu einer detaillierten Aufklärung der zugrunde liegenden Biogenese. Das Ziel wurde durch Synthese und Dosierungen der postulierten Zwischenstufen in Submerskulturen von *Pleurotus ostreatus* erreicht. Die Biogenese war von Seitenwegen und limitierenden Zwischenschritten gekennzeichnet. Auch andere 1,3-Diene wurden ansatzweise auf Cyclisierung zu Furan-Spezies mit positivem Ergebnis untersucht. Ocimen lieferte dabei Rosenfuran und Epoxyrosenfuran.

Um den Biokonversionsweg zukünftig im industriellen Maßstab nutzen zu können, bedarf es im nächsten Schritt einer weiterführenden Aufklärung der Katalyse. Es müssen für jeden einzelnen Schritt beteiligte Enzyme und andere Katalysatoren identifiziert und /oder isoliert werden. Das weitere Ziel der Forschung ist die Steigerung der Perillenausbeute, so dass Biogenese-Wege verstärkt und Seitenwege inhibiert werden müssen. Im zweiten Fall wäre beispielsweise der Einsatz enzyme-spezifischer Inhibitoren denkbar. Bei nicht enzymatischen Schritten hängt die Strategie von der Art des Katalysators ab. Der sicherste Weg wäre jedoch eine Verstärkung der beteiligten Biokatalyse. Dazu lassen sich entweder Enzyme isolieren, so dass diese direkt für die gewünschte Biokonversion eingesetzt werden können oder man bedient sich einer Klonierung der zugrunde liegenden DNA-Sequenz in einen geeigneten Vektor wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces* mit anschließender Überexpression. Hier müssen aus den Aminosäuresequenzen Primer abgeleitet werden, um über Screening von cDNA-Banken die DNA-Sequenz der Enzyme zu ermitteln. Die Isolierung biokonversionsrelevanter Monooxygenasen unter Aktivitätserhalt wäre für die Charakterisierung der Enzyme und Bestimmung deren Aminosäuresequenzen von Vorteil.

Da die Konversion des 3,10-Epoxy- β -myrcens zum α -Z-Acaridiol vermutlich nicht enzymatisch verläuft, wäre eine genauere Klärung der Katalyse und des darauf beruhenden Mechanismus von großer Bedeutung. Dazu müsste diese Konversion im chemischen Kontrollversuch genauer untersucht werden. Eine Dosierung des 3,10-Epoxy- β -myrcens unter Variation der Medienzusammensetzung und anschließende GC-Analyse könnte Aufschluß über die an der Katalyse beteiligten Komponenten im SNL-Medium geben.

Der Einsatz von Lyophilisaten als vorbehandelte Kultur könnte über die verbesserte Zugänglichkeit der beteiligten Enzyme eine Steigerung der Perillenausbeute zur Folge haben (siehe Kapitel 3.8.3.2). Insbesondere im Fall der instabilen Monooxygenasen wäre eine Immobilisierung an ein Trägermaterial vorteilhaft. Diese Technik bietet eine zusätzliche Stabilisierung der Enzyme sowie einen längerfristigen Aktivitätserhalt.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Chemikalien

5.1.1 Organismen

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Basidiomycet *P.ostreatus* wurde als Kultur aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

Bezeichnung des Stammes: DSMZ 1020

5.1.2 Chemikalien

Tabelle 5.1: Bestandteile der Kulturnährlösung (SNL) nach Sprecher

Substanz	Reinheit	Anbieter
Agar Agar	f.d. Mikrobiologie	Merck
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f.d. Mikrobiologie	Merck
L-Asparagin-Monohydrat	reinst	Merck
KH ₂ PO ₄	f.d. Molekularbiol.	Merck
MgSO ₄ × H ₂ O	chem. rein DAB 7	Riedel-de-Haen
Hefeextrakt	f.d. Mikrobiologie	Merck
FeCl ₃ · 6H ₂ O	-	Riedel-de-Haen
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	puriss, p.a.	Fluka
MnSO ₄ · H ₂ O	purum p.a.	Fluka
CuSO ₄ · 5H ₂ O	99%	Baker
Titriplex III (EDTA)	≥99%	Merck
NaOH	p.a.	Riedel-de-Haen

Tabelle 5.2: Substrate, Reagenzien, und sonstige Chemikalien für Kultivierungsversuche und/oder chemische Synthesen

Substanz	Reinheit	Anbieter
β -Myrcen	techn. $\geq 90\%$	Fluka
Z-Ocimen/Limonen		Fluka
Cyclopropylmethylketon		Fluka
Methylmagnesiumiodid	3M, in Et ₂ O	Fluka
H ₂ SO ₄		Merck
NaHSO ₃		Fluka
NaHCO ₃		Merck
NaCl		Roth
Na ₂ SO ₄		Roth
α -Brom- γ -butyrolacton		Fluka
Dimethylsulfid		Fluka
Lithiumdiisopropylamid-Lsg.	2M, n-Heptan/THF/Ethylbenzen	Aldrich
Hexamethylphosphosäureamid		Fluka
NH ₄ Cl		Riedel-de-Haen
Natriummetaperiodat (NaIO ₄)		Fluka
Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H)	1M, n-Hexan	Across
Pyridiniumdichromat (PDC)		Fluka
Butyllithium	1.6M	Fluka
Methylvinylketon		Fluka
Methyl-(carboxy-sulfamoyl)triethylammoniumhydroxid (Burgess-Reagen)		Fluka
CaH ₂		Fluka
m-Chlorperbenzoesäure (mCPBA)		Fluka
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)		Merck
Benzyltributylammoniumchlorid		Fluka
p-Tosylchlorid (p-TsCl)		Fluka
Salzsäure (HCl)		Merck
Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃)	neutral, deaktiviert*	Roth
Bis[trimethylsilyl]-trifluoracetamid (BSTFA)	-	Sigma

*über Nacht bei 120°C getrocknet und im Exiccator gelagert

5.1.3 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden frisch destilliert und bei entsprechenden Anforderungen über Molekularsieb getrocknet. Diethylether, n-Pentan sowie azeotropes Gemisch von beiden wurden nach Gebrauch redestilliert und ebenso wie Fassware über eine Rektifikationskolonne destillativ aufgereinigt.

Tabelle 5.3: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Anbieter	Verwendung
Diethylether	dest.	Kraemer & M	SC, Extraktion, Synthesen
n-Pentan	dest.	BASF	SC, Extraktion
Tetrahydrofuran (THF)	puriss., absolute	Fluka	Synthesen
Methanol (MeOH)	dest.	Bayer	Synthesen
Methanol	dest., absolut	Baker	SC
Toluol	p.a.	Fluka	Synthesen
Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)	dest., absolut	Hoechst	Synthesen
Pyridin	p.a., absolute	Merck	Synthesen

5.1.4 Gase

Gase wurden hauptsächlich für die Gaschromatographie, aber auch als Schutzgas für Synthesen verwendet. Die Druckluft wurde über einen Staubfilter durch einen Kompressor angesaugt und zur Trocknung über eine 5 × 30cm Silicagelsäule geleitet.

Tabelle 5.4: Verwendete Gase

Gas	Qualität	Anbieter	Verwendung
Druckluft	getrocknet	-	FID-Gas / Kulturbelüftung
Helium	5.0	Linde	Trägergas (GC-MS)
Stickstoff	5.0	Linde	Spülgas (GC) / Schutzgas
Wasserstoff	5.0	Linde	Trägergas / FID-Gas

5.1.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Tabelle 5.5: Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel.

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus
Steril-Werkbank	Laminar-Flow 821/825	Stangl
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Schüttler	Infors HAT	Infors
Brutschrank	UM 500	Memmert
Ultra-Turrax	TP 18/10, 170W	Janke & Kunkel
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Vakuumpumpe	Two Stage Nr. 3	Edwards
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus
Rührwerkskugelmühle	DYNO-Mill Typ KDL	W.A. Bachofen
Lichtmikroskop	Will H-500	Hunt GmbH
Ultraschallbad	Sonorex 510 H	Bandelin
Destillationskolonne	Vigreux	LAT

5.1.6 Bioreaktor

Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach

Kulturgefäß :	2,5 L
Sauerstoffelektrode :	Ingold, Nr. 322 756 701
pH-Elektrode :	Mettler Toledo Nr. 10 465-35 K9
Druckluft :	Membrankompressor (Druck 0,6 bar) sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Abluft :	PTFE-Membranfilter (s.o.) als Sterilbarriere
Standardbedingungen :	24°C, 250 rpm
Belüftung :	Luftrohr (a.D. 8 mm), 0,4 L·min ⁻¹ ; 0,1 vvm bei 2,5 L Füllvolumen
Adsorptionssäule :	Lewatit (OC 1064)

5.2 Kultivierung von Transformationskulturen

5.2.1 Kulturmedien

Die Medienbestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst, die entstandene Nährlösung mit 1N NaOH-Lösung auf pH 6 eingestellt und zu 100 mL in 300 mL-Erlenmeyerkolben bzw. zu 200 mL in 500 mL-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und 20 min bei 121°C autoklaviert.

5.2.1.1 Standardnährlösung (SNL, Sprecher und Hansen, 1982)

D-(+)-Glucose-Monohydrat (30 g L⁻¹), Asparagin-Monohydrat (4,5 g L⁻¹), Hefeextrakt (3,0 g L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g L⁻¹) und Spurenelementlösung (1 mL L⁻¹) bestehend aus FeCl₃ × 6 H₂O (0,08 g L⁻¹), ZnSO₄ × 7 H₂O (0,09 g L⁻¹), MnSO₄ × H₂O (0,03 g L⁻¹), CuSO₄ × 5H₂O (0,005 g L⁻¹), EDTA (0,4 g L⁻¹) wurden mit 0,1N NaOH-Lsg. auf pH 6,0 eingestellt.

5.2.1.2 SNLH-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem Medium nach 5.2.1.1 zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar vor dem Sterilisieren zugegeben.

5.2.2 Kulturführung

5.2.2.1 Stammkultivierung

Aus dem kommerziell bezogenen Stamm wurden jeweils zwei Kulturen auf Agarplatten mit SNLH-Agar-Medium angelegt. Hierbei wurde eine Agarplatte mit einem quadratischen, bewachsenen Agarstück (ca. 0,5 × 0,5 cm) beimpft und bei 24°C im Brutschrank kultiviert. Nach Bewachsen der Hälfte der Agarplatte wurde die Kultur bei 4°C gelagert. Die Stammkultur wurde mindestens alle 6 Monate nach dem gleichen Verfahren erneuert.

5.2.2.2 Homogenisieren von Kulturen

Die Homogenisierung von Mycel aus Agarplatten oder flüssigen Kulturmedien erfolgte unter aseptischen Bedingungen (Steril-Werkbank) innerhalb des sterilen Kulturmediums (Autoklav) mit einem vorab hitzesterilisierten Ultra-Turrax-Homogenisator für 10 s bei mäßiger Drehgeschwindigkeit.

5.2.2.3 Vorkulturen

Von der auf Agarplatten geführten Stammkultur wurden mycelbewachsene Agarstücke mit einem hitzesterilisierten Spatel in 100 mL SNL-Medium in einem 300 mL-Erlenmeyerkolben (bzw. in 200 mL SNL-Medium in einem 500 mL-Erlenmeyerkolben) überführt, homogenisiert nach 5.2.2.2 und 5 Tage im Schüttelschrank bei 24°C und 150 rpm inkubiert.

5.2.2.4 Experimentalkulturen

20 mL der Vorkultur (5.2.2.3) wurden nach Homogenisieren mit Ultra-Turrax in 200 mL sterilisiertes SNL-Medium überführt (500 mL-Erlenmeyerkolben) und weitere 5 Tage bebrütet. Die Inkubation erfolgte im Schüttelschrank bei 24°C und 150 rpm.

5.2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor

Im Bioreaktorversuch wurden 1,8 L SNL-Medium mit 200 mL einer homogenisierten Vorkultur inokuliert. Am nächsten Tag wurde die erste Dosierung des jeweiligen Substrats vorgenommen. Die Dosierung wurde täglich fortgesetzt. Auch die Probenahme von ca. 100 mL Kulturmedium wurde täglich vorgenommen und nach Faltenfiltration die Produkte durch Extraktion aus dem Überstand bestimmt. Die durch Filtration erhaltenen Pellets wurden zur Trockenmassenbestimmung eingesetzt. Das Kultur im Bioreaktor wurde nach jeder Probenahme auf 2 L mit sterilem Medium aufgefüllt.

5.2.2.6 Zellaufschluss mit Hilfe einer Kugelmühle

Das System wurde mit Hilfe eines Umlaufkühlers auf +4°C gekühlt. Das Mahlgefäß wurde mit 80 mL Glasperlen und ca. 20 mL Biofeuchtmasse versetzt und das Gemisch anschließend mit 50 mL 70 % - igen Methanols überschichtet. Die Glasperlen und das Mahlgut wurden 3 mal 0,5 min lang gerührt, der Überstand anschließend herauspipettiert und zur Pentan/Diethylether-Extraktion eingesetzt.

5.2.3 Dosierung von Transformationssubstraten

5.2.3.1 Direkte Substratdosierung in das Kulturmedium

Für die Substratdosierung in Submerskultivierungen wurde zwecks Sterilisierung der jeweilige Substrat in 100 µL (für 100 mL SNL-Medium) bzw. 500 µL (für 200 mL SNL-Medium) Ethanol aufgenommen und nach 5 Tage Kulturdauer unter aseptischen Bedingungen direkt in das Kulturmedium überführt.

5.2.3.2 Kontrollversuche

Alle Kontrollversuche wurden analog zum entsprechenden Kultivierungsversuch durchgeführt, wobei zwischen chemischem und biologischem Kontrollversuch unterschieden wurde. Im chemischen Kontrollversuch wurde das Substrat mit Medium ohne Kultur behandelt, während im Kultivierungsversuch das Substrat in das SNL-Medium mit Kultur überführt wurde. Beide Dosierungen erfolgten zeitgleich. Der biologische Blindversuch wurde mit vitaler Kultur ohne Substratdosierung durchgeführt.

5.3 Analytik

5.3.1 Probenahmeverfahren

5.3.1.1 Probenahme aus Schüttelkulturen

Aus den jeweiligen Schüttelkulturen wurden täglich mit sterilen Socorex-Eppendorfpipetten ca. 20 mL Proben entnommen und mittels Faltenfilter in Biomasse und Kulturüberstand getrennt. Der Kulturüberstand wurde mit n-Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v) extrahiert.

5.3.1.2 Probenahme aus dem Bioreaktor

Aus dem Bioreaktor wurden täglich ca. 100 mL Probe über einen unteren Ventilablass entnommen, wobei die entstandene Volumendifferenz mit einem frisch autoklavierten SNL-Medium ausgeglichen wurde. Die Probe wurde anschließend wie in 5.3.1.1 weiter behandelt.

5.3.1.3 Untersuchung der Bioreaktor-Abluft

Die Abluft des Bioreaktors wurde während des Dosierungsversuchs kontinuierlich durch eine Adsorptionsglassäule (1 × 12 cm) mit 10 g aktivierten Lewatits OC 1064 geleitet. Die Lewatit-Säule wurde täglich durch eine neue ausgetauscht. Das Lewatit selbst wurde mit 3 × 30 mL n-Pentan/Diethylether extrahiert, der Extrakt mit n-Nonadecan als internen Standard versetzt, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, mittels Vigreux-Destillation aufkonzentriert und gaschromatographisch untersucht. Die Reinigung des Lewatits erfolgte durch dreimalige Waschung mit Methanol, Diethylether und n-Pentan mit jeweils doppeltem Volumen des Adsorbens durchgeführt. Das so gereinigte Lewatit wurde dann bei 100°C mindestens über Nacht getrocknet.

5.3.2 Bestimmung von Kulturparametern

5.3.2.1 Bestimmung der Zellmasse

-Biofeuchtmasse:

Nach Filtration der Kultur mit Büchnertrichter wurde die Zellmasse ausgewogen und ins Verhältnis zur Masse des Kulturmediums (SNL-Medium + Mycel) gesetzt. Die Biofeuchtmasse wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$a_{BF}[\%] = \{m_{BF}[\text{g}] / m_G[\text{g}]\} \times 100$$

$a_{BF}[\%]$: Anteil der Biofeuchtmasse in [g/100g]

$m_{BF}[\text{g}]$: Biofeuchtmasse in [g]

$m_G[\text{g}]$: Gesamtmasse des Kulturmediums in [g]

-Biotrockenmasse:

Ein aliquoter Teil der Kultur wurde über ein tariertes Faltenfilter filtriert. Der Filter wurde dann 24 h bei 105°C im Trockenschrank getrocknet und ausgewogen. Die Berechnung erfolgte analog zur Biofeuchtmasse und wurde in der Einheit [g·(100g)⁻¹] angegeben.

5.3.2.2 Bestimmung des Glucosegehaltes

Die Bestimmung des Glucosegehaltes wurde mit einer Schnellmethode (Teststäbchen) mittels Diabur-Test[®]5000 von Boehringer Ingelheim nach Herstelleranweisung bestimmt.

5.3.2.3 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde direkt nach der Probenahme mit einem täglich kalibrierten pH-Meter gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit 2 Puffern von pH 4 und pH 7.

5.3.2.4 Prüfung auf Kontaminationen

Das Kulturmedium wurde nach jedem Kultivierungsversuch durch eine mikroskopische Untersuchung auf Kontaminationen geprüft.

5.3.3 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

-Extraktion von Kulturüberständen

Die durch Probenahme erhaltenen Kulturüberstände von ca. 20 mL wurden mit 3 × 10 mL n-Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v) - Lösungsmittelgemisch extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, mit n-Nonadecan als interner Standard versetzt und an einer Vigreux-Kolonne bei 40°C Badtemperatur destillativ eingengt. Der erhaltene, aufkonzentrierte Extrakt wurde mittels GC-FID und GC-MS analysiert.

-Extraktion von Mycel

Das Mycel wurde mit Hilfe einer Kugelmühle aufgeschlossen und entsprechend der Vorschrift für die Extraktion von Kulturüberständen mit n-Pentan-Diethylether (1/1,12; v/v)-Lösungsmittelgemisch extrahiert. Der aufkonzentrierte Extrakt wurde mittels GC-FID und GC-MS analysiert.

-Zellaufschluss mittels Kugelmühle

Der Mahlraum wurde mit 80 mL Glasperlen beschickt. 20 mL Biofeuchtmasse wurden mit 50 mL 70% - igen Methanols quantitativ in den Mahlraum mit den Glasperlen überführt und 1 min gerührt. Nach einer Pause von 0,5 min wurde der Vorgang noch 2 mal wiederholt. Der Überstand wurde abpipettiert und die Reste durch nachträgliches, mehrmaliges Rühren mit 70 % - igem Methanol entfernt und mit der übrigen Aufschlussbrühe vereinigt. Die resultierende Zellaufschlussbrühe wurde gemäß der obigen Vorschrift einer *flüssig-flüssig*-Extraktion mit n-Pentan-Diethylether-Gemisch unterworfen.

-Reinheitsüberprüfung von Syntheseprodukten

Zur Quantifizierung mittels GC wurden ca. 10 µL des Produkts in einem 10 mL Messkolben eingewogen und mit n-Pentan/Diethylether-Lösungsmittelgemisch auf 10 mL aufgefüllt. Ein aliquoter Teil der erhaltenen Lösung wurde in ein zweites 10 mL Messkolben überführt, mit 801,8 µg n-Nonadecan als internen Standard versetzt, auf 10 mL mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch aufgefüllt und zur Injektion eingesetzt.

5.4 Chemische Synthesen

5.4.1 Synthese von 1,2- und 3,10-Epoxy-β-myrcen

1,2- und 3,10-β-Myrcendihydrodiol (1.Stufe):

Eine Mischung aus Kaliumpermanganat (10,4 g; 66,0 mmol) und Benzyltributylammoniumchlorid (21.3g; 66.1mmol) wurden 3h lang bei RT in trockenem Dichlormethan (1 L) gerührt, auf -30°C gekühlt, mit β-Myrcen (20 g; 147,1 mmol) langsam (mindestens 1 h lang) versetzt und über Nacht zwischen -20°C und -30°C aufbewahrt. Das Reaktionsmedium darf am ersten Tag möglichst nicht braun werden. Am nächsten Tag wurde nacheinander mit Natronlauge (10 g 160 mL⁻¹), Natriumhydrogensulfit (10 g 160 mL⁻¹) und Schwefelsäure (20 g 200 mL⁻¹) behandelt, wobei nach dem Ansäuern eine Entfärbung beobachtet wurde.

Die organische Phase wurde von der wässrigen Phase getrennt, mit dest. Wasser und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Beide vicinale Dirole wurden zuerst säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0,063-0,100 mm) mit n-Pentan, dann mit n-Pentan/Ether (7/3; v/v) von β-Myrcen-Resten befreit und durch Elution mit n-Pentan/Ether (5/5; v/v) isoliert. Es resultierte eine gelbe, ölige Flüssigkeit bestehend aus 1,2- (1,06 g), 3,10- (0,97 g) und 6,7-β-

Myrcendihydrodiolen (0,16 g). Um jeweils 1,2- und 3,10-Dihydrodiole aufzutrennen erfolgte eine zweite Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (0,043-0,063) gemäß folgender Fraktionierung:

1. n-Pentan	2. n-Pentan/Ether (7/3; v/v)	3. n-Pentan/Ether (1/1.12; v/v)
4. n-Pentan/Ether (3/7; v/v)	5. Ether	6. Ether/Aceton(7/3; v/v)
7. Ether/Aceton (5/5; v/v)		

Ausbeuten und Charakterisierung:

1,2- β -Myrcendihydrodiol: 9,5 % (1,1 g; 6,3 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ : 1,60 (3H, s, $-\text{CH}_3$ cis), 1,68 (3H, s, $-\text{CH}_3$ trans), 3,46-3,71 (2H, m, CH_2OH), 4,16-4,20 (C2; CH-OH ,m), 4,96 und 5,13 (C10; $\text{CH}_2=\text{C}$,m), 5,10 (C6; $\text{CH}=\text{C}$,t)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ : 17,8 (C9), 25,7 (C8), 26,6 (C5), 32,7 (C4), 65,9 (C1), 75,4 (C4), 110,5 (C10), 124,0 (C6), 131,8 (C7), 148,3 (C3)

GC-MS m/z (%): 170(M^+ , Spuren), 152($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 1), 139(5), 134(1), 121(3), 119(8), 109(16), 101(13), 95(10), 93(11), 91(8), 85(9), 83(7), 81(10), 79(11), 77(6), 70(13), 69(99), 67(19), 55(20), 53(11), 43(25), 41(100), 39(19)

GC-MS [silyliert mit BSTFA] m/z (%): 314(M^+ ,1) 245(9), 211(10), 181(45), 155(19), 147(20), 121(24), 93(24), 73(100), 69(13), 45(18), 41(24)

3,10- β -Myrcendihydrodiol: 8,6% (965 mg; 5,7 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ : 1,57 (3H,s), 1,65 (3H,s), 3,46 (CH_2OH ,m), 5,08 ($\text{CH}=\text{C}$,t), 5,20-5,36 ($\text{CH}_2=\text{CH}$,m), 5,72-5,84 ($\text{CH}=\text{CH}_2$,m)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 17,7 (C-9), 22,0 (C-5), 25,7 (C-8), 36,8 (C-4), 68,8 (C-10), 76,3 (C-3), 115,1 (C-1), 124,2 (C-6), 132,1 (C-7), 140,7 (C-2)

GC-MS m/z (%): 170(M^+ , Spuren), 152($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 1), 139(5),134(3), 121(21), 119(7), 109(4), 95(7), 93(16), 91(7), 83(23), 82(10), 81(10), 79(14), 69(100), 67(20), 55(59), 53(10), 43(30), 41(91), 39(19)

GC-MS [silyliert mit BSTFA] m/z (%): 314(M^+ ,1), 271(4), 231(5), 211(63), 155(26), 147(22), 93(13), 75(31), 73(100), 69(74), 45(24), 41(59)

6,7- β -Myrcendihydrodiol: 1,4 % (157 mg; 0,9 mmol)

GC-MS m/z (%): 152(M^+ , Spuren), 137(1), 119(1), 111(1), 109(2), 94(5), 91(3), 81(8), 79(12), 71(22), 68(26), 67(20), 59(100), 55(10), 53(7), 44(10), 43(33), 41(25)

3,10-dihydro-3-Hydroxy-10-p-tosyloxy- β -Myrcen und 1,2-dihydro-2-Hydroxy-1-p-tosyloxy- β -myrcen (2.Stufe):

Zu einer Lösung aus 3,10- bzw. 1,2- β -Myrcendihydrodiol (1,0 g; 5,9 mmol) in trockenem Pyridin (5 mL) wurde bei 0°C trockenes p-Tosylchlorid (1,3 g; 6,9 mmol) zugegeben. Das Reaktionsmedium wurde nach wenigen Minuten trübte. Nach 3-stündigem Rühren erfolgte unter Eiskühlung eine Hydrolyse mit 10%-iger Salzsäure. Danach wurde die Reaktionsmischung mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit 5%-iger Salzsäure, dest. Wasser und anschließend mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4

mindestens 3h lang getrocknet. Die Produktbildung wurde dünnschichtchromatographisch mit UV-Detektion kontrolliert und das Rohprodukt in die 3.Stufe eingesetzt.

3,10- und 1,2-Epoxy- β -myrcen (3.Stufe):

Das Rohprodukt der 2.Stufe (3,10-dihydro-3-Hydroxy-10-p-tosyloxy- β -Myrcen bzw. 1,2-Dihydro-2-Hydroxy-1-p-tosyloxy- β -myrcen) wurde in trockenes Cyclohexan (15 mL) suspendiert und 12 h lang mit deaktiviertem, neutralem Aluminiumoxid (11 g) bei 35°C unter Agitation im Wasserbad im dicht verschlossenen Spitzkolben behandelt. Die Desaktivierung des Aluminiumoxids erfolgte vorher durch Trocknung und anschließende Einstellung des Aluminiumoxids auf 4 g 100 g⁻¹ Wassergehalt.

Das Produkt wurde mit Diethylether vom Aluminiumoxid eluiert, die Ether-Phase am Rotationsverdampfer fast bis zu Trockne eingengt und an Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) säulenchromatographisch mit n-Pentan/Ether (7/3; v/v) isoliert. Es resultierte jeweils eine farblose Flüssigkeit mit einem penetranten Parfum-Duft.

Ausbeuten und Charakterisierung:

1,2-Epoxy- β -myrcen: 20,1 % (180,2 mg; 1,2 mmol) [Σ 2.+3.Stufe]

¹H-NMR(CDCl₃): δ : 1,62 (3H, s, -CH₃), 1,70 (3H, s, -CH₃), 2,00 (2H, m, CH₂-CH₂-C), 2,16 (2H, m, CH-CH₂-CH₂), 2,67 (1H, dd, CH₂-O), 2,89 (1H, m, CH₂-O), 3,36 (1H, t, CH-O), 4,98 (1H, m, C=CH₂), 5,12 (1H, tm, C=CH-CH₂), 5,17 (1H, m, C=CH₂)

¹³C-NMR(CDCl₃): δ : 17,7 (-CH₃), 25,6 (-CH₃), 26,7 (CH-CH₂-CH₂), 30,8 (CH₂-CH₂-C), 47,9 (CH₂-O), 53,8 (CH-O), 112,3 (C=CH₂), 123,6 (C=CH-CH₂), 132,0 (H₃C-C=CH), 145,3 (CH₂-C=CH₂)

GC-MS m/z(%): 152(M⁺; Spur.), 134(2), 121(3), 119(16), 109(20), 93(9), 91(14), 85(22), 81(9), 79(17), 77(9), 69(100), 67(24), 55(12), 53(15), 51(6), 43(13), 41(100), 39(26)

3,10-Epoxy- β -myrcen: 24,0 % (215 mg; 1,4 mmol) [Σ 2.+3.Stufe]

¹H-NMR(CDCl₃): δ : 1,62 (3H, s, -CH₃), 1,70 (3H, s, -CH₃), 1,75 (2H, m, CH₂-CH₂-C), 2,10 (2H, q, CH-CH₂-CH₂), 2,68 (1H, d, C-CH₂-O), 2,83 (1H, d, C-CH₂-O), 5,12 (1H, tm, C=CH-CH₂), 5,22 (1H, dd, CH=CH₂), 5,36 (1H, dd, CH=CH₂), 5,78 (1H, dd, C-CH=CH₂)

¹³C-NMR(CDCl₃): δ : 17,6 (-CH₃), 23,7 (CH-CH₂-CH₂), 25,7 (-CH₃), 33,6 (CH₂-CH₂-C), 55,0 (C-CH₂-O), 58,5 (CH₂-C-CH), 116,4 (CH=CH₂), 123,5 (C-CH-CH₂), 132,1 (H₃C-C=CH), 137,5 (C-CH-CH₂)

GC-MS m/z(%): 152(M⁺; n.n.), 137(1), 121(2), 119(3), 109(7), 105(3), 96(5), 95(5), 93(11), 91(14), 83(15), 82(29), 81(19), 79(28), 77(10), 71(35), 70(14), 69(46), 68(12), 67(57), 65(7), 55(33), 54(9), 53(27), 43(37), 41(100), 39(27)

2-Ethenyl-6-methyl-5-heptenal: 3,9 % (33,7 mg; 0,2 mmol) [Σ 2.+3.Stufe]
(Nebenprodukt aus 3,10-Epoxy- β -myrcen)

¹H-NMR(CDCl₃): δ : 1,56 (3H, s, -CH₃), 1,66 (3H, d, -CH₃), 1,97 (3H, d, CH-CH₃), 2,04 (2H, q, CH-CH₂-CH₂), 2,27 (2H, t, CH₂-CH₂-C), 5,09 (1H, tm, C-CH-CH₂), 6,56 (1H, q, C-CH-CH₃), 9,76 (1H, s, C-CHO)

¹³C-NMR(CDCl₃): δ : 14,8 (CH-CH₃), 17,6 (C-CH₃cis), 23,7 (CH-CH₂-CH₂), 25,6 (C-CH₃trans), 26,8 (CH₂-CH₂-C), 123,5 (C-CH-CH₂), 132,3 (CH₃-C-CH), 144,4 (C-CH-CH₃), 150,0 (CH₂-C-CH), 195,0 (CHO)

GC-MS m/z(%): 152(M⁺; 1), 137(2), 134(1), 124(6), 109(27), 95(5), 91(4), 83(5), 81(6), 79(4), 77(4), 70(6), 69(100), 67(16), 65(3), 55(10), 53(12), 51(4), 43(6), 41(82), 39(17)

5.4.2 Synthese von 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-7-ol

2-Z-Ethyliden-6-Methyl-5-heptenal (102,6 mg; 0,7 mmol) wurde in THF (2 mL) gelöst, unter N₂-Atmosphäre bei -20°C mit 1-molarer Diisobutylaluminiumhydrid-Hexan-Lösung. (4,5 mL; 4,5 mmol) versetzt und die Reaktionsmischung noch 3h lang bei -20°C gerührt.

Anschließend wurde das Reaktionsmedium mit Diethylether (ca. 5 mL) aufgenommen und mit ges. NH₄Cl-Lösung (ca. 10 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zweimal mit dest. Wasser und zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und nach Filtration sowie Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer zur GC-FID- und GC-MS-Messung eingesetzt.

Ausbeuten und Charakterisierung:

2-Z-Ethyliden-6-Methyl-5-hepten-7-ol: 52,9 % (55,0 mg; 0,4 mmol)

¹H-NMR(CDCl₃): δ: 1,61 (3H, s, C-CH₃_{cis}), 1,62 (3H, d, CH-CH₃), 1,66 (3H, s, C-CH₃_{trans}), 2,07 (2H, m, CH-CH₂), 2,10 (2H, m, CH₂-C), 4,01 (2H, s, CH₂-O), 5,11 (1H, tm, CH₂-CH), 5,50 (1H, q, CH₃-CH)

¹³C-NMR(CDCl₃): δ: 13,0 (CH₃-CH), 17,6 (CH₃-C cis), 25,7 (CH₃-C trans), 26,8 (CH₂-CH), 27,8 (CH₂-C), 67,4 (CH₂-O), 121,6 (CH-CH₃), 124,1 (CH-CH₂), 132,0 (CH₃-C), 139,6 (CH₂-C)

GC-MS m/z(%): 154(M⁺; 1), 139(4), 136(2), 121(7), 107(7), 98(5), 93(14), 85(6), 82(9), 79(6), 70(17), 69(100), 67(22), 51(9), 53(10), 43(11), 41(83), 39(14)

5.4.3 Synthese von 4-Methyl-3-pentenylodid

Methylmagnesiumiodid (90 mL; 3 M in Diethylether gelöst) wurde in einem 500 mL-Dreihalskolben mit 180 mL mit über Molekularsieb getrocknetem Diethylether verdünnt. Cyclopropylmethylketon (25,3 mL; 250 mmol) wurde in Diethylether (20 mL) gelöst, unter Eiskühlung langsam zu der Reaktionsmischung zugegeben und anschließend über Nacht bei RT stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde der halbstarke Grignard-Komplex schrittweise zu einer auf -20°C vorgekühlten Lösung aus 100 mL konz. H₂SO₄ (98 %) und 200 mL Wasser zugegeben. Die Temperatur sollte dabei den Wert von 0°C nicht übersteigen. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung 30 min lang gerührt, wobei die Temperatur 15°C erreichen durfte.

Die obere Ether-Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 25 mL Diethylether extrahiert. Die Wasche-ther-Extrakte wurden mit der Hauptether-Phase vereinigt, mit 5 % - iger NaHSO₃-Lösung entfärbt, mit 5 % - iger NaHCO₃-Lösung neutralisiert, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt destillativ isoliert (65 °C; 10 Tr = 13,7 mbar bzw. 71 °C; 20 Tr = 27,5 mbar).

4-Trideuteromethyl-3-pentenylodid wurde entsprechend aus Trideuteromethylmagnesiumiodid synthetisiert.

Ausbeuten und Charakterisierung:

4-Methyl-3-pentenyljodid: 72,2 % (37,9 g; 180,5 mmol)

GC-MS m/z(%): 210(M⁺; 4), 182(1), 167(1), 141(2), 127(6), 83(100), 55(96), 43(15), 41(84), 39(38)

4-Trideuteromethyl-3-pentenyljodid:

GC-MS m/s(%): 213(M⁺; 3), 185(Spur.), 167(Spur.), 155(Spur.), 141(2), 127(8), 87(6), 86(100), 58(41), 58(34), 57(29), 56(31), 55(9), 46(9), 44(16), 43(30), 42(26), 41(35), 40(17), 39(20)

5.4.4 Synthese von α,α -Acariolid α -Methylthio- γ -butyrolacton (1.Stufe):

α -Brom- γ -butyrolacton (25,2 g; 150 mmol) und Dimethylsulfid (50 mL; 680 mmol) wurden 40 h lang unter Rückfluss und Schutzgasatmosphäre (N₂) gekocht. Das nach dem Abkühlen ausgefallene (CH₃)₃SBr↓ wurde abfiltriert (Faltenfilter) und der Rückstand mit Diethylether nachgewaschen. Filtrat und Waschether wurden vereinigt und unter Vakuum am Rotationsverdampfer stark eingeeengt.

Das so erhaltene Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) säulenchromatographisch isoliert und gaschromatographisch mittels GC-FID und GC-MS analysiert. Bei der SC wurde zunächst mit n-Pentan gewaschen und das Produkt anschließend mit n-Pentan/Diethylether (50/50, v/v) eluiert.

Ausbeute: 71,6 % (16,8 g; 127,3 mmol)

GC-MS m/z(%): 134(4), 133(4), 132(M⁺, 67), 117(Spur.), 86(100), 73(64), 55(22), 45(61), 41(54)

 α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -Methylthio- γ -butyrolacton (2.Stufe):

LDA-Lösung in n-Heptan/THF/Ethylbenzol (200 mL; 2 M) wurde in einem 1 L – Dreihalskolben vorgelegt und unter Schutzgasatmosphäre mit THF (120 mL) verdünnt. Eine Lösung aus α -Methylthio- γ -butyrolacton (36 g; 273 mmol) in THF (90 mL) wurde langsam in die vorgelegte LDA-Lösung unter Rühren bei -78 °C zugegeben (Methanol-Bad + fl. N₂).

Nach einer Stunde Rühren wurde eine Lösung aus 4-Methyl-3-pentenyljodid (57,3 g; 273 mmol) und HMPA (48,7 g; 273 mmol) langsam hinzugefügt, noch 3 h lang bei -78 °C weiter gerührt und unter weiterem Rühren bei RT über Nacht stehen gelassen.

Das mit Diethylether verdünnte Reaktionsmedium wurde 3 mal mit ges. NH₄Cl-Lösung geschüttelt, die resultierende wässrige NH₄Cl-Phase 3 mal mit Diethylether zurückextrahiert, die gesamte organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) aufgereinigt. Als Elutionsmittel wurde n-Pentan/Diethylether-Gemisch 1/1,12 (v/v) verwendet.

α -(4-Trideuteromethyl-3-pentenyl)- α -Methylthio- γ -butyrolacton wurde entsprechend aus 4-Trideuteromethyl-3-pentenyljodid (siehe Kapitel 5.4.2) synthetisiert.

Ausbeuten und Charakterisierung:

α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -Methylthio- γ -butyrolacton: 43 % (25,1 g; 117,4 mmol)

GC-MS m/z(%): 216(1), 214(M⁺, 13), 199(Spur.), 166(6), 151(3), 134(6), 132(100), 114(32), 69(26), 53(24), 41(82)

α -(4-Trideuteromethyl-3-pentenyl)- α -Methylthio- γ -butyrolacton:

GC-MS m/z(%): 219(1), 218(2), 217(M⁺; 10), 202(Spur.), 169(5), 154(2), 134(6), 133(10), 132(100), 114(32), 99(10), 86(19), 72(24), 53(14), 43(33), 42(25), 41(23), 40(11), 39(16)

 α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -methylsulphonyl- γ -butyrolacton (3.Stufe):

Eine wässrige Natriummetaperiodat-Lösung (14,1 g; 66,1 mmol NaIO₄ in 160 mL dest. Wasser) wurde zu einer auf 0°C vorgekühlten, methanolischen α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -methylthio- γ -butyrolacton-Lösung (13,0 g; 60,7 mmol in 150 mL Methanol) unter Rühren langsam zugegeben. Die Temperatur durfte dabei 0 °C nicht überschreiten. Das Reaktionsmedium wurde 6 h lang bei 0°C und weitere 12 h bei RT bis zur vollständigen Reaktion gerührt.

Danach wurde das Produkt 3-mal mit Diethylether extrahiert, die organische Phase nacheinander mit ges. NaHCO₃-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ mindestens 5 h lang getrocknet. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer resultierte eine ölig gelbe Flüssigkeit. Da das Produkt nicht GC-zugänglich war, wurde es ohne Charakterisierung direkt in die 4.Stufe eingesetzt.

 α,α -Acariolid (4.Stufe):

Das entstandene Produkt der 3.Stufe α -(4-Methyl-3-pentenyl)- α -methylsulfonyl- γ -butyrolacton wurde in 400 mL Toluol gelöst und 7-10 h lang unter Rückfluss gekocht. Danach wurde das Toluol am Rotationsverdampfer abgezogen und das Produkt mittels SC aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,063-0,200; Elutionsmittel: n-Pentan/Diethylether; 1/1,12; v/v). Nach dem Einengen der entsprechenden Fraktion am Rotationsverdampfer resultierte α,α -Acariolid als gelb bis bräunlich gefärbte, ölige Substanz.

Ausbeute (3.+4.Stufe): 57,2% (5,76 g; 34,7 mmol)

Charakterisierung: KI 2187 (CW 20M)

 α,α -Acariolid:

GC-MS m/z (%): 166(M⁺; 21), 121(5), 111(6), 105(5), 99(6), 98(93), 91(6), 79(6), 70(8), 69(100), 67(8), 53(8), 41(43), 39(10)

Trideutero- α,α -acariolid:

GC-MS m/z (%): 169(M⁺; 10), 124(3), 111(2), 105(2), 99(34), 98(48), 79(4), 73(5), 72(100), 71(8), 70(7), 69(7), 55(4), 53(5), 44(11), 43(30), 42(25), 41(13), 40(6), 39(8)

5.4.5 Synthese von (Trideutero-) α -Z-Acaridiol und α,α -Acarilactol

α,α -Acarolid (5,0 g; 30 mmol) wurde in THF (90 mL) gelöst, unter N_2 -Atmosphäre bei $-20^\circ C$ mit Diisobutylaluminiumhydrid-Hexan-Lösung (45 mL; 45 mmol; 1 M) versetzt und die Reaktionsmischung noch 3 h lang bei $-20^\circ C$ gerührt.

Anschließend wurde das Reaktionsmedium mit Diethylether (ca. 20 mL) aufgenommen und mit ges. NH_4Cl -Lösung (ca. 50 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde 2 mal mit dest. Wasser und 2 mal mit ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und nach Filtration sowie Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer zur GC-FID- und GC-MS-Messung eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel 60 mit n-Pentan/Diethylether-Azeotropgemisch wurden α -Z-Acaridiol und α,α -Acarilactol als Reinsubstanzen isoliert.

Ausbeuten und Charakterisierung:

α -Z-Acaridiol: KI 2555 (CW); 53,0 % (2,7 g; 15,9 mmol)

GC-MS m/z(%): 170(M^+ , Spur.), 152($M^+ - H_2O$, 4), 150(7), 139(4), 137(4), 134(3), 122(6), 121(13), 119(10), 109(14), 107(8), 95(11), 93(24), 91(21), 83(31), 82(32), 81(29), 79(22), 69(100), 67(37), 55(30), 53(22), 41(94)

GC-MS [silyliert mit BSTFA] m/z(%): 314(M^+ , 1), 271(1), 245(2), 211(52), 181(44), 155(34), 148(34), 134(15), 121(14), 119(24), 103(10), 93(16), 75(15), 73(100), 69(29), 45(14), 41(34)

Trideutero- α -Z-acaridiol:

GC-MS m/z(%): 173(M^+ ; Spur.), 155($M^+ - H_2O$; 5), 142(6), 137(4), 125(9), 124(18), 122(7), 119(6), 109(11), 98(8), 96(10), 93(10), 91(7), 88(7), 85(11), 84(10), 83(19), 81(15), 79(14), 77(5), 73(11), 72(100), 71(13), 70(13), 69(19), 67(10), 55(22), 53(9), 46(6), 44(13), 43(36), 42(27), 41(23), 39(11)

α,α -Acarilactol: KI 2157 (CW); 27,7 % (1,4 g; 8,3 mmol)

MS m/z (%): 168(Spuren), 153($M^+ - CH_3$, 3), 150($M^+ - H_2O$, 17), 135(16), 107(11), 99(34), 98(8), 91(6), 86(7), 83(15), 82(30), 81(36), 79(11), 70(17), 69(100), 67(17), 55(12), 53(18), 41(79), 39(17)

GC-MS [silyliert mit BSTFA] m/z(%): 240(M^+ , 5), 239(9), 225(17), 197(2), 171(29), 150(53), 135(27), 107(24), 94(19), 82(28), 81(37), 79(18), 75(100), 73(12), 69(61), 53(23), 47(17), 45(27), 41(73), 39(19)

5.4.6 Synthese von Perillen

Die Herstellung des Perillens erfolgte nach derselben Vorschrift wie für α,α -Acarilactol mit dem Unterschied, dass bei der Aufarbeitung anstelle der ges. NH_4Cl -Lösung 10%-ige Schwefelsäure verwendet wurde. Die Ausbeute an Perillen entsprach hierbei derjenigen des α,α -Acarilactols, da dieses vollständig in Perillen überführt wurde.

Charakterisierung von Perillen: KI 1400 (CW)

1H -NMR($CDCl_3$): δ : 1,64 (3H, s, $-CH_3$ trans), 1,74 (3H, d, $-CH_3$ cis), 2,28 (2H, q, $CH-CH_2-CH_2$), 2,48 (2H, t, CH_2-CH_2-C), 5,21 (1H, tm, $CH_2-CH=C$), 6,31 (1H, m, $C-CH-CH$), 7,24 (1H, m, $C-CH-O$), 7,37 (1H, t, $CH-CH-O$)

^{13}C -NMR($CDCl_3$): 17,6 ($-CH_3$ cis), 25,0 ($-CH_3$ trans), 25,6 (CH_2-CH_2-C), 28,5 ($CH-CH_2-CH_2$), 111,0 ($C-CH-CH$), 123,8 (CH_2-C-CH), 124,9 ($C=CH-CH_2$), 132,0 ($H_3C-C=CH$), 138,7 ($C=CH-O$), 142,5 ($CH-CH-O$)

GC-MS m/z(%): 150(M⁺, 30), 135(M⁺-CH₃, 7), 94(7), 91(3), 82(24), 81(79), 79(4), 70(4), 69(100), 67(6), 53(21), 51(6), 41(65), 39(12)

5.4.7 Synthese von α,β -Acariolid:

Zu einer Lösung aus α -(Z)-Acaridiol (580,5 mg; 3,41 mmol) in CH₂Cl₂ (95 mL) wurden unter Rühren bei RT in mehreren Portionen Pyridiniumdichromat (16,4 g; 43,8 mmol; PDC) zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde 64 h lang (3 Nächte) bei RT gerührt.

Die feste Phase wurde anschließend abfiltriert, das Filtrat auf eine Florisil-Säule gegeben und das Produkt mit Diethylether eluiert. Nachdem das Eluat am Rotationsverdampfer eingengt wurde, erfolgte eine Aufreinigung des Rohprodukts an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60; 0,064-0,200 mm). Als Elutionsmittel diente n-Pentan/Diethylether-Gemisch (1/1,12; v/v). Es resultierte eine gelbe, ölige Flüssigkeit.

Ausbeuten und Charakterisierung:

α,α -Acariolid: KI 2187 (CW); 15,8 % (89,5 mg; 0,54 mmol)

GC-MS m/z(%): 166(M⁺; 21), 121(5), 111(6), 105(5), 99(6), 98(93), 91(6), 79(6), 70(8), 69(100), 67(8), 53(8), 41(43), 39(10)

α,β -Acariolid: KI 2358 (CW); Spuren

GC-MS m/z(%): 166(M⁺; 3), 138(5), 122(5), 109(6), 111(5), 98(22), 97(9), 96(5), 91(5), 70(7), 69(100), 67(11), 55(5), 53(11), 41(92), 39(22)

5.4.8 Synthese von Trideutero- β -Myrcen

Trideuterolinalool (1.Stufe):

Zu einer auf -70°C (Trockeneis) vorgekühlten Lösung aus 4-Trideuteromethyl-3-pentenyljodid (18,5 g; 117,8 mmol) und Diethylether (73,6 mL) wurden unter Rühren und Kühlung (Kältebad: -70°C) n-Butyllithium (88,7 mL; 141,9 mmol; 1,6 M in n-Hexan) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde noch 1 h bei -70°C und 2 h bei 0°C gerührt. Nach erneuter Abkühlung auf -70°C wurde Methylvinylketon-Lösung (8,25 g; 117,8 mmol) in Diethylether (100 mL) langsam zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT weitergerührt.

Am nächsten Tag wurde das Reaktionsmedium in eine auf -20°C vorgekühlte, ges. NH₄Cl-Lösung (200 mL) gegeben und 1 h gerührt.

Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase 4-mal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten Ether-Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel 60 und mittels Vakuumdestillation des Nebenprodukts aufgereinigt.

Ausbeute und Charakterisierung:

E-/Z-Trideuterolinalool: 13 % (2,4 g; 15,4 mmol)

GC-MS m/z(%): 157(M⁺, Spur.), 142(1), 139(2), 124(4), 121(3), 93 (44), 80 (22), 72(40), 71(65), 70(8), 58(18), 55(19), 43(100), 41(34)

Trideutero-β-Myrcen (2.Stufe):

Trideuterolinalool (429 mg; 2,7 mmol) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und unter N₂-Atmosphäre bei RT zu einer getrockneten Burgess-Reagenz-THF-Lösung (2,0 g; 8,2 mmol in 10 mL THF) zugetropft. Die Trocknung erfolgte durch Zugabe des festen Calciumhydrids (106 mg), stündiger Rührung bei RT und anschließender Filtration. Nach Trideuterolinalool-Zugabe stieg die Temperatur auf +34°C. Danach wurde noch 60min lang bei 50°C gerührt. Das Reaktionsmedium wurde anschließend auf 0°C gekühlt und mit Eiswasser (ca. 15 mL) versetzt und anschließend 3 mal mit n-Pentan (je 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit ges. NaCl-Lösung (je 20mL) gewaschen und über NaSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels klassischer SC an Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) mit n-Pentan als Elutionsmittel aufgereinigt. Es resultierte ein 5-Komponentengemisch bestehend aus Trideutero-β-myrcen, E- und Z-Trideuteroocimen, R/S-Limonen und 1-Methyl-4-(1-trideuteromethylethyliden)-cyclohexen (Strukturformeln siehe Abb. 2.44 in Kapitel 2.3.1).

Ausbeuten und MS-Daten:

Trideutero-β-myrcen: 8,4 % (31,9 mg; 229 μmol)

GC-MS m/z(%): 139(M⁺; 2), 124(2), 121(2), 110(2), 94(11), 93(100), 92(12), 91(26), 80(13), 79(20), 77(18), 72(88), 55(9), 53(15), 44(30), 43(77), 42(63), 41(52), 39(29)

R-/S-Dideutero-Limonen: 6,8 % (25,6 mg; 185 μmol)

GC-MS m/z(%): 139 (M⁺; 19), 124(15), 121(11), 110(24), 97(28), 96(34), 94(30), 93(91), 92(45), 91(31), 84(9), 83(10), 82(12), 81(20), 80(24), 79(65), 78(15), 77(35), 71(84), 70(69), 69(32), 68(100), 67(94), 65(15), 58(6), 56(11), 55(30), 54(16), 53(51), 51(12), 44(20), 43(22), 42(26), 41(65), 40(31), 39(50)

Trideutero-Z-ocimen: 3,7 % (14,0 mg; 101 μmol)

GC-MS m/z(%): 139(M⁺; 1), 124(6), 121(4), 108(7), 105(10), 96(11), 94(20), 93(100), 92(52), 91(44), 84(2), 82(6), 81(11), 80(29), 79(43), 78(13), 77(35), 67(10), 65(10), 54(6), 56(6), 55(13), 53(21), 51(8), 46(16), 43(23), 41(37), 39(30)

Trideutero-E-ocimen: 7,3 % (27,7 mg; 199 μmol)

GC-MS m/z(%): 139(M⁺; 3), 124(8), 121(6), 110(4), 108(9), 105(12), 96(15), 94(24), 93(100), 85(37), 91(48), 81(16), 80(59), 79(54), 78(15), 77(40), 68(8), 67(12), 65(13), 54(8), 56(9), 55(18), 53(29), 51(11), 46(22), 43(32), 41(51), 39(41)

1-Methyl-4-(1-trideuteromethylethyliden)-cyclohexen: 3,1 % (11,8 mg; 85 μmol)

GC-MS m/z(%): 139(M⁺; 64), 124(49), 121(39), 110(16), 108(15), 105(17), 96(26), 94(33), 93(100), 92(27), 91(56), 82(9), 81(16), 80(25), 79(53), 78(21), 77(47), 70(9), 67(14), 65(13), 58(6), 56(10), 55(17), 53(25), 51(11), 46(27), 43(30), 41(43), 39(35)

5.4.9 Synthese von 6,7-Epoxy- β -myrcen und 6,7-Epoxy-Z-ocimen

m-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) [2,89 g (16,8 mmol) entspricht 4,18 g Rohpräparat v. Fluka] wurde in CH_2Cl_2 (9mL) gelöst und bei -5°C (MeOH-Kältebad) vorsichtig mit β -Myrcen (2,28 g; 16,8 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL) versetzt, so dass die Temperatur keine 0°C überschritt. Die Reaktionsmischung wurde 5 min bei dieser Temperatur gehalten und das Produkt anschließend einer Aufreinigung unterworfen.

Es wurde nacheinander mit 10 %-iger Natronlauge, mit dest. Wasser und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, von Lösungsmittel durch Verdampfung am Rotationsverdampfer befreit und am Kieselgel 60 [0.063-0.200; Aktivitätsstufe: 4] durch fraktionierte Elution [n-Pentan//n-Pentan/Ether(7/3; v/v)] aufgereinigt. Entsprechend wurde Z-Ocimen (0,86 g; 6,2 mmol) epoxidiert.

Ausbeuten und Charakterisierung:

6,7-Epoxy- β -myrcen: 44,3 % (1,1 g)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ : 1,24 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1,29 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1,72 (2H, m, $-\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 2,30 (1H, qn, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=}$), 2,42 (1H, qn, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=}$), 2,75 (1H, t, $-\text{CH}_2\text{-CH-C-}$), 5,01 (1H, s, $-\text{C=CH}_2$), 5,04 (1H, s, $-\text{C=CH}_2$), 5,07 (1H, d, $-\text{CH=CH}_2$), 5,23 (1H, d, $-\text{CH=CH}_2$), 6,37 (1H, dd, $-\text{C-CH-CH}_2$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ : 18,7 ($-\text{CH}_3$), 24,8 ($-\text{CH}_3$), 27,5 ($-\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 28,1 ($-\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 58,4 (Ring $-\text{C-}$), 64,0 (Ring $-\text{CH-}$), 113,4 ($-\text{C=CH}_2$), 116,1 ($-\text{CH=CH}_2$), 138,5 ($-\text{CH=CH}_2$), 145,4 ($-\text{C=CH}_2$)

GC-MS m/z(%): 152(M^+ ; Spuren), 137($\text{M}^+\text{-CH}_3$; 1), 119(2), 109(7), 93(16), 91(16), 85(19), 81(21), 79(100), 77(26), 71(59), 67(38), 59(67), 57(17), 53(20), 43(49), 41(62), 39(35)

6,7-Epoxy-Z-ocimen: 26,5 % (250 mg)

GC-MS m/z(%): 152(M^+ ; Spur.), 137($\text{M}^+\text{-CH}_3$; 1), 134($\text{M}^+\text{-H}_2\text{O}$; 1), 119(1), 109(3), 93(12), 91(13), 81(51), 79(100), 77(29), 71(12), 67(9), 65(6), 59(3), 55(6), 53(16), 43(21), 41(25), 39(17)

5.5 Derivatisierungen

5.5.8 Silylierung für die Gaschromatographie

Zur Silylierung wurden 80 μL der im n-Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v)-Lösungsmittelgemisch gelösten Probe mit 20 μL BSTFA (bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid) versetzt. Die Derivatisierung erfolgte über Nacht bei RT. Die Probe wurde anschließend mittels GC-FID und GC-MS an unpolarer DB5-Kapillarsäule unter solvent delay von 10min analysiert.

5.6 Chromatographie

5.6.1 Klassische Säulenchromatographie (SC) an Kieselgel

Kieselgel 60 (Merck; Korngröße: 0,063-0,200mm) wurde mit n-Pentan aufgeschlämmt und die halb feste Masse in eine Glassäule mit Fritte (Por. 2) überführt. Nach Aufgabe der Probelösung in n-Pentan wurden die zu isolierenden Komponenten durch Variation der Lösungsmittelzusammensetzung unter Verwendung eines manuellen Fraktionssammlers nacheinander eluiert. Die Säule wurde anschließend durch Spülung mit Methanol regeneriert. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel 60 mit n-Pentan/Ether (1/1,12; v/v) als Laufmittel aufgetrennt, mit konz. H₂SO₄ besprüht und im Trockenschrank bei 100°C zwecks Sichtbarmachung 10min gelagert.

5.6.2 Kapillargaschromatographie (HRGC)

5.6.2.1 HRGC-FID mit on-column-Injektion und polarer Trennsäule für Transformationsextrakte und Syntheseprodukte

Gerät:	Trace GC 2000
Injektor:	on column, 40°C
Trennsäule:	ZB-Wax (Phenomenex [®]), 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 250°C
Trärgas:	H ₂ ; 50 kPa
Detektorgase:	H ₂ : 35 kPa; Luft: 350 kPa
Auswerteeinheit:	Chrom Card (CE instruments) version 1.19
Temperaturprogramme:	Aroma-Programm: 40°C; 3 min // 3°C·min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10 min Synthese-Programm: 40°C; 2 min // 10°C·min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10min

5.6.2.2 HRGC-FID mit on-column-Injektion und unpolarer Trennsäule für silylierte Proben und Syntheseprodukte

Gerät:	Fisons GC 8000 Series
Injektor:	on column, 40°C
Vorsäule:	FS-CW deaktiviert, 3 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke
Trennsäule:	DB5, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 250°C
Trägergas:	H ₂ ; 50 kPa
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Auswerteeinheit:	Chrom Card (CE instruments) version 1.19
Temperaturprogramme:	Aroma-Programm: 40°C; 3 min // 3°C·min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10 min Synthese-Programm: 40°C; 2 min // 10°C·min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10 min

5.6.2.3 HRGC-FID mit on-column-Injektion zur chiralen Trennung

Gerät:	Siemens Sichromat (Doppelofen)
Injektor:	PTV / 50°C; 0,5 min // 150°C·min ⁻¹ ⇒ 230°C // 1min
Trennsäule (linker Ofen):	CW 20M, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke (Macheray-Nagel)
chirale Säule (rechter Ofen):	Macheray-Nagel Hydrodex β-3P (25 m × 0.25 mm ID,
Trennphase:	Heptakis-(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin verdünnt mit OV-1701
Detektoren:	FID, 250°C
Trägergas:	H ₂ ; 50 kPa
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Auswerteeinheit:	Chromatopac C-R3A Integratoren (Shimadzu)
Temperaturprogramm:	linker Ofen: 50°C; 3 min // 5°C min ⁻¹ ⇒ 230°C // 10 min Rechter Ofen: 50°C; 3 min // 5°C min ⁻¹ ⇒ 100°C; 20 min // 1°C min ⁻¹ ⇒ 220°C

5.6.2.4 HRGC-O und –FID mit on-column-Injektion und olfaktorischer Detektion

Gerät:	Satochrom (Sato)
Injektor:	cold on column, 40°C
Vorsäule:	FS-CW deaktiviert, 3 m × 0.32 mm ID
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke
Detektor:	FID, 250°C; Sniff-Port, 220°C
Trägergas:	H ₂ ; 50 kPa
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Auswerteeinheit:	Chrom Card (CE Instruments) version 1.19
Temperaturprogramm:	40°C; 3 min // 3°C min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10 min

5.6.2.5 HRGC-MS mit on-column-Injektion und Massenspektrometer

GC1:

Gerät:	GC 8000 (Fisons)
Injektor:	cold on column, 40°C
Trennsäule:	ZB-Wax; 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm Filmdicke (Phenomenex®)
Detektor(MS):	MD 800 (Fisons)
Trägergas:	He; 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle: 200°C / Interface: 230°C / Quadrupol: 100°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI); 70 eV
Massenbereich:	m/z 33-300
Auswerteeinheit:	X-calibur; Spektrenbibliothek Wiley, NBS54K (NIST), LMC
Temperaturprogramm:	40°C; 3 min // 3°C min ⁻¹ ⇒ 250°C // 10 min

GC2:

Gerät:	HP 5890 (Hawlett-Packard)
Injektor:	cold on column, 40°C
Trennsäule:	BC SE 54; 30 m × 0.32 mm ID × 0.4 µm Filmdicke (Leupold)
Detektor:	Mass Spektrometer 5989 A (Hawlett-Packard)
Trägergas:	He; 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle: 250°C / Interface: 250°C / Quadrupol: 100°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI); 70 eV
Massenbereich:	m/z 33-300
Auswerteeinheit:	MS HP-UX Chem Station, B06.01 Software
Temperaturprogramm:	Synthese2-Programm: 40°C; 2 min // 10°C min ⁻¹ ⇒ 280°C // 10 min

5.6.2.6 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI=100 \cdot N+100 \cdot n \cdot [(\log t^*_A - \log t^*_N) / (\log t^*_{N+n} - \log t^*_N)]$$

- mit N: Anzahl der C-Atome des Alkans, das zeitlich vor dem Analyt eluiert
n: Differenz der Anzahl der C-Atome zwischen dem vorderen und hinteren Alkan bezogen auf den Analyt
A: Analyt
t^{*}: relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t₀

Die Alkanreihe enthielt geradzahlige Alkane von C₁₂ bis C₃₀

5.6.2.7 Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee)

Der Enantiomerenüberschuss wurde wie folgt berechnet:

$$ee[\%]=100[(A_1-A_2)/(A_1+A_2)]$$

- mit A₁: Peakfläche des überschüssigen Enantiomers
A₂: Peakfläche des unterschüssigen Enantiomers

5.6.2.8 NMR-Spektroskopie

NMR1:

Gerät:	Bruker WP-400
Lösungsmittel:	CDCl ₃
¹ H-NMR:	400 MHz bzw. 500 MHz
¹³ C-NMR:	50 MHz bzw. 125 MHz
Messverfahren:	¹ H, ¹³ C, ¹ H, ¹ H-COSY, ¹ H, ¹³ C-HMQC, ¹ H, ¹³ C-HSQC, ¹ H, ¹³ C-TMBC (<i>long-range</i>)

5.7 Entsorgungshinweise

-Lösungsmittel und Chemikalien:

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch Aufarbeitung und destillative Wiedergewinnung auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenerter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Das in Synthesen verwendete und wieder gewonnene Dichlormethan wurde destillativ aufgereinigt und in Wiederholungsversuchen eingesetzt.

Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel

Alle Lösungsmittelabfälle wurden der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

Saure und basische flüssige Abfälle wurden vor der Entsorgung neutralisiert.

Schwermetallabfälle wurden getrennt gesammelt.

6 Literaturverzeichnis

Adams R.P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy; Allured Publishing Corporation (1995)

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

Akiyama R., Sato Y., Kajiwara S., Shishido K.; Cloning and expression of cytochrome P450 genes, belonging to a new P450 family, of the basidiomycete *Lentinula edodes*; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(10), 2183-2188 (2002)

Ansari S. H., Ali M., Porchezian E., Negueruela A. V., Perez M. J.; Volatile Constituents of Mango (*Mangifera indica* Linn.) Fruits – Cultivar « Totapari »; *Indian J. Nat. Prod.*, 15(2), 18-22 (

Antorini M.; Structural and functional analysis of a laccase from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*; Dissertation an der Universität Zürich; 2000

Arand M., Oesch F.; Lehrbuch der Toxikologie (Hrs. Marquardt, Schäfer): Fremdstoffmetabolismus; 89-116 (2004)

Aromenverordnung i.d.F. vom 22.12.1981, zuletzt geändert durch Verordnung zur Änderung der Aromenverordnung und zur Aufhebung lebensmittelrechtlicher Vorschriften für Teigwaren vom 18.06.2001

Barma D.K., Kundu A., Baati R., Mioskowski C., Falck J.R.; A convenient preparation of 3-substituted furans: synthesis of perillene and dendrolasin; *Organic Letters*, 4(8), 1387-1389 (2002)

Baser K. H. C., Demirci B., Donmez A. A.; Composition of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britton from Turkey; *Flavour Fragrance J.*, 18(2), 122-123 (2003)

van Beek T. A., Posthumus M. A., Lelyveld G. P., Phiet H. V., Yen B. T.; Investigation of the Essential Oil of Vietnamese Ginger; *Phytochemistry*, 26(11), 3005-3010 (1987)

Barrero A. F., Sanchez J. F., Altarejos J., Zafra M. J.; *Phytochemistry*, 31(5), 1727-1730 (1992)

Baser K. H., Demirci B., Dönmez A. A.; Composition of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britton from Turkey; *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 122-123 (2003)

Beackström P., Okecha N., De Silva N., Wijekoon D., Norin T.; Photooxidation with Simultaneous Reduction of Hydroperoxides with Tetrabutylammonium Borohydride. Synthesis of Perillenal from Myrcene; *Acta Chemica Scandinavica*, B36, 31-36 (1982)

Bedrossian A., Beauchamp P. E., Dev V., Kwan S., Munevar-Mendoza E., Okoreeh E. K.; Composition of the Essential Oil of *Lomatium torreyi*; *J. Essent. Oil Res.*, 10, 473-477 (1998)

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P.; Lehrbuch der Lebensmittelchemie; 5. Auflage; Springer-Verlag Berlin (2001)

Berger R. G., Aroma Biotechnology; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1995)

Berger R. G., Krings, U., Zorn, H.; *Food Flavour Technology*, Taylor, A. J. (ED.) Sheffield Acad. Press, Sheffield; 60-104 (2001)

Berger, R. G., Zorn, H.; *Advances in Fungal Biotechnology*, Lange L., Tkasz, J. (Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 341-358 (2004)

- Bernardi R., Cardani C., Chiringhelli D., Selva A., Baggini A., Pavan M.; On the components of secretion of mandibular glands of the ant *Lasius (Dendrolasius) fuliginosus*; *Tetrahedron Lett.* 3893-3896 (1967)
- Biernacki W.; A Facile Synthesis of Methyl (\pm)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyldodeca-2,6-dienoate, the Insect Juvenile Hormone III; *Polish Journal of Chemistry*, 54, 777-780 (1980)
- Bouws H., Berger R. G., Zorn H.; Cytochrom P450-katalysierte Biosynthese von Aromastoffen; *Lebensmittelchemie*, 60, 99 (2006)
- Brauer B.; Biotechnologische Veredlung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen; Dissertation an der Universität Hannover (2004)
- Brückner R.; Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden; 3., aktualisierte und überarbeitete Auflage; 2004
- Burgess E. M., Penton H. R., Taylor E. A.; Thermal Reactions of Alkyl N-Carbomethoxysulfamate Esters; *J. Org. Chem.*, 38(1), 26-31 (1973)
- Busmann D.; Oxofunktionalisierung und Katabolismus von Terpen-Kohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten; Dissertation; Universität Hannover (1994)
- Busmann, D., Berger R. G.; Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes; *J. Biotechnol.*, 37, 39-43 (1994)
- Byers J. A.; Male-specific conversion of the host plant compound, -myrcene, to the pheromone, (+)-ipsdienol, in the bark beetle, *Dendroctonus brevicornis*; *J. Chem. Ecol.*, 8(2), 363-371 (1982)
- Cabral J.M.S.; Biotransformations. In Ratledge C., Kristiansen B.; *Basic Biotechnology*, 471-501 (2001), Cambridge University Press
- Call H.P., Mücke J.; History, Overview and application of mediated lignolytic systems especially laccase-mediator-systems; *J. of Biotechnology*, 53, 163-202 (1997)
- Coll J. C., Wright A. D.; Tropical Marine Algae. VI* New monoterpenes from several collections of *Chondrococcus hornemannii* (Rhodophyta, Gigartinales, Rizophyllidaceae); *Aust. J. Chem.*, 42, 1983-1993 (1989)
- Curtis R.F., Hobson-Frohock A., Fenwick G.R., Berreen J.M.; Volatile components from the mite *Acarus siro* L. I food; *J. Stored Prod. Res.*, 17, 197-203 (1981)
- Dellweg H.; Biotechnologie; VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (1987)
- Demyttenaere J. C. R.; *Studies in Natural Products Chemistry*, 25, Rahman A. (ED.) Elsevier Science B. V., Amsterdam, 125-178 (2001)
- Devi J. R., Bhattacharyya P. K.; *Indian. J. Biochem. Biophys.*, 14, 288-191 (1977)
- Dung N. X., Luu H. V., Khoi T. T., Leclercq P. A.; GC and GC/MS Analysis of the leaf Oil of *Cleistocalyx operculatus* Roxb Merr. Et Perry (Syn. *Eugenia operculata* Roxb.; *Syzygium mervosum* DC.); *J. Essent. Oil Res.*, 6, 661-662 (1994)
- Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F.; Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway; *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 1401-1426 (2004)
- Faber K., Biotransformations in Organic Chemistry; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2004)
- Faucher V., Arreguy-San Miguel B., Taran M., Delmond B.; Epoxides from Myrcene: new versatile tools for the synthesis of functionalized acyclic terpenoids; *Synthetic Communications*, 29(21), 3673-3684 (1999)

- Fauchet V., Arreguy-San Miguel B., Taran M., Delmond B.; Epoxides from Myrcene: selective obtention; *Synthetic Communications*, 23(18), 2503-2510 (1993)
- Feger W., Brandauer H., Ziegler H.; Analytical investigation of Murcott (honey) tangerine peel oil; *J. Essent. Oil Res.*, 15(3), 143-147 (2003)
- Fish R. H., Browne L. E., Bergot B. J.; Pheromone Biosynthetic Pathways: Conversion of Ipsdienone to (-)-Ipsdienol, Mechanism for Enantioselective Reduction in the Male Bark Beetle, *Ips paraconflusus*; *Journal of Chemical Ecology*, 10(7), 1057-1064 (1984)
- Fish R. H., Browne L. E., Wood D. L., Hendry L. B.; Pheromone Biosynthetic Pathways: Conversions of Deuterium Labelled Ipsdienol with Sexual and Enantioselectivity in *Ips paraconflusus* Lanier; *Tetrahedron Letters*, 17, 1465-1468 (1979)
- Francke W., Schulz S.; Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 8; Mori K. (ED.) Elsevier Science B. V., Amsterdam, 197-261 (1999)
- Hayward S., Muncey R. J., James A. E., Halsall C. J., Hewitt C. N.; Monoterpenemissions from soil in a sitka spruce forest; *Atmos. Environ.*, 35(24), 4081-4087 (2001)
- Heldt H.; Pflanzenbiochemie; 3. Auflage; 2003
- Herrmann J. L., Schlessinger R. H., Method for Alkylating Lactones; *J. C. S. Chem. Comm.*, Com. 962, 711-712 (1973)
- Hesse M., Meier H., Zeeh B.; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; 5. überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York (1995)
- Holland H.L.; Organic synthesis with oxidative enzymes; VCH Verlagsgesellschaft Weinheim (1992)
- Honda G., Yuba A., Nishizawa A., Tabata M.; Genetic Control of Geranial Formation in *Perilla frutescens*; *Biochemical Genetics*, 32(5/6), 155-159 (1994)
- Ichinose H., Wariishi H., Tanaka H.; Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 658-664 (2002)
- Ishida T., Asakawa Y., Takemoto T., Aratani T.; Terpenoids Biotransformation in Mammals III: Biotransformation of α -Pinene, β -Pinene, Pinane, 3-Carene, Carane, Myrcene and p-Cymene in Rabbits; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(4) 406-415 (1981)
- Ito M., Toyoda M., Nakano Y., Kiuchi F., Honda G.; Chemical Composition of Essential Oil from *Perilla setoyensis*, A New Species of Wild *Perilla* in Japan; *J. Essent. Oil Res.*, 11, 669-672 (1999)
- Kaspera R.; Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse; Dissertation an der Universität Hannover (2004)
- Kikuchi T., Kadota S., Tanaka K., Nishi A.; Odorous Metabolites of an Acellular Slime Mold, *Physarum polycephalum* Schw., and a Basidiomycete, *Phallus Impudicus* Pers.; *Chem. Pharm. Bull.*, 32(2), 797-800 (1984)
- Kirimer N., Koca F., Baser K. H. C.; Composition of the Essential Oils of Two Subspecies of *Sideritis germanicopolitana* Bornm.; *J. Essent. Oil Res.*, 4, 533-534 (1992)
- Kite G. C., Leon C.; Volatile Compounds emitted from Flowers and Leaves of *Brugmansia* × *Candida* (Solanaceae); *Phytochemistry*, 40(4), 1093-1095 (1995)
- Klusener P. A. A., Tip L., Brandsma L.; On the direct metalation of isoprene; *Tetrahedron*, 47, 2041-2064 (1991)

- Kondo H., Yamaguchi S.; Volatile componets of *Perilla citriodora* MAKINO; *Ykugaku Zasshi*, 446, 263-275 (1919) (Japanisch)
- Kramp W., Bohlmann F.; Synthese natürlich vorkommender Geranylgeraniol-Derivate; *Liebigs Ann. Chem.*, 226-233 (1986)
- Krings U., Hinz M., Berger R. G.; Degradation of [²H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*; *J. Biotechnol.*, 51(2), 123-129 (1996)
- Krings U., Pilawa S., Theobald C., Berger R. G., Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* — elucidation of metabolic pathways using [5-²H]-ferulic acid; *J. Biotechnol.*, 85(3), 305-314 (2001)
- Kuwahara Y., Leal W.S., Suzuki T., Maeda M., Masutani T.; Antifungal activity of *Caloglyphus polyphyllae* sex pheromone and other mite exudates; *Naturwissenschaften*, 76(12), 578-579 (1989)
- Leal W. S., Kuwahara Y., Nakano Y., Nakao H., Suzuki T.; 2(E)-(4-Methyl-3-pentenyl)-butenedial, α -Acaridial, a Novel Monoterpene from the Acarid Mite *Tyrophagus perniciosus* (Acarina, Acaridae); *Agric. Biol. Chem.*, 53(4), 1193-1196 (1989)
- Leal W. S., Kuwahara Y., Suzuki T., Nakao H.; Chemical Taxonomy of Economically Important *Tyrophagus* Mites (Acariformes, Acaridae); *Agric. Biol. Chem.*, 53(12), 3279-3284 (1989)
- Longhurst C., Baker R., Howse P.E.; Chemical crypsis in predatory ants; *Experientia*, 35, 870-872 (1979)
- Ly N. D., Schlosser M.; Eine einfache Synthese von Rosenfuran und verwandten Verbindungen; *Helvetica Chimica Acta*, 60(6), 2085-2088 (1977)
- Madyastha K. M., Bhattacharyya P. K., Vaidyanathan C. S.; *Can. J. Microbiol.*, 23, 230-239 (1977)
- Majetich G., Wang Y., Li Y., Vohs J. K., Robinson G. H.; A Synthesis of (+)-Salvadione-A; *Organic Letters*, 5(21), 3847-3850 (2003)
- Mathela C. S., Melkani A. B., Bisht J. C., Pant A. K., Bestmann H. J., Erler J., Kobold U., Rauscher J., Vostrowsky O.; Chemical Varieties of Essential Oils from *Elsholtzia polystachya* from Two Different Locations in India; *Planta Med.*, 58, 376-379 (1991)
- Mathela C. S., Shah G. C., Melkani A. B., Joshi P.; 3-substituted-furanyl Compounds of *Perilla ocimoides*; *J. Indian Chem. Soc.*, 66, 183-184 (1989)
- Miller R. L., Bills D. D., Buttery R. G.; Volatile Components from Bartlett and Bradford Pear and Bradford Pear Leaves; *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1476-1479 (1989)
- Mizoguchi A., Mori N., Nishida R., Kuwahara Y. ; α -Acaridial aFemale Sex Pheromone from an Alarm Pheromone Emitting Mite *Rhizoglyphus robini*; *Journal of Chemical Ecology*, 29(7), 1681-1690 (2003)
- Miyazawa M., Murata T.; Biotransformation of β -Myrcene by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*); *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 123-125 (2000)
- Moiseenkov A. M., Veselovskii V. V., Makarova Z. G., Zhulin V. M.; Some Properties of the Adduct of Benzenesulfinyl Chloride with Myrcene; *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim., Bull. Acad. Sci. USSR. Div. Chem. Sci.*, 1057-1059 (1987)
- Nishiyama H., Sasaki M., Itoh K.; Efficient Transformation of (Z)-2-Butene-1,4-diols to substituted Furans with Pyridinium Chlorochromate (PCC); *Chemistry Letters*, 1363-1366 (1981)
- Nishizawa A., Honda G., Tabata M.; Genetic Control of Perillene Accumulation in *Perilla frutescens*; *Phytochemistry*, 29(9), 2873-2875 (1990)

Njoroge S. M., Koaze H., Karanja P. N., Sawamura M.; Volatile Constituents of Redblush Grapefruit (*Citrus paradise*) and Pummelo (*Citrus grandis*) Peel Essential Oils from Kenya; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9790-9794 (2005)

Oddou J., Stentelaire C., Lesage-Meessen L., Asther M., Colonna Ceccaldi B.; Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 1-6 (1999)

Ohloff G.; *Scent and Fragrances. The Fascination of Odors and their Chemical Perspectives*, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1994)

Osborne S.J., Leaver J., Turner M.K.; Membrane concentrations of primary alcohols which inhibit progesterone 11 α -hydroxylase in *Rhizopus nigricans*. In *Biocatalysis in non conventional media*, ed. Tramper J., Vermue M.H., Beefting H.H., von Stockar U.; Elsevier, London; 31-36

Özek T., Baser K. H. C.; The Essential Oil of *Sideritis athoa* Papanicolaou et Kokkini; *J. Essent. Oil Res.*, 5, 669-670 (1993)

Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P.; Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures; *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 220-230 (2003)

Park J.H., Shin H.K.; High density cell cultures sp. KCTC 8405P for the production of γ -linoleic acid in fed-batch culture; *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1(2), 126-129 (1991)

Perez Locas C., Yaylayan V. A. ; Origin and Mechanistic Pathways of Formation of the Parent Furan-A Food Toxicant; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6830-6836 (2004)

Pettersson T., Eklund A.-M., Wahlberg I.; New Lactones from Tobacco; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2097-2103 (1993)

Rama Devi J., Bhattacharyya P. K. ; Microbiological Transformations of Terpenes : Part XXIII – Fermentation of Geraniol, Nerol & Limonene by a Soil Pseudomonad, *Pseudomonas incognita* (Linalool Strain); *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 14, 288-291 (1977)

Rodriguez J., Dulcere J.; Facile and Selective Epoxidation with the H₂O₂/Vilsmeier Reagent System; *J. Org. Chem.*, 56, 469-471 (1991)

Sayre L.M., Arora P.K., Iyer R.S., Salomon R.G.; Pyrrole formation from 4-Hydroxynonenal and primary amines; *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 19-22 (1993)

Schrader J., Berger R. G. ; Biotechnology, Vol. 10, *Special Processes*, Rehm, H.-J., Reed, G. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, 374-422 (2001)

Seybold S. J., Tittiger C.; Biochemistry and Molecular Biology of De Novo Isoprenoid Pheromone Production in the Scolytidae; *Annu. Rev. Entomol.*, 48, 425-453 (2003)

Shellie R., Mondello L., Marriott P., Dugo G.; Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography – mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography; *Journal of Chromatography A*, 970, 225-234 (2002)

Shimizu N., Mori N., Kuwahara Y.; Aggregation Pheromone Activity of the Female Sex Pheromone, β -Acaridial, in *Caloglyphus polyphyllae* (Acari: Acaridae); *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(8), 1724-1728 (2001)

Shimizu N., Mori N., Kuwahara Y.; Simple Synthesis of Mite Pheromone β -Acaridial and Its Analogs in the Secretion of *Caloglyphus polyphyllae* (Acari: Acaridae); *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(8), 1732-1736 (2003)

- Shimizu N., Tarui H., Mori N., Nishida R., Kuwahara Y. ; (E)-2-(2-Hydroxyethylidene)-6-methyl-5-heptenal (α -Acarialol) and (E)-2-(2-Hydroxyethyl)-6-methyl-2,5-heptadienal (β -Acarialol), Two New Types of Isomeric Monoterpenes from *Caloglyphus polyphyllae* (Acari: Acaridae); *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(2), 308-313 (2003)
- Singh G., Singh O.P., Maurya S.; Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species; *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 45(1-2), 75-81 (2002)
- Srebotnik E., Hammel K.E.; Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system; *Journal of Biotechnology*, 81, 179-188 (2000)
- Suga K., Watanabe S., Okoshi I.; The Synthesis of Linalool; *Notes*, 39(6), 1335-1336 (1966)
- Suzuki T., Matsuyama S., Kuwahara Y.; A Simple Synthesis of α -Acarialol; *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(11), 1888-1889 (1992)
- Suzuki T., Haga K., Kuwahara Y.; Anal Secretion of Thrips I. Identification of Perillene from *Leeuwenia pasanii* (Thysanoptera: Phlaeothripidae); *Appl. Ent. Zool.*, 21(3), 461-466 (1986)
- Takahashi S.; *Synth. Commun.*, 6, 331-337 (1976)
- Tarui H., Mori N., Nishida R., Okabe K., Kuwahara Y. ; 3-(4-Methyl-3-pentenyl)-2(5H)-furanone, α,α -Acarialide and 4-(4-Methyl-3-pentenyl)-2(5H)-furanone, α,β -Acarialide: New Monoterpene Lactones from the Astigmatid Mites, *Schwiebea araujoae* and *Rhizoglyphus* sp. (Astigmata: Acaridae); *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(1), 135-140 (2002)
- Taubert J., Krings U., Berger R. G.; A comparative study on the disintegration of filamentous fungi; *J. Microbiol. Methods*, 42(3), 225-232 (2000)
- Thappa R. K., Agarwal S. G., Kapahi B. K., Srivastava T. N.; *Essent. Oil Res.*, 11, 97-103 (1999)
- Trost B. M., Arndt H. C.; New Synthetic Reactions. Dimethylsulfonium 2-Oxotetrahydrofuryl-3-ylide as an Annelating Reagent; *J. Org. Chem.*, 38(18), 3140-3144 (1973)
- Trost B. M., Curran D. P.; Chemoselective Oxidation of Sulfides to Sulfones with Potassium Hydrogen Persulfate; *Tetrahedron Letters*, 22(14), 1287-1290 (1981)
- Tucker A. O., Maciarelo M. J.; Volatile Oil of *Elsholtzia stauntonii* Benth.; *J. Essent. Oil Res.*, 7, 653-655 (1995)
- Van den Brink, H.M., van Gorcom, R.F.M., van der Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J.; Review: Cytochrome P450 Enzyme Systems in fungi; *Fungal Gen. Biol.*, 23, 1-17 (1998)
- Van der Werf M., Swarts H.J., de Bont J.A.M.; *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene; *Appl. Environ. Microbiol.*, 2092-2102 (1999)
- Veselovsky V. V., Moiseenkov A. M.; A short synthesis of some monoterpenoids from the adduct of -myrcene with benzenesulfinyl chloride; *Russian Chemical Bulletin*, 42(1), 102-106 (1993)
- Wang D., Zhu H.-T., Zhang Y.-J., Yang C.-R.; A carbon-carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(18), 4073-4075 (2005)
- Watanabe M., Sasaki K., Nakashimada Y., Nishio N.; High density cell culture of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. with self-flocculated cells; *Biotechnol. Lett.*, 20(12), 1113-1117 (1998)
- Watzl B., Leitzmann C.; Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln; 2., überarbeitete und erweiterte Auflage; 1999

Wolken W.A.M., ten Have R., van der Werf M.J.; Amino Acid-Catalyzed Conversion of Citral: *cis-trans* Isomerization and Its Conversion into 6-Methyl-5-hepten-2-one and Acetaldehyde; *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5401-5405 (2000)

Wong K.C., Chong T.C., Chee S.G.; Essential oil of *Curcuma mangga* Val. And van Zijp rhizomes; *Journal of Essential Oil Research*, 11(3), 349-351 (1999)

Wright A. D., Coll J. C.; Tropical marine algae, VII. The Chemical composition of marine algae from north Queensland waters; *Journal of Natural Products*, 53(4), 845-861 (1990)

Yamazaki Y., Hayashi Y., Hori N., Mikami Y.; Microbial Conversion of β -Myrcene by *Aspergillus niger*; *Agric. Biol. Chem.*, 52(11), 2921-2922 (1988)

Yuba A., Honda G., Koezuka Y., Tabata M.; Genetic Analysis of Essential Oil Variants in *Perilla frutescens*; *Biochemical Genetics*, 33(9/10), 341-348 (1995)

Yuba A., Yazaki K., Tabata M., Honda G., Croteau R. ; cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of 4S-(-)-Limonene Synthase from *Perilla frutescens*; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(21), 280-287 (1996)

Zorn H., Fischer-Zorn M., Berger R. G., A Labeling Study To Elucidate the Biosynthesis of 4-(4-Hydroxyphenyl)-Butan-2-one (Raspberry Ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*; *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 367-372 (2003)

Zorn H., Neuser F., Berger R. G.; 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(3), 255-263 (2004)

7 Anhang

Tabelle 7.1 Verzeichnis der in dieser Arbeit aufgeführten Strukturformeln

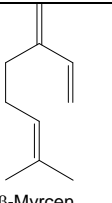
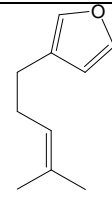
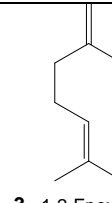
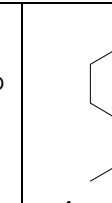
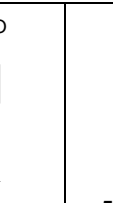
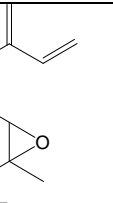
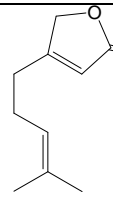
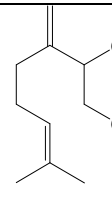
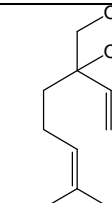
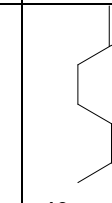
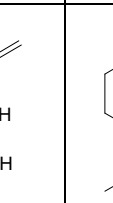
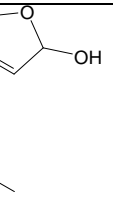
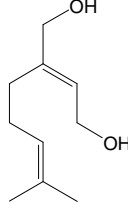
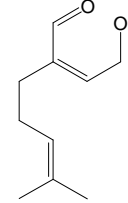
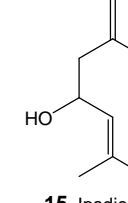
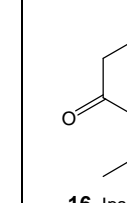
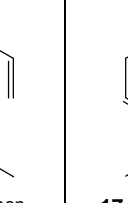
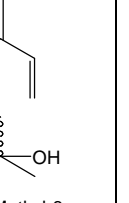
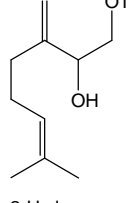
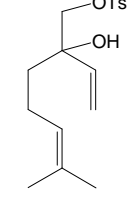
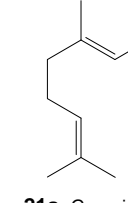
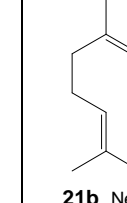
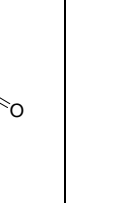
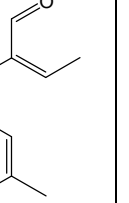
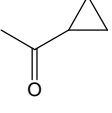
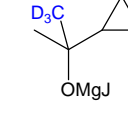
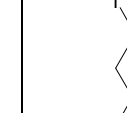
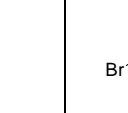
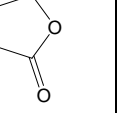
 1 β -Myrcen	 2 Perillen	 3 1,2-Epoxy- β -myrcen	 4 3,10-Epoxy- β -myrcen	 5 6,7-Epoxy- β -Myrcen	 6 α, α -Acariolid
 7 α, β -Acariolid	 8 1,2- β -Myrcen-dihydrodiol	 9 3,10- β -Myrcen-dihydrodiol	 10 6,7- β -Myrcen-dihydrodiol	 11 α, β -Acarilactol	 12 α -Z-Acariolid
 13 α -E-Acariolid	 14 α -Z-Acariolid	 15 Ipsdienol	 16 Ipsdienon	 17 2-Methyl-6-methylen-3,7-octadien-2-ol	 18 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-ol
 19 2-Hydroxy-1-tosylat	 20 3-Hydroxy-10-tosylat	 21a Geranial	 21b Neral	 22 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-heptenal	 23 2-Z-Ethyliden-6-methyl-5-hepten-1-ol
 24 Cyclopropylmethylketon	D_3C-MgJ 25 Trideutero-methylmagnesium-iodid	D_3C  26 Grignard-addukt	 27 4-Methyl-3-pentenylidid	 28 α -Brom- γ -butyrolacton	 29 α -Methylthio- γ -butyrolacton

Tabelle 7.1 Verzeichnis der in dieser Arbeit aufgeführten Strukturformeln [Fortsetzung]

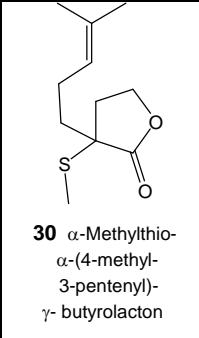
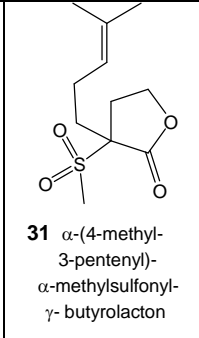
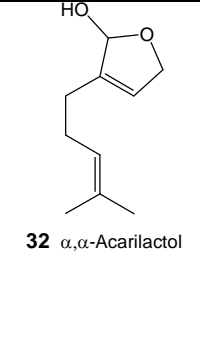
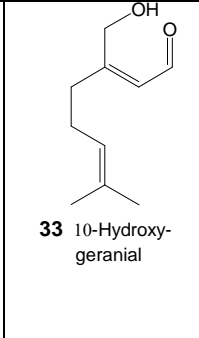
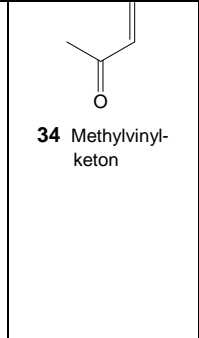
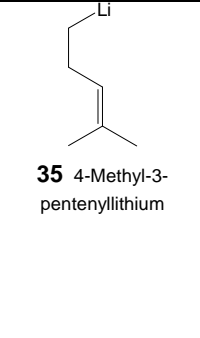
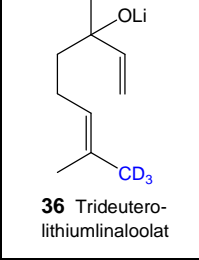
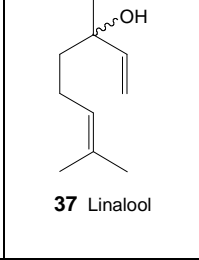
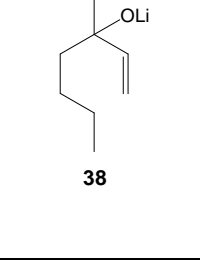
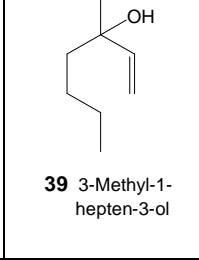
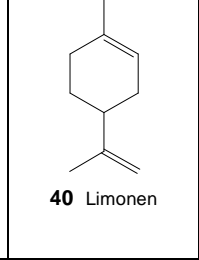
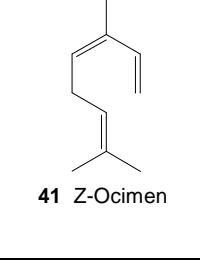
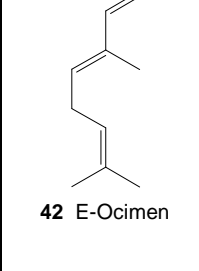
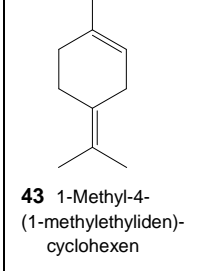
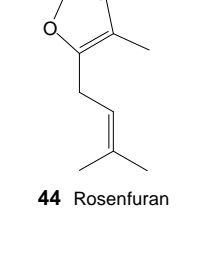
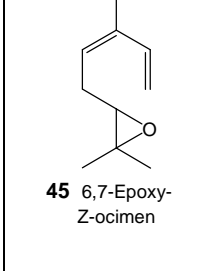
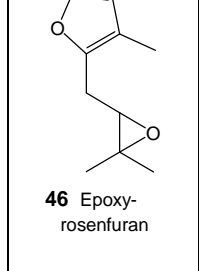
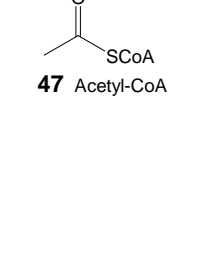
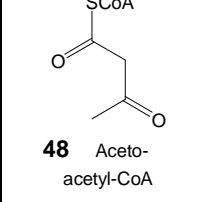
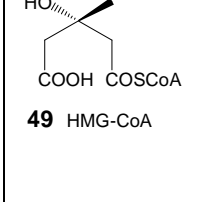
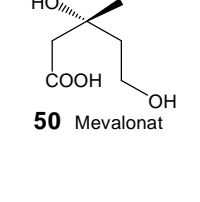
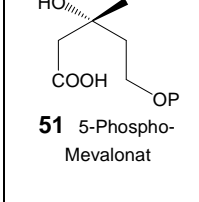
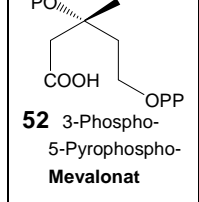
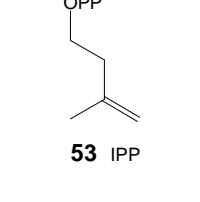
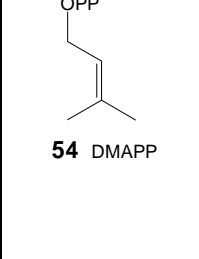
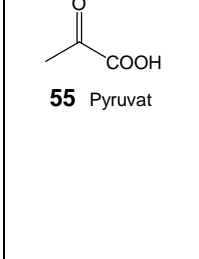
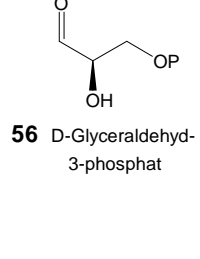
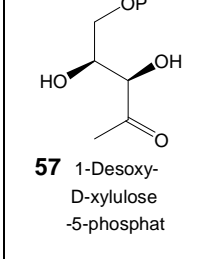
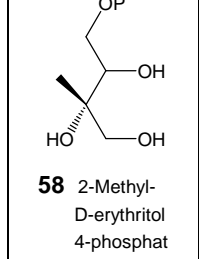
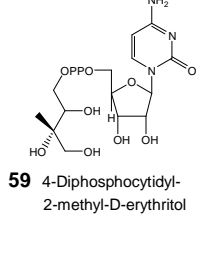
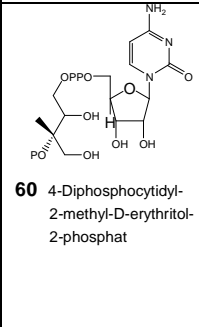
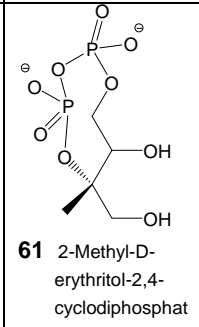
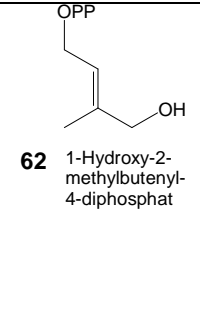
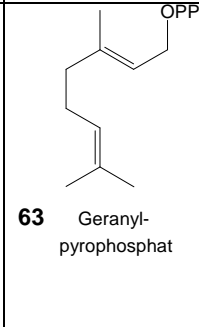
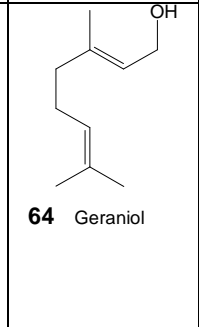
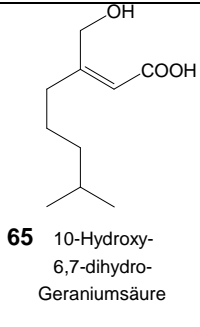
 <p>30 α-Methylthio-α-(4-methyl-3-pentenyl)-γ-butyrolacton</p>	 <p>31 α-(4-methyl-3-pentenyl)-α-methylsulfonyl-γ-butyrolacton</p>	 <p>32 α, α-Acarilactol</p>	 <p>33 10-Hydroxygeranial</p>	 <p>34 Methylvinylketon</p>	 <p>35 4-Methyl-3-pentenyllithium</p>
 <p>36 Trideuterolithiumlinaloolat</p>	 <p>37 Linalool</p>	 <p>38</p>	 <p>39 3-Methyl-1-hepten-3-ol</p>	 <p>40 Limonen</p>	 <p>41 Z-Ocimen</p>
 <p>42 E-Ocimen</p>	 <p>43 1-Methyl-4-(1-methylethyliden)cyclohexen</p>	 <p>44 Rosenfuran</p>	 <p>45 6,7-Epoxy-Z-ocimen</p>	 <p>46 Epoxyrosenfuran</p>	 <p>47 Acetyl-CoA</p>
 <p>48 Acetoacetyl-CoA</p>	 <p>49 HMG-CoA</p>	 <p>50 Mevalonat</p>	 <p>51 5-Phosphomevalonat</p>	 <p>52 3-Phospho-5-Pyrophosphomevalonat</p>	 <p>53 IPP</p>
 <p>54 DMAPP</p>	 <p>55 Pyruvat</p>	 <p>56 D-Glycerinaldehyd-3-phosphat</p>	 <p>57 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat</p>	 <p>58 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat</p>	 <p>59 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol</p>
 <p>60 4-Diphosphocytidyl-2-methyl-D-erythritol-2-phosphat</p>	 <p>61 2-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat</p>	 <p>62 1-Hydroxy-2-methylbutenyl-4-diphosphat</p>	 <p>63 Geranylpyrophosphat</p>	 <p>64 Geraniol</p>	 <p>65 10-Hydroxy-6,7-dihydrogeraniumsäure</p>

Tabelle 7.1 Verzeichnis der in dieser Arbeit aufgeführten Strukturformeln [Fortsetzung]

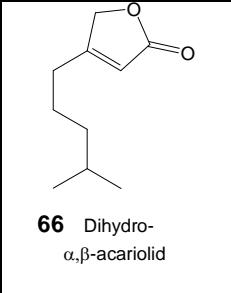
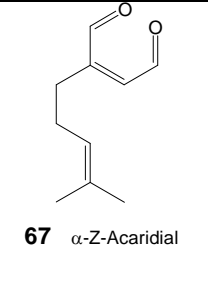
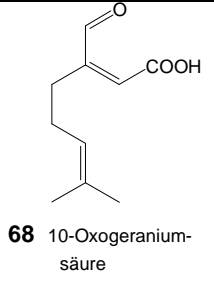
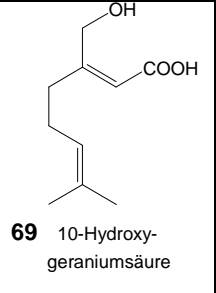
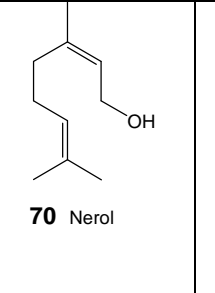
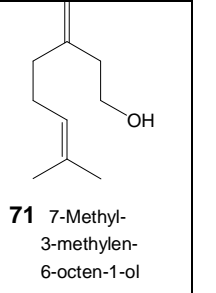
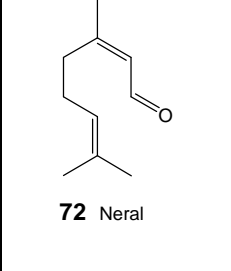
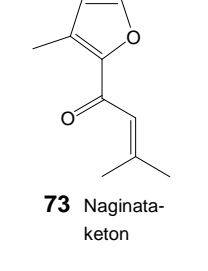
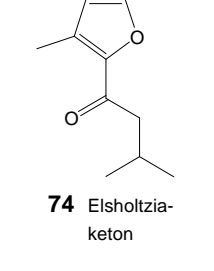
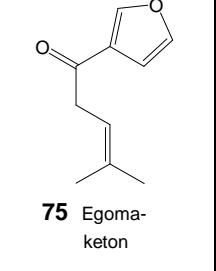
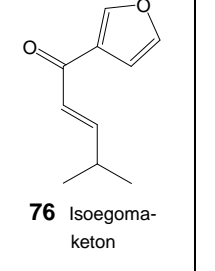
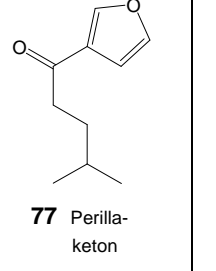
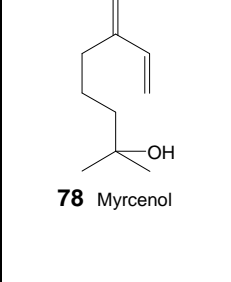
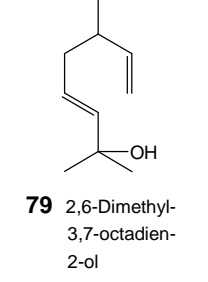
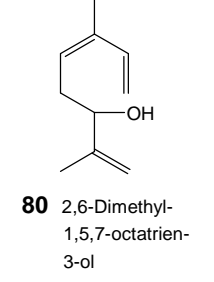
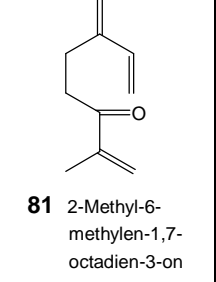
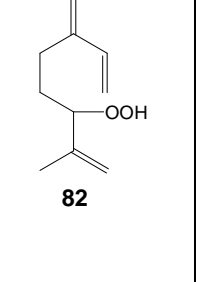
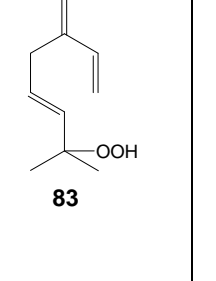
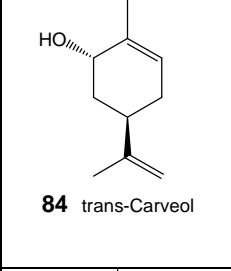
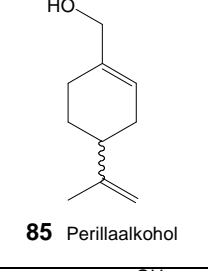
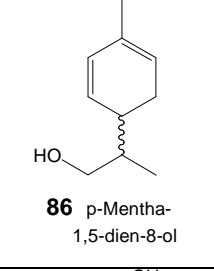
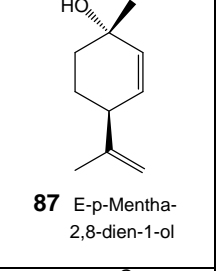
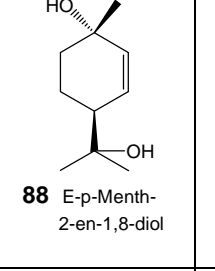
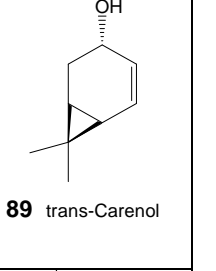
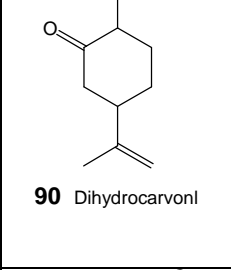
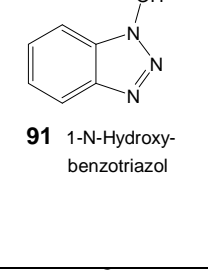
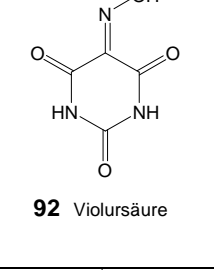
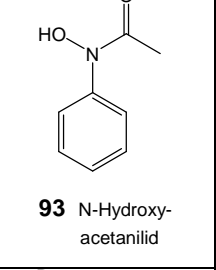
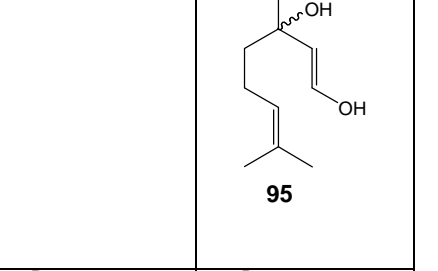
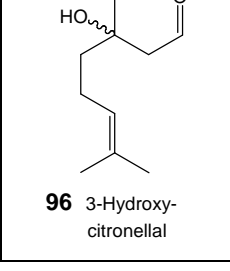
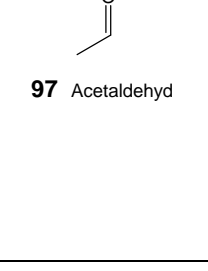
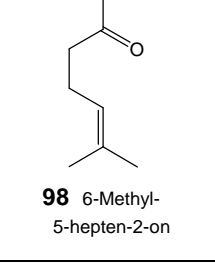
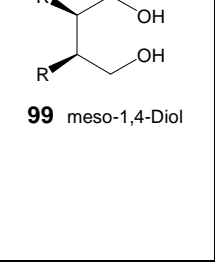
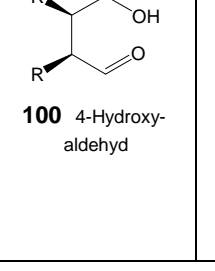
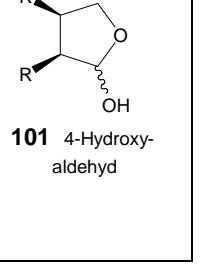
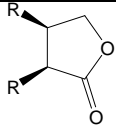
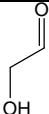
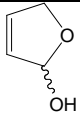
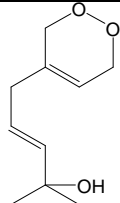
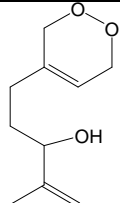
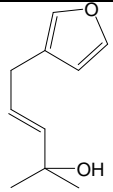
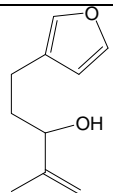
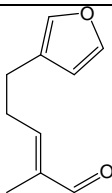
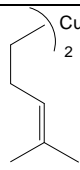
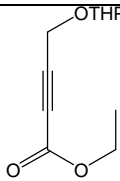
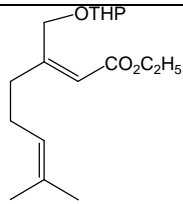
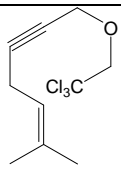
 66 Dihydro- α,β -acariolid	 67 α -Z-Acaridial	 68 10-Oxogeraniumsäure	 69 10-Hydroxygeraniumsäure	 70 Nerol	 71 7-Methyl-3-methylen-6-octen-1-ol
 72 Neral	 73 Naginataketon	 74 Elsholtziaketon	 75 Egomaketon	 76 Isoegomaketon	 77 Perillaketon
 78 Myrcenol	 79 2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2-ol	 80 2,6-Dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol	 81 2-Methyl-6-methylen-1,7-octadien-3-on	 82	 83
 84 trans-Carveol	 85 Perillaalkohol	 86 p-Mentha-1,5-dien-8-ol	 87 E-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	 88 E-p-Mentha-2-en-1,8-diol	 89 trans-Carenol
 90 Dihydrocarvonl	 91 1-N-Hydroxybenzotriazol	 92 Violursäure	 93 N-Hydroxyacetanilid	 95	
 96 3-Hydroxycitronellal	 97 Acetaldehyd	 98 6-Methyl-5-hepten-2-on	 99 meso-1,4-Diol	 100 4-Hydroxyaldehyd	 101 4-Hydroxyaldehyd

Tabelle 7.1 Verzeichnis der in dieser Arbeit aufgeführten Strukturformeln [Fortsetzung]

 <p>102 Butyrolacton</p>	 <p>103 Glycolaldehyd</p>	 <p>104 2,5-Dihydro-2-furfural</p>	 <p>105 Endoperoxid 1</p>	 <p>106 Endoperoxid 2</p>	 <p>107 2-Methyl-5-(3-furyl)-3-penten-2-ol</p>
 <p>108 2-Methyl-5-(3-furyl)-1-penten-3-ol</p>	 <p>109 Perillenal</p>	 <p>110 4-Methyl-3-pentenyl-kupfer/lithium</p>	 <p>111</p>	 <p>112</p>	 <p>113</p>

Lebenslauf

Darius Hapetta

geboren am 15. Dezember 1973 in Gleiwitz o/s

Schulbildung

1980-1988: Grund- und Gesamtschule in Gleiwitz
1988-1989: Chemisches Berufstechnikum in Gleiwitz
1989-1990: Haus- und landwirtschaftliche Schule in Crailsheim
1990-1995: Albert Schweitzer Gymnasium in Crailsheim
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1995-05/2001 Studium der Lebensmittelchemie überwiegend an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Abschluss: 1. Staatsexamen
Im WS 1998/99 Studium der Lebensmittelchemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
Thema der wissenschaftlichen Abschlussarbeit an der TU Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. P. Winterhalter:
Methodenvergleich zur Bestimmung von Proanthocyanidinen in Weintraubenschalen- und Traubenkernextrakten

Berufliche Erfahrung

11/2001-10/2002 Berufsqualifizierende Ausbildung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) in Braunschweig und Lüneburg unter der Leitung von Dr. Kleinau
Abschluss: 2. Staatsexamen
02/2003-12/2005 Position als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. R.G. Berger

