

Entwicklung biokatalytischer Verfahren zur Veredelung terpenoider Precusoren

Identifizierung, Isolierung, Charakterisierung
und heterologe Expression geeigneter Enzyme
des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*

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

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Master of Science

Sven Krügener

geboren am 28. Dezember 1980 in Hannover

Hannover 2009

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. Holger Zorn

Tag der Promotion: 08.06.2009

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, meinem Doktorvater, für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft, den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Holger Zorn und Herrn Dr. Ulrich Krings für die Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotion. Ihr profundes Fachwissen war eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Debener (Abteilung Angewandte Genetik, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Vorsitzes meiner Disputation.

Herrn Dr. Manfred Nitz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig) möchte ich danken für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS sowie MALDI Peptid Mapping.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Dieter Albert (Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für seine Unterstützung bei der Aufnahme und Interpretation von NMR-Spektren.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für das hervorragende Arbeitsklima, die hilfsbereite Zusammenarbeit und eine unvergessliche Zeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Erika und Joachim Krügener, die mein Studium erst ermöglicht haben, mich tatkräftig unterstützt haben und meinen Wünschen und Plänen gegenüber immer offen waren.

Vorbemerkungen

Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 2006 bis März 2009 im Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen folgender Forschungsvorhaben durchgeführt:

1. „Enzymatische Oxidationssysteme für Nahrungsmittel und für den technischen Einsatz“, Bundesministerium für Bildung und Forschung, Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B)
2. „Aufklärung der Biogenese von Perillen am Modellorganismus *Pleurotus ostreatus*“, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG KR 2958/1-1)
3. „Neuartige Biokatalysatoren aus Basidiomyceten für die Lebensmittelindustrie“, Deutsche Bundesstiftung Umwelt (AZ 13164)
4. „Biotechnologische Produktion von natürlichem (+)-Nootkaton“, Deutsche Bundesstiftung Umwelt (AZ 13187-32)

Teile dieser Dissertation wurden in international anerkannten Zeitschriften publiziert, sowie in Form von Vorträgen und Posterpräsentationen veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Articles in international scientific journals with peer review:

1. **Krügenger S**, Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG (2009): Heterologous expression of an extra-cellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. J Mol Catal B Enzym, 57, 16-21.
2. Zelena K, **Krügenger S**, Lunkenbein S, Zorn H, Berger RG (2009): Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli.*, Biotechnol Lett, 31, 395-401.
3. **Krügenger S**, Schaper C, Krings U, Berger RG (2009): *Pleurotus* species convert monoterpenes to furanoterpenoides through 1,4-endoperoxides, Bioresour Technol, 100, 2855-2860.
4. **Krügenger S**, Krings U, Zorn H, Berger RG (2009): A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone *via* a stereo-specific allylic hydroperoxidation, submitted.

Articles in international scientific conference proceedings:

1. **Krügenger S**, Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG (2008): Functional heterologous expression of a basidiomycetous extracellular carboxylesterase. In: Antranikian G, Grote R (Eds.), Fourth International Congress on Biocatalysis. Hamburg: TuTech Innovation.
2. Krings U, **Krügenger S**, Rinne S, Berger RG (2008): Bioconversion of β -myrcene to perillene – metabolites, pathways, and enzymes. In: Blank I, Wüst M, Yerezian C (Eds), Proceedings of the XII Weurman Flavour Reserach Symposium; in print

Articles in German scientific journals:

1. **Krügenger S**, Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG (2008): Xanthophyllesterhydrolyse durch eine heterolog exprimierte Carboxylesterase aus *Pleurotus sapidus*. Lebensmittelchemie, 62, 149
2. **Krügenger S**, Krings U, Zorn H, Berger RG (2009): Gewinnung des Aromastoffs Nootkaton: Biokatalyse und Downstream-Processing. Chem Ing Tech; in print

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Terpene und Terpenoide: Vorkommen, Gewinnung, Verwendung.....	2
1.2 Transformation von Terpenen: Biotechnologische Ansätze.....	4
1.2.1 Aroma- und Duftstoffe.....	4
1.2.2 Lipophile Farbstoffe.....	6
1.3 Enzyme aus Basidiomyceten: Biochemisches Potenzial.....	8
1.4 Erschließung sequenzneuer Enzyme aus Basidiomyceten.....	9
1.4.1 <i>Pleurotus sapidus</i> : Enzymquelle für die „Weiße Biotechnologie“.....	10
1.5 Fragestellungen und Zielsetzungen.....	11
1.5.1 Biokonversion des Monoterpens β -Myrcen zum Perillen.....	12
1.5.2 Biotransformation des Sesquiterpens Valencen.....	15
1.5.3 Hydrolyse von Capsanthindiestern.....	20
2 PLEUROTUS SPECIES CONVERT MONOTERPENES TO FURANOTERPENOIDS THROUGH 1,4-ENDOPEROXIDES	23
2.1 Abstract.....	23
2.2 Introduction.....	24
2.3 Methods.....	25
2.3.1 Basidiomycetes.....	25
2.3.2 Chemicals.....	25
2.3.3 Production of lyophilised biomass.....	26
2.3.4 Solubilisation.....	26
2.3.5 Biotransformation.....	26
2.3.6 Inhibitor studies.....	26
2.3.7 HRGC and HRGC-MS analysis.....	27
2.3.8 NMR.....	27
2.3.9 Synthesis of bioconversion products.....	27
2.4 Results and discussion.....	29
2.4.1 Solubilisation of active enzyme fractions from fungal mycelium lyophilisates.....	29
2.4.2 Volatile products.....	29
2.4.3 The second pathway to furanoterpenoids.....	31
2.4.4 Identification of labelled 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal.....	35
2.4.5 Conclusion.....	37
2.5 Acknowledgement.....	37

3 A DIOXYGENASE OF <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> TRANSFORMS (+)-VALENCENE REGIO-SPECIFICALLY TO (+)-NOOTKATON VIA A STEREO-SPECIFIC ALLYLIC HYDROPEROXIDATION	38
3.1 Abstract.....	38
3.2 Introduction.....	39
3.3 Material and methods.....	40
3.3.1 Microorganism and Chemicals.....	40
3.3.2 Cultivation, production of lyophilised biomass.....	40
3.3.3 Biotransformation.....	40
3.3.4 HRGC / HRGC-MS.....	41
3.3.5 Thin layer chromatography (TLC).....	41
3.3.6 HPLC and HPLC-MS.....	42
3.3.7 NMR.....	42
3.3.8 Synthesis of bioconversion products.....	42
3.3.9 Chemical modification of (+)-valencene derived hydroperoxides....	43
3.4 Results and discussion.....	44
3.4.1 Secondary (+)-valencene hydroperoxides [3,3'].....	45
3.4.2 Stereochemistry of the secondary (+)-valencene hydroperoxides...47	
3.4.3 Tertiary (+)-valencene hydroperoxides [2,2'].....	49
3.4.4 (+)-Valencene dioxygenase of <i>P. sapidus</i>	50
3.5 Acknowledgements.....	51
4 HETEROLOGOUS EXPRESSION OF AN EXTRACELLULAR LIPASE FROM THE BASIDIOMYCETE <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i>	52
4.1 Abstract.....	52
4.2 Introduction.....	53
4.3 Materials and methods.....	54
4.3.1 Cultivation and lipase production.....	54
4.3.2 RNA purification and cDNA library construction	54
4.3.3 Cloning of expression plasmids.....	54
4.3.4 Expression of Lip2 variants.....	56
4.3.5 DNA sequencing and alignment.....	56
4.3.6 SDS-PAGE and Western blot analysis.....	56
4.3.7 Isoelectric focusing (IEF).....	57
4.3.8 Refolding and Purification.....	57
4.3.9 Lipase overlay assay.....	57
4.3.10 p-NPP lipase activity assay.....	58
4.3.11 Xanthophyll ester cleaving activity.....	58
4.3.12 Protein Concentration.....	58
4.3.13 MALDI peptide mapping.....	59
4.4 Results.....	59
4.5 Discussion.....	65
4.6 Acknowledgements.....	66
5 ZUSAMMENFASSUNG	67
6 SUMMARY	68
7 LITERATURVERZEICHNIS	69
8 ANHANG	87

Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	–	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
Abb.	–	Abbildung
ADH	–	Alkoholdehydrogenase
Amp.	–	Ampicillin
AmpR	–	Ampicillinresistenz
APCI	–	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APS	–	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	–	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat
BHT	–	2,6-Di- <i>t</i> -butyl-hydroxytoluen
BLOSUM	–	block substitution matrix
bp	–	Basenpaare
bidest.	–	bidestilliert
BIS	–	Bisacrylamid
BSTFA	–	Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid
c	–	Konzentration
c(P)	–	Gesamtproteinkonzentration
c(X)	–	Biotrockenmassekonzentration
CI	–	chemische Ionisierung
CBS	–	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Niederlande)
cDNA	–	Copy-DNA
CMC	–	kritische micellare Konzentration (abgeleitet von engl.: critical micelle concentration)
CTAB	–	Cetyltrimethylammoniumbromid
DABCO	–	Diazabicyclo[2,2,2]octan
DAD	–	Diodenarraydetektor
DC	–	Dünnschichtchromatographie
DDBJ	–	DNA Databank of Japan
DIBAL-H	–	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	–	Dimethylformamid
DMAPP	–	Dimethylallyldiphosphat

DNA	– Desoxyribonucleinsäure (abgeleitet von engl.: Desoxyribonucleic Acid)
dNTD	– Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	– Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	– Dithiothreitol
EDTA	– Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EI	– Elektronenstoßionisation
ELSD	– Evaporative Light Scanning Detector
EMBL-EBI	– European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute
FAD	– Flavin-Adenindinucleotid
FID	– Flammenionisationsdetektor
FPLC	– Fast Protein Liquid Chromatography
g	– Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
GC	– Gaschromatographie
GC-MS	– Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer
GC-O	– Gaschromatographie mit olfaktrometrischer Detektion
h	– Stunde(n)
HEPES	– 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIC	– Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMPA	– Hexamethylphosphoramid
HPLC	– Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-MS	– Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer
HR	– Hochauflösung
ID	– Innendurchmesser
IEC	– Ionenaustauschchromatographie
IEF	– Isoelektrische Fokussierung
Ig	– Immunglobulin
IMAC	– Metallaffinitätschromatographie (abgeleitet von engl.: Immobilized Metal Affinity Chromatography)

IPG	– Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	– Isopropylthiogalactosid
IS	– Interner Standard
kb	– Kilobase(n)
kDa	– Kilodalton
KI	– Kováts-Index
Km	– Kanamycin
LB	– Luria-Bertani-Medium
LC	– Flüssigchromatographie (abgeleitet von engl.: liquid chromatography)
LDA	– Lithiumdiisopropylamid
Lsg.	– Lösung
Lsgm.	– Lösungsmittel
M ⁺	– Molekülion
MALDI	– matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisationsmassenspektrometrie
MCS	– Multiple Cloning Site
MOPS	– 3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MS	– Massenspektrometrie
mCPBA	– m-Chlorperbenzoesäure
min	– Minuten
mRNA	– messenger RNA
MW	– Molekülmasse (abgeleitet von engl.: molecular weight)
mtDNA	– Mitochondriale DNA
m/z	– Masse-Ladungs-Verhältnis
NADH	– Nicotinamid-adenosyldinucleotid, reduziert
NADPH	– Nicotinamid-adenosyldinucleotidphosphat, reduziert
NBT	– Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	– National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	– Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	– Optische Dichte
ori	– Replikationsursprung
PAGE	– Polyacrylamidgelelektrophorese

PAM	– percent accepted mutation
PCR	– Polymerasekettenreaktion
qm	– spezifische Produktbildungsrate
PP _i	– Pyrophosphat
R ²	– Bestimmtheitsmaß
R _f	– Retentionsfaktor
RNA	– Ribonukleinsäure
RT	– Raumtemperatur (ca. 22 °C)
Rz	– Retentionszeit
rpm	– Umdrehungen pro Minute (abgeleitet von engl.: revolutions per minute)
SC	– Säulenchromatographie
SDS	– Natriumdodecylsulfat
SNL	– Standardnährlösung (Medium)
Stabw	– Standardabweichung
TAE	– Tris-Acetat-EDTA
Taq	– <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	– N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	– Tetrahydrofuran
TMBZ	– 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	– Flugzeit (abgeleitet von engl.: time of flight)
Tris	– Trishydroxymethylaminomethan
U	– Unit (µmol/min)
ÜS	– Überstand
UV	– Ultraviolett
VK	– Variationskoeffizient
% (v/v)	– Volumenprozent
vvm	– Belüftungsstrom (Volumen pro Volumen und Minute)
% (w/v)	– Massenkonzentration
x-Gal	– 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactosid

Aminosäuren und Basen werden nach dem internationalen Einbuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

„Grün ist eine kühle Farbe. Typisch für grüne Maschinen ist, daß sie die hohen Temperaturen grauer Maschinen und ihrer Kraftwerke nicht nötig haben, abgesehen davon, daß sie die 5.500 Grad Celsius heiße Oberfläche der Sonne als hochkarätigen Energielieferanten nutzen. [...] Die Farbe mußte man nicht allzu wörtlich nehmen. Der Physiker Freeman Dyson drückte es so aus: »Fabriken sind grau, Gärten sind grün. Physik ist grau, Biologie ist grün. Plutonium ist grau, Pferdeäpfel sind grün ...«¹

Erkenntnisse der Grundlagenforschung aus Forschungszweigen wie der Bioinformatik, Verfahrenstechnik, Biochemie, *protein engineering* und Genetik führen vermehrt zu neuen Produkten, die ökonomische und ökologische Mehrwerte schaffen. Die Biowissenschaften, die sich in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr von beobachtenden und beschreibenden Wissenschaften hin zu einer synthetischen, interdisziplinären Wissenschaft bewegt haben, sind inzwischen, neben Bereichen der Ingenieurwissenschaften, Grundlage für eine Industrie, die Biotechnologie genannt wird und in mehrere Teilbereiche aufgeteilt ist:

Die Weiße Biotechnologie – auch Industrielle Biotechnologie genannt – verwendet beispielsweise nach Definition der europäischen Industrievereinigung EuropaBio die Werkzeuge der Natur in der industriellen Produktion². Im Jahr 2006 wurden mit Verfahren, auf die diese Definition zutrifft, etwa 5% aller chemischen Erzeugnisse hergestellt (ANTRANIKIAN und HEIDEN, 2006). Bis 2010 ist mit einem Anstieg auf 10 - 20 % zu rechnen³, was einen Umsatz von 300 Mrd. Euro entspricht. Neben der Produktion von Biomasse zur Substitution fossiler Energieträger werden Antibiotika, Hormone, Vitamine, Aminosäuren und weitere Biomoleküle, die über eine chemische Synthese aufgrund ihrer chiralen Information nur schwer zugänglich sind, inzwischen im Kilotonnenmaßstab mit den Methoden der Weißen Biotechnologie produziert (HEIDEN, 2006). Biokatalysatoren finden in Form von Waschmittelenzymen sowie

1 Nigel Calder (1989): Der Zukunft eine Chance: die Biotechnologische Herausforderung [Aus dem Engl. übers. von Norber Wölf], Ullstein, Berlin

2 http://www.europabio.org/Industrial_biotech/; Abruf der Seite 18.02.2009

3 Nach einer Erhebung von McKinsey & Company, 2006, Riese lecture on world congress in industrial biotechnology and bioprocessing; www.mckinsey.com

Enzymen für die Textil- und Papierindustrie breite Anwendung (MAURER, 2006). Auch in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie finden neben klassischen biotechnologischen Verfahren, wie der Wein- oder Käseherstellung vermehrt moderne biotechnologische Verfahren Verwendung.

Eine Herausforderung der nächsten Jahre für Forschung und Technik wird die Identifizierung und Etablierung neuer Biokatalysatoren sein, die den Ansprüchen an Diversität und Verfügbarkeit für industrielle Anwendungen genügen.

Diese Arbeit befasst sich mit der biotechnologischen Erschließung von Farb- und Aromastoffquellen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie. Hierzu sollten Enzyme aus dem Speisepilz *Pleurotus sapidus* identifiziert, isoliert, molekularbiologisch charakterisiert und über gentechnische Methoden in hohen Konzentrationen bereitgestellt werden. Über natürliche Vorstufen sollten schließlich terpenoide Farb- und Aromastoffe mittels biokatalytischer Verfahren dargestellt werden.

1.1 Terpene und Terpenoide: Vorkommen, Gewinnung, Verwendung

In der Literatur finden sich mehr als 40.000 Strukturen, die zu den Terpenen $[(C_5H_8)_n]$ und Terpenoiden⁴ zu zählen sind (FUGMANN und ADAM, 1997). Sowohl im Tierreich, speziell in der Klasse *Insecta*, vor allem aber im Pflanzenreich kommen Terpene und Terpenoide vor. Auch aus einigen Prokaryoten konnten terpenoide Strukturen isoliert werden (OURISSON *et al.*, 1987). Die biologische Wirkungsweise ist allerdings nur für einen Teil dieser Substanzen beschrieben. Neben Hormonen und Pheromonen sind auch Terpene und Terpenoide beschrieben, die ihrem Produzenten als Infektions- und Fraßschutz dienen (BREITMAIER, 2005). Terpenoide sind zudem oft Schlüsselaromastoffe pflanzlicher ätherischer Öle (OHLÖFF, 1994).

Das Kohlenstoffgerüst der Terpene läßt sich durch Verknüpfung von Isopren-Einheiten (C_5) aufbauen. Terpene werden anhand der Anzahl der Isopreneinheiten klassifiziert: Terpene, die durch Dimerisierung von Isopren über Geranylpyrophosphat entstehen, werden nach dieser Nomenklatur als

4 Von Terpenen abgeleitete Alkohole, Aldehyde, Ketone und Ester sowie von Terpenen abstammende schwefel- und halogenhaltige Verbindungen, nicht jedoch von Terpenen abgeleitete Stickstoffverbindungen.

Monoterpene (C_{10}) bezeichnet. Sesquiterpene (C_{15}) sind aus drei, Diterpene (C_{20}) aus vier, Triterpene (C_{30}) aus sechs und Tetraterpene (C_{40}) aus acht Isopreneinheiten aufgebaut. Als Polyterpene werden Isoprenoide bezeichnet, die aus mehr als acht Isopreneinheiten aufgebaut sind.

Die Biosynthese der Terpene verläuft nicht direkt über Isopren. Vielmehr werden Isopentenyl-pyrophosphat beziehungsweise (3,3-Dimethylallyl)-diphosphat im Cytosol über den Acetat/(R)-Mevalonat-Weg und in Pflanzenorganellen über den so genannten Desoxyxylulosephosphatweg gebildet (LYNEN, 1967; ROHMER, 1999). Durch Kondensation von Isopentenyl-pyrophosphat und (3,3-Dimethylallyl)diphosphat entsteht Geranylpyrophosphat. Weitere Kondensations-, Cyclisierungs-, Substitutions- und Oxidationsreaktionen ermöglichen die enorme Diversität dieser Verbindungsklasse.

Terpene werden hauptsächlich aus pflanzlichem Material gewonnen. Hierbei kommen neben einer großen Anzahl verschiedener Pflanzenarten wie z.B. Nadelhölzer, Citrusfrüchte, Koriander, Lavendel, Nelken, Rosen und Veilchen auch verschiedene Pflanzenorgane als Quelle in Frage. Die Terpene und Terpenoide werden durch Anritzen der Pflanzen, durch Wasserdampfdestillation oder durch Extraktion gewonnen (BREITMAIER, 2005). Diese als ätherische Öle bekannten Extrakte oder Destillate, bei denen es sich zum überwiegenden Teil um komplexe Substanzmischungen handelt, dienen als natürliche Rohstoffe für Produkte der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie. Abfall- und Nebenströme der Holzverarbeitenden und der Lebensmittelindustrie stellen zusätzlich eine Quelle für Terpene dar. So werden beispielsweise α - und β -Pinen aus Kiefernrohharz gewonnen, welches einen Abfallstoff der Zellstoffindustrie darstellt. Aus dieser Quelle können pro Jahr etwa 160 Kilotonnen α -Pinen sowie 26 Kilotonnen β -Pinen gewonnen werden (OHLOFF, 1994). Diese werden hauptsächlich als Lösungsmittel in der Farben- und Lackindustrie eingesetzt, lediglich 25% dienen als Ausgangsmaterial für die chemische Riechstoffsynthese (OHLOFF, 1994). (+)-Valencen fällt in großen Mengen bei der Orangensaftproduktion in Form von Orangenschalenöl an. (+)-Valencen kann unter anderem durch Oxidation mit Chromaten in (+)-Nootkaton, einen typischen Geruchsträger des Grapefruitaromas, überführt werden (CANE *et al.*, 1990) (siehe Kapitel 1.5.2).

Carotinoide, Tetraterpene, die überwiegend durch chemische Synthese oder durch Extraktion pflanzlichen Materials gewonnen werden, finden als lipophile Farbstoffe breite Anwendung. Sie werden als Farbträger in Nahrungsmitteln, Futtermitteln und Kosmetika eingesetzt. Oxyfunktionalisierte Carotinoide werden als Xantophylle bezeichnet. Neben farbgebenden Eigenschaften weisen diese antioxidatives Potenzial auf (PÉREZ-GÁLVEZ und MINGUEZ-MOSQUERA, 2002; HIGASHI-OKAI *et al.*, 2001).

Neben dem Einsatz von Terpenen und Terpenoiden als Farb- oder Aromastoffe finden diese auch bei der Herstellung von pflanzlichen Arzneimitteln – so genannten Phytopharmaka – sowie in Insektiziden Verwendung. Medizinische Präparate nutzen meist die antimikrobiellen beziehungsweise antineoplastischen Eigenschaften einiger Terpenoide (SIKKEMA *et al.*, 1995; CROWELL, 1999). Als Vitamin-A-Vorstufen finden Carotinoide in pharmazeutischen Produkten Anwendung. Sie werden auch aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung beispielsweise in der Therapie von kardiovaskulären und einigen Krebserkrankungen eingesetzt (NTANIOS und DUCHATEAU, 2002; OKITO *et al.*, 2002). In Insektiziden wird die Pheromonwirkung einiger Monoterpenoide auf Insekten ausgenutzt, indem diese in entsprechenden Fallen dargeboten werden (ZHU *et al.*, 2003).

1.2 Transformation von Terpenen: Biotechnologische Ansätze

1.2.1 Aroma- und Duftstoffe

Industriell hergestellte Aroma- und Duftstoffe hatten im Jahr 2007 ein Marktvolumen von 20 Mrd. US-\$⁵. Aroma- und Duftstoffe, die zu den verschiedensten chemischen Verbindungsklassen gehören, werden durch Extraktion oder mittels chemischer oder biokatalytischer Synthese hergestellt. Wurden Aromastoffe zunächst ausschließlich über Extraktion gewonnen, wurden erste Vertreter, wie Coumarin (1868) und Vanillin (1874) bereits im 19. Jahrhundert erfolgreich chemisch synthetisiert (BAUER *et al.*, 2002).

Der Einsatz biokatalytischer Verfahren zur Synthese von Aroma- und Duftstoffen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Neben dem Vorteil der

5 http://www.leffingwell.com/top_10.htm; Abruf der Seite 18.03.2009

Chemo-, Regio- und Enantioselektivität enzymatischer Umsetzungen, wird dieser Trend durch die seit den achtziger Jahren steigende Nachfrage nach natürlichen Geschmacks- und Duftstoffen von Seiten des Verbrauchers unterstützt (SCHREIER, 1997).

Zur Kennzeichnung von Aromen⁶, die für den Endverbraucher bestimmt sind, dürfen Wörter wie „natürlich“ oder gleichsinnige Angaben nur verwendet werden, wenn die aromatisierenden Bestandteile des Aromas ausschließlich aus natürlichen Aromastoffen oder Aromaextrakten bestehen. Aromen können als natürlich vertrieben werden, wenn sie auf folgende Weise gewonnen werden: Sie können entweder aus Pflanzenmaterial extrahiert werden, sie können biotechnologisch mit Hilfe von Mikroorganismen (*de novo* Synthese) produziert werden (ENGEL *et al.*, 1989) oder über Biokonversion von natürlichen Ausgangsstoffen produziert werden (WELSH *et al.*, 1989). Die Entwicklung neuer biotechnologischer Verfahren zur Produktion von Aromastoffen ist also nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von großem wirtschaftlichen Interesse (BERGER, 1995). Zusätzlich kann die erfolgreiche Etablierung biokatalytischer Verfahren bei der Aroma- und Duftstoffsynthese zu einer Reduktion der Prozesskosten führen. Ein von der BASF entwickeltes biotechnologisches Verfahren zur Produktion von γ -Decalacton, der aromagebenden Komponente von Pfirsich, bei dem unter Verwendung von Ricinolsäure als Substrat mittels *Candida* spp. eine Produktkonzentration von 10 g l⁻¹ erreicht werden konnte, führte beispielsweise innerhalb weniger Jahre zu einer Verringerung des γ -Decalacton-Preises um den Faktor 30 (SCHWAB und SCHREIER, 2002). Neben Fruchtestern, die revershydrolytisch durch den Einsatz von Lipasen in organischen Lösungsmitteln hergestellt werden (DORDICK, 1989; FABER, 2000) und Oligopeptiden, die durch Hydrolyse von Proteinen durch Proteasen gewonnen werden (MAEHASHI *et al.* 1999), stellen Terpene und Terpenoide eine weitere wichtige Klasse der Aroma- und Duftstoffe dar⁷. So werden insbesondere Terpenoide in Kosmetika, Nahrungsmitteln, Haushaltsartikeln und Pharmaka verwendet (SCHRADER und BERGER, 2001). Natürliche Ressourcen kommen als Quelle meist nicht in Frage, da eine Reinigung der gewünschten

6 Siehe EU-Aromenrichtlinie 88/388 EWG vom 22. Juni 1988 sowie Aromenverordnung vom 22.12.1981 (zuletzt geändert am 30.09.2008)

7 Einen Überblick über fermentative und enzymtechnologische Verfahren zur Darstellung von Duft- und Aromastoffen liefern SERRA *et al.* (2005) sowie LONGO und SANROMÁN (2006) in aktuellen Übersichtsartikeln.

Substanzen aus ätherischen Ölen, in der Regel komplexe Substanzmischungen, nur in den wenigsten Fällen wirtschaftlich ist. Der Großteil der Terpenoide wird daher chemisch aus leichter zugänglichen Terpenen, wie den Pinenen und (+)-Valencen, synthetisiert (siehe Kapitel 1.1). Biotechnologische Anwendungen zur Produktion terpenoider Aromastoffe gewinnen aufgrund der genannten ökonomischen und ökologischen Vorteile zunehmend an Bedeutung.

Aufgrund der Tatsache, dass Terpenoide meist intensivere Aromaeigenschaften aufweisen als reine Kohlenwasserstoffe, kommt Oxidoreduktasen, neben Hydrolasen, Hydratasen und Racemasen eine besondere Bedeutung unter den terpentransformierenden Enzymen zu. So können beispielsweise Monooxygenasen zur Epoxidierung sowie Hydroxylierung von Terpenen eingesetzt werden oder Alkoholdehydrogenasen zur spezifischen Oxidation von Alkoholgruppen dienen (VAN DER WERF *et al.*, 1997). Auch Peroxidasen werden zur Oxyfunktionalisierung von Terpenen verwendet (SCHEIBNER *et al.*, 2008).

Die meisten aromaaktiven Terpenoide, die fermentativ dargestellt werden können, werden durch filamentöse Pilze produziert (LOMASCOLO *et al.*, 1999 ; VANDAMME, 2003), was eine Erschließung des biokatalytischen Potenzials dieser Pizklasse zur Terpentransformation aussichtsreich erscheinen lässt (siehe Kapitel 1.3).

1.2.2 Lipophile Farbstoffe

Die lebensmittelrechtlichen Bestimmungen für Lebensmittelfarbstoffe weisen im Gegensatz zu denen für Aromastoffe keine Unterscheidung von natürlichen, naturidentischen und künstlichen Farbstoffen auf. In der „Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken“ vom 29.01.1998⁸ sind unter Anlage 1 zu § 3 Abs. 1 und § 7 die Zusatzstoffe aufgelistet, die zum Färben von Lebensmitteln oder zum Erzielen von Farbeffekten bei Lebensmitteln zugelassen sind. Die Art der Gewinnung dieser Lebensmittelfarbstoffe ist hierbei zumindest rechtlich unerheblich. So können diese über chemische Synthese gewonnen werden. Sie weisen in der Regel

⁸ zuletzt geändert am 30.09.2008

einen höheren Reinheitsgrad gegenüber *per* Extraktion gewonnenen Farbstoffen auf. Letztere beinhalten zum Teil stark variierende Gehalte an Begleitsubstanzen. Für viele als Zusatzstoffe zugelassene Farbstoffe sind jedoch beide Strategien wirtschaftlich.

So wird beispielsweise der wichtigste fettlösliche Lebensmittelfarbstoff, β -Carotin, sowohl großtechnisch durch chemische Synthese dargestellt (POMMER, 1977) als auch aus Carotin-reichen Pflanzenteilen als Rohcarotin durch Extraktion gewonnen. Durch chromatographische Reinigung können aus Rohcarotin β -Carotin-Reinpräparate erhalten werden. Als weitere α - und β -Carotinquelle eignen sich speziell gezüchtete Kulturen der Grünalge *Dunaliella salina* (SPOLAORE *et al.*, 2006). Auch fermentative Verfahren zur Herstellung von β -Carotin sind beschrieben, jedoch aufgrund geringer Raum-Zeit-Ausbeuten nicht wirtschaftlich⁹.

Xanthophylle können biotechnologisch durch *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt werden (REHM *et al.*, 1998). Zahlreiche prokaryotische und eukaryotische β -Carotinhydroxylasen, die verschiedene Oxyfunktionalisierungen von Carotin katalysieren, sind auf molekularer Ebene beschrieben (MARTÍN *et al.*, 2008). Die BASF ließ sich einige Carotinhydrolasesequenzen patentieren, die für proteinbiotechnologische Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten geeignet sind (LINDEN und SANDMANN, 1999). Ein pflanzenbiotechnologischer Ansatz besteht in der Optimierung von Biosynthesewegen zur Produktion spezieller Sauerstoffhaltiger Carotinoide mittels „Metabolic Engineering“ (GUILIANO *et al.*, 2008).

Als typische pflanzliche Xanthophyllquellen sind Oleoresine von *Trametes erecta* und *Capsicum annuum* zu nennen. Der Bedarf an Xanthophyllen aus Pflanzenextrakten liegt im Kilotonnenmaßstab (BUCKENHÜSKES, 1999). Da Xanthophylle in den typischen pflanzlichen Rohstoffquellen annähernd ausschließlich in veresterter Form als Xanthophyllmono- und Xanthophylldiester vorliegen, jedoch aufgrund einer besseren Bioverfügbarkeit bevorzugt freie Xanthophylle als Farbstoffe verarbeitet werden, müssen diese zunächst verseift werden (HENCKEN, 1992). Dies geschieht traditionell durch alkalische Hydrolyse bei 80 °C für 24 h mit konzentrierter Kalilauge. Dieses Verfahren ist mit

⁹ Mit gentechnisch veränderten Pilzen der Gattung *Phycomyces* können 25 mg β -Carotin pro Gramm Biotrockenmasse produziert werden (DUFOSSÉ, 2006).

Produktverlusten von bis zu 40 %, Produktschädigungen sowie einem hohen Energie- und Arbeitsschutzaufwand verbunden, weshalb auch hier biotechnologische Prozessalternativen diskutiert werden. So lässt sich der Hydrolyseschritt mit geeigneten Hydrolasen bewerkstelligen, welches die für die chemische Verseifung genannten Nachteile beseitigt (ZORN *et al.*, 2003; ZORN *et al.*, 2005a).

1.3 Enzyme aus Basidiomyceten: Biochemisches Potenzial

Bei der Suche nach Biokatalysatoren, die zur industriellen Transformation von Terpenen und Terpenoiden geeignet erscheinen, bieten sich Ständerpilze als Enzymquelle an. Sie sind sessil und aufgrund ihrer saprophytischen beziehungsweise parasitischen Lebensweise oftmals optimal an terpenhaltige Lebensräume angepasst.

Die einzigartige Enzymausstattung der Sekretome von Basidiomyceten befähigt diese zur Degradation von Lignin und anderen Biopolymeren. So wurden bereits zahlreiche Oxidoreductasen, wie Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Versatile Peroxidasen, Alkoholdehydrogenasen und vor allem Laccasen, sowie Hydrolasen, wie Lipasen, Carboxylesterasen und Peptidasen aus dem Exoproteom von Basidiomyceten charakterisiert (BOUWS *et al.*, 2008). Bioinformatische Methoden lassen beispielsweise auf 1769 codierende Sequenzen für Exoproteine innerhalb des 37,5 Mb umfassenden Genom von *Coprinopsis cineria* schließen. Einige Basidiomyceten synthetisieren eine große Anzahl an medizinisch relevanten Sekundärmetaboliten. Basidiomyceten produzieren ein breites Spektrum an terpenoiden Aroma- und Duftstoffen (LOMASCOLO *et al.*, 1999; VANDAMME, 2003). Die Identifizierung und Charakterisierung extra- und intrazellulärer Enzyme trägt somit zur Erschließung dieses biochemischen Potenziales und somit zur Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur Veredelung terpenoider Precusoren zu natürlichen Aroma- und Duftstoffen bei. Das enorme Potenzial neuartiger Enzyme aus Basidiomyceten ist bisher nur wenig erforscht.

1.4 Erschließung sequenzneuer Enzyme aus Basidiomyceten

Sowohl Screeningverfahren als auch Selektionsverfahren, beispielsweise durch Mangelmedien eignen sich zur Erschließung sequenzneuer Enzyme.

Durch sequenzbasierte, bioinformatische Screeningverfahren, die durch immer preiswerter werdende Sequenzierung ganzer Eukaryotengenome den Zugang zu neuen Enzymaktivitäten über Sequenzhomologieanalyse suchen, können eine Vielzahl neuer Enzyme mit interessanten Eigenschaften identifiziert werden. Es folgt eine Charakterisierung der entsprechenden Enzymaktivität und Spezifität über die heterologe Expression der entsprechenden Sequenz in einem geeigneten Wirtsorganismus. Eine Bestätigung der Aktivität-Sequenz-Kausalität ist auch über Deletion des entsprechenden Gens möglich. Verglichen mit der hohen Verfügbarkeit von Genomsequenzen anderer eukaryotischer Klassen, wurden bisher nur wenige Basidiomycetengenome veröffentlicht. Neben den bereits veröffentlichten Genomsequenzen von *Coprinopsis cineria*, *Cryptococcus neoformans*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Ustilago maydis* wird an der Sequenzierung und Annotierung 10 weiterer Basidiomycetengenome¹⁰ gearbeitet, darunter *Pleurotus ostreatus*, einem nahen Verwandten von *P. sapidus* (GONZALEZ *et al.*, 2000), welcher als Enzymquelle für diese Arbeit herangezogen wurde. Bis dato wurden eine Genomkarte, sowie die vollständige mtDNA-Sequenz von *P. ostreatus* publiziert (LARRAYA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2008). Sequenzbasierte Verfahren zur Erschließung des biokatalytischen Potenzials von *P. sapidus* hinsichtlich der Terpenbiotransformation sind somit aufgrund der momentanen Datenlage nur bedingt zielführend.

Über aktivitätsbasierte Screeningverfahren lassen sich hingegen, ausgehend von der Identifizierung eines Organismus, der die gesuchte Aktivität aufweist, die entsprechenden Enzyme isolieren und charakterisieren. Über PCR-Screeningmethoden, die mit abgeleiteten Primern von zuvor gewonnenen ESI-MS/MS- und Edmann-Sequenzen durchgeführt werden, lassen sich schließlich *via* Primerextension die gesuchten Gene aus einer cDNA-Bank heraus amplifizieren. Auch dieser Ansatz fordert letztlich eine Charakterisierung der entsprechenden Enzymaktivität: beispielsweise über die heterologe Expression

¹⁰ <http://www.basidiomycetes.org/geno.htm> Aufruf der Seite 25.01.2009

der entsprechenden Sequenz und Charakterisierung des entsprechenden rekombinanten Proteins.

1.4.1 *Pleurotus sapidus*: Enzymquelle für die „Weiße Biotechnologie“

Der Weißfäulepilz *P. sapidus* produziert eine Vielzahl an intra- und extrazellulären Enzymen, die für biotechnologische Prozesse herangezogen werden können. So sekretiert er beispielsweise Hydrolasen, ligninolytische Enzyme, Peroxidasen und Laccasen (ZORN *et al.*, 2005b). Von einigen dieser Exo-Enzyme sind cDNA Sequenzinformationen vorhanden (LINKE *et al.*, 2005a; ZORN *et al.*, 2005a). An intrazellulären Enzymen aus *P. sapidus* sind bis *dato* lediglich einige Monooxygenasen sowie eine Dioxygenase auf molekularer Ebene charakterisiert worden (BOUWS, 2007; FRAATZ, 2007). Dem gegenüber stehen eine Reihe von Arbeiten zum Sekundärstoffwechsel dieses Pilzes, die eine Vielzahl von zum Teil neuen terpenoiden Metaboliten beschreiben (ONKEN und BERGER, 1999; DUETZ *et al.*, 2003; KASPERA *et al.*, 2005a; GUO *et al.*, 2007), was ein breites bisher nicht erforschtes Arsenal an neuartigen Enzymen zur Terpententransformation nahe legt.

Durch seine submerse Kultivierbarkeit in Medien mit verschiedensten Kohlenstoffquellen (DAUGULIS und BONE, 1977; AKBAYIN *et al.*, 1998; IRAMMA *et al.*, 1999; PELÁEZ *et al.*, 2008) bei guten Raum-Zeit-Ausbeuten an Biomasse, ist die Produktion von Enzym-Rohextrakten wenig zeit- und kostenintensiv. Aufschlussmethoden zur Gewinnung intrazellulärer Enzyme aus *P. sapidus* Zellen sind beschrieben (TASKOVA *et al.*, 2006). Auch Methoden zur Isolierung extra- und intrazellulärer Enzyme stehen zur Verfügung (ZORN *et al.*, 2005a; LINKE *et al.*, 2005b). Eine Herausforderung stellt die Identifizierung und Strukturaufklärung weiterer - für industrielle Verfahren und Produkte interessanter - Sekundärmetabolite sowie die Aufklärung der entsprechenden Biosynthesewege dar. Auf diesem Wissen aufbauend lassen sich Aktivitätsassays zur Detektion entsprechender Enzyme entwickeln, die schließlich zur Isolierung und Charakterisierung der gesuchten Enzymaktivitäten führen. Diese Enzyme können anschließend für biotechnologische Verfahren herangezogen werden.

Ein enzymatisches Verfahren kann allerdings nur dann wirtschaftlich überzeugen, wenn es gelingt, entsprechende Enzyme in ausreichender Konzentration und mit hinreichenden Aktivitäten zu gewinnen¹¹. Gentechnische Methoden können - sofern Sequenzinformationen des korrespondierenden Gens vorliegen - durch Expression des entsprechenden Proteins in einem geeigneten Wirtsorganismus und Sequenzoptimierung mittels Mutageneseverfahren dazu beitragen, ein enzymatisches Verfahren wirtschaftlich attraktiver zu machen, vorausgesetzt, dieses ist mit den Ansprüchen der Verbraucher vereinbar. Immer effizienter werdende Expressionssysteme und eine zunehmende Automatisierung von Aktivitätsscreeningverfahren können so die Produktion des gewünschten Biokatalysators in ausreichender Menge und Qualität sicherstellen. Systeme zur heterologen Expression von Esterasen aus Basidiomyceten sind bisher nicht beschrieben.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzungen

Mit dieser Arbeit sollten Enzyme aus dem Speisepilz *Pleurotus sapidus* identifiziert, isoliert, molekularbiologisch charakterisiert und über gentechnische Methoden in hohen Konzentrationen bereitgestellt werden, die zur biotechnologischen Erschließung von terpenoiden Farb- und Aromastoffen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie geeignet sind. Die vorliegende Arbeit befasst sich speziell mit der Biokonversion des Monoterpens β -Myrcen und der Biotransformation des Sesquiterpens Valencen durch Oxidoreduktasen zu den aromaaktiven Verbindungen Perillen beziehungsweise (+)-Nootkaton sowie mit der heterologen Expression einer Lipase zur Hydrolyse von Xanthophyllestern. Die Fragestellungen und Zielsetzungen sowie ein kurzer Überblick über Stand von Forschung und Technik sind im Einzelnen in den folgenden Unterkapiteln dargestellt:

¹¹ Siehe beispielsweise biotechnologische Produktion von 7-Aminocephalosporansäure (HEIDEN, 2006)

1.5.1 Biokonversion des Monoterpens β -Myrcen zum Perillen

Perillen [3-(4-Methyl-3-pentenyl)-furan] ist ein Furanoterpen, welches eine citrusartige, blumige Duftnote aufweist (OHLOFF, 1994) und neben Rosenketon, Rosenfuran, β -Damascon und β -Damascenon charakterbildend für Rosenöle ist (BREITMAIER, 2005). Es besteht ein beträchtliches wirtschaftliches Interesse, diese Verbindung als natürlichen Aromastoff in Citrusaromen zu verwenden¹².

Perillen kann über Wasserdampfextraktion aus Rosenöl gewonnen werden, was aber – aufgrund der aufwendigen Ernte von Rosenblütenköpfen – äußerst kostenintensiv ist¹³. Die Erstisolierung und Identifizierung des Naturstoffes Perillen gelang bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts durch KONDO und YAMAGUCHI (1919) aus dem etherischen Öl der aus dem asiatischen Raum stammenden Heil- und Gewürzpflanze *Perilla citriodora*. In etherischen Ölen zahlreicher weiterer Pflanzen konnte Perillen bisher nachgewiesen werden: Auszugsweise seien neben Rosenöl (KHADZHIEVA *et al.*, 1978) die etherischen Öle der Gattungen *Artemisia* (HU *et al.*, 1985), *Cannabis* (HENDRIKS *et al.*, 1978), *Lomatium* (BAIRAMIAN *et al.*, 2004), *Seseli* (BADER *et al.*, 2003), *Tabacco* (CHIDA *et al.*, 2003) genannt. Die industrielle Gewinnung von Perillen aus etherischen Ölen dieser Pflanzen ist jedoch auf Grund der niedrigen Perillenkonzentrationen unwirtschaftlich (HONDA *et al.*, 1994).

Zahlreiche Synthesestrategien zur chemischen Darstellung von Perillen sind beschrieben. So lässt sich Perillen beispielsweise über Paladium-katalysierte Cycloisomerisierung von (Z)-2-en-4-yn-1-olen (GABRIELE und SALERNO, 1997) sowie *via* reduktiver Cyclisierung von 1,1,1-Trichlorethylpropargyl (BARMA *et al.*, 2002) darstellen. Auch eine Synthese, bei der β -Myrcen als Edukt Verwendung findet, ist beschrieben (VESELOVSKY *et al.*, 1993). Diese Synthesestrategien wurden allerdings nicht in technische Verfahren übersetzt, da chemische Verfahren einer Klassifizierung des Produktes als natürlichen Aromastoff entgegenstehen.

Perillen ist als Abwehrpheromon von Insekten bekannt. So konnten in Milben (*Acaridae*) Furanoterpenoide wie Perillen und Rosenfuran nachgewiesen werden (LEAL *et al.*, 1989; DUSBABEK *et al.*, 1998; HIRAOKA *et al.*, 2003). Auch in

¹² Auskunft der Erich Ziegler GmbH (Aufseß, Deutschland)

¹³ Zur Gewinnung von 1 kg Rosenöl werden mehrere Tonnen Rosenblütenköpfe benötigt, die zudem in den Morgenstunden geerntet werden müssen, um einen optimalen Riechstoffgehalt im Öl zu erhalten (OHLOFF und DEMOLE, 1987).

den Mandibulardrüsen der Tailenwespen (*Apocrita*) *Alloxysta pleuralis* (HUBNER *et al.*, 2002), *Lasius fuliginosus* (BERNARDI *et al.*, 1967) und *Tetramorium angulinode* (LONGHURST *et al.*, 1979) wurde Perillen identifiziert. Insekten kommen aber als Perillenquelle für industrielle Zwecke nicht in Betracht.

Eine vielversprechende Alternative, über die Perillen als natürlicher Aromastoff im ausreichenden Maße zugänglich gemacht werden kann, bieten biotechnologische Ansätze (siehe Kapitel 1.3). Ein etabliertes biotechnologisches Verfahren zur Perillenherstellung ist jedoch bis *dato* nicht vorhanden.

Einen pflanzenbiotechnologischen Ansatz bietet *Perilla frutescens*. Der Biosyntheseweg von Perillen in *P. frutescens* ist beschrieben (YUBA *et al.*, 1995). Jüngst wurden entsprechende cDNA-Sequenzen aus *P. citriodorea* und *P. frutescens* kloniert und aktiv in *E. coli* exprimiert (ITO und HONDA, 2006). Die Autoren diskutieren die mögliche Optimierung der Perillenkonzentration im etherischen Öl von *Perilla* spp. über Metabolic Engineering.

In dem Basidiomyceten *Phallus impudicus* konnte Perillen vor 25 Jahren isoliert und identifiziert werden (KIKUCHI *et al.*, 1984). Von BRAUER (2004) wurde biotechnologisch erzeugtes Perillen beschrieben, welches mit Hilfe von submers kultivierten Pleuroten dargestellt werden konnte. β -Myrcen diente hierbei als Substrat. Dieses Monoterpen ist im ausreichenden Maße zugänglich¹⁴. Technisch wird β -Myrcen bereits zur chemischen Synthese von Citronellal, Citronellol, Geraniol und anderen Aromastoffen verwendet. Auch zur Synthese der fettlöslichen Vitamine A und E wird β -Myrcen eingesetzt (EISENBRAND, 2006). Die Verwendung von Basidiomycetenkulturen zur Oxyfunktionalisierung von β -Myrcen wurde 1994 von BUSMANN und BERGER beschrieben.

Die Biogenese von Perillen wurde in den letzten Jahren am Modellorganismus *Pleurotus ostreatus* untersucht und weitgehend aufgeklärt (siehe Abbildung 1).

¹⁴ Beispielsweise bildet es mit 63 % die Hauptkomponente das etherische Öl des Hopfens (OHLOFF *et al.*, 1994)

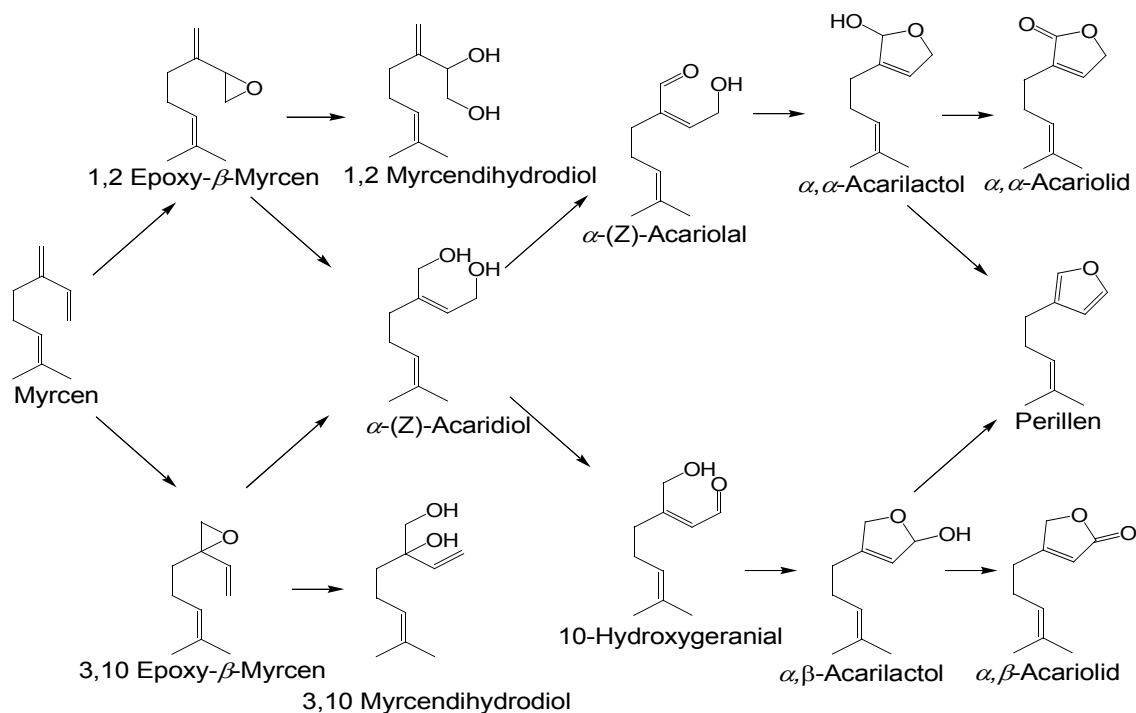


Abbildung 1: Biosynthese von Perillen mit *P. ostreatus* (nach HAPETTA, 2006)

Über Supplementierungsversuche konnten α -(Z)-Acaridiol, α, α -Acarilactol, α, β -Acarilactol sowie 3,10-Epoxy- β -myrcen als Zwischenstufen der Perillinbiosynthese identifiziert werden (KRINGS *et al.*, 2008a; KRINGS *et al.*, 2008b). Epoxydierte β -Myrcene und Terpenlactone konnten zudem identifiziert und Seitenwegen zugeordnet werden. α -(Z)-Acaridiol wurde im Bioreaktor nahezu quantitativ zu Perillen umgewandelt (KRINGS und BERGER, 2008c). Limitierende enzymatische Schritte in der Perillinsynthese konnten durch diese Arbeiten auf die Stufe der Epoxydierung des β -Myrcens sowie auf die Hydrolyse des 3,10-Epoxy- β -Myrcens eingegrenzt werden. Bisher sind weder biochemische noch molekularbiologische Charakteristika der an der Biogenese von Perillen beteiligten Enzyme bekannt.

Vorversuche mit lyophilisierter Biomasse von *P. sapidus* ließen auf einen weiteren Bildungsweg von Perillen über Myrcenendoperoxide schließen (siehe Abbildung 2).

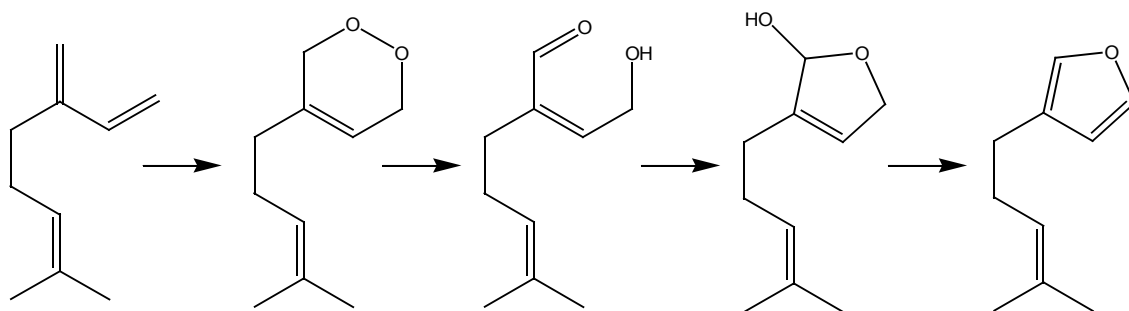


Abbildung 2: Postulierte Perillen Bildung über Myrcenendoperoxide (nach KRINGS *et al.*, 2008d)

Mit dieser Arbeit sollten die an der Biokonversion von β -Myrcen zu Perillen beteiligten Metabolite identifiziert sowie entsprechende Enzyme isoliert und charakterisiert werden. Hierzu wurden Lyophilisate verschiedener *Pleurotus* Arten herangezogen, deren Perillenbildungsrate über Aktivitätsscreenings zu bestimmen war. Zur Bestätigung oder Korrektur des für *P. ostreatus* postulierten Perillenbiogeneseweges sollten isotope-markierte Substrate zum Einsatz kommen. Zusätzlich sollte durch Synthese und Supplementierung von Myrcenendoperoxiden deren Bedeutung innerhalb des Biosyntheseweges untersucht werden. Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen sollten Methoden zur Visualisierung entsprechender Enzymaktivitäten entwickelt werden. Mit biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten zur Isolierung der entsprechenden Biokatalysatoren auf Protein- und DNA-Ebene sollte das Projekt zum Abschluss geführt werden.

1.5.2 Biotransformation des Sesquiterpens Valencen

(+)-Nootkaton [4,4a-dimethyl-6-prop-1-en-2-yl-3,4,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2-on] ist ein Sesquiterpenoid, das einen bitteren Geschmack aufweist und nach Grapefruit duftet. Es findet Verwendung als Riech- und Duftstoff in Kosmetikartikeln und Arzneimitteln sowie als Aromastoff in Lebensmitteln. Auch wird seine Wirkung als Repellent diskutiert (MIYAZAWA *et al.*, 2000). (+)-Nootkaton besitzt - gelöst in Wasser - einen sehr niedrigen Geruchsschwellenwert von $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (HARING *et al.*, 1972), ist jedoch trotz seiner hohen Halbdauer für viele Anwendungen zu teuer (KRAFT *et al.*, 2000).

Isoliert wurde Nootkaton erstmals aus *Chamaecyparis nootkatensis* (ERDTMAN und HIROSE, 1962), einem Zypressengewächs, das in Nordamerika beheimatet

ist. Auch in Grapefruit (*Citrus paradisi*) (MACLEOD und BUIGES, 1964) und anderen Zitrusfrüchten (SAWAMURA und KURIYAMA, 1988; ORTUÑO *et al.*, 1995) kommt Nootkaton vor. Der (+)-Nootkatongehalt in Grapefruitöl beträgt ca. 0,5 %. Er ist damit für eine ökonomische Isolierung aus dieser Quelle zu niedrig.

Die Darstellung von (+)-Nootkaton über die Oxidation von (+)-Valencen, welches bei der Orangensaftproduktion in Form von Orangenschalenöl anfällt, ist in zahlreichen Publikationen und Patenten beschrieben. (+)-Nootkaton ist über chemische wie auch biochemische Verfahren aus diesem Substrat zugänglich.

Die chemosynthetische Herstellung von (+)-Nootkaton erfolgt hierbei meist durch Verwendung starker Oxidationsmitteln wie *t*-Butylchromat (HUNTER und BROGDEN, 1965), Natriumdichromat (SHAFFER *et al.*, 1975) oder *t*-Butylperacetat (WILSON und SHAW, 1978). *t*-Butylhydroperoxid eignet sich als Oxidationsmittel bei Verwendung eines immobilisierten Metallkomplex-Katalysators (SALVADOR und CLARK, 2002).

Durch Photooxygenierung von Valencen ist unter Verwendung geeigneter Sensibilisatoren wie Bengalrosa die Darstellung von Nootkaton möglich (SCHULTE-ELTE *et al.*, 1970; OHLOFF, 1971). Um eine vollständige Umsetzung der entstehenden Hydroperoxide zum Nootkaton zu erzielen, können diese mit starken anorganischen Basen behandelt werden. Zur Peroxidspaltung eignen sich auch Salze von Schwermetallen, beispielsweise Cu(I)-Salze (SCHULTE-ELTE *et al.*, 1970). Des Weiteren sind eine Vielzahl von Synthesestrategien beschrieben, die von anderen Edukten als Valencen ausgehen (PESARO *et al.*, 1968; DASTUR, 1973; MARSHALL und RUDEN, 1971; YANAMI *et al.*, 1980; TORII *et al.*, 1982; MAJETICH *et al.*, 1985; SAUER *et al.*, 2006).

Über biotechnologische Ansätze kann (+)-Nootkaton als natürlicher Aromastoff zugänglich gemacht werden (siehe Kapitel 1.3). Zahlreiche biokatalytische Verfahren, die eine Darstellung von (+)-Nootkaton aus Valencen ermöglichen sind beschrieben. Publiziert wurden Verfahren, bei denen prokaryotische oder eukaryotische Ganzzellsysteme sowie isolierte (rekombinate) Enzyme eingesetzt werden:

Beschrieben sind Biotransformationen mit *Enterobacter*- (DHAVLIKAR und ALBROSCHKEIT, 1973) und *Rhodococcus*- Arten (OKUDA *et al.*, 1994), mit Grünalgenarten wie *Chlorella* (FURUSAWA *et al.*, 2005) sowie zahlreiche

biokatalytische Verfahren, bei denen Zellkulturen höhere Pflanzen wie beispielsweise Grapefruit (*Citrus paradisi*) (DRAWERT *et al.*, 1984), weitere Citrus-Arten (DEL RÍO, *et al.* 1991) sowie Zichorienwurzeln (*Cichorium intybus*) (DE KRAKER *et al.*, 2003) eingesetzt werden. In einer aktuellen Arbeit von Sakamaki *et al.* (2005) werden Pflanzenzellkulturen von *Gynostemma pentaphyllum*, *Caragana chamlagu* und *Hibiscus cannabinus* verwendet. Durch Submerskultivierung des Ascomyceten *Chaetomium globosum* sowie mit lyophilisierten Pilzmyzel des Basidiomyceten *P. sapidus* konnte (+)-Nootkaton biotechnologisch durch höhere Pilze dargestellt werden (KASPERA *et al.*, 2005b; KASPERA, 2004).

Arbeiten mit isolierten Enzymen beschreiben Laccasen (HUANG *et al.*, 2001), P450cam- Enzyme (SOWDEN *et al.*, 2005), Lipoxygenasen (MULLER *et al.*, 1998) und Ligninperoxidase (WILLERSHAUSEN und GRAF, 1991), die zur spezifischen Oxidation von Valencen genutzt werden können.

Die meisten bisher beschriebenen Verfahren liefern sehr niedrige molare Ausbeuten oder benötigten sehr lange Transformationszeiten¹⁵, weshalb es bislang nicht gelungen ist, ein biotechnologisches Verfahren zur Nootkatonproduktion im industriellen Maßstab zu etablieren. Pressemitteilungen der jungen Biotechnologieunternehmen Allylix und IsoBionics ist zu entnehmen, dass diese die Bereitstellung von Nootkaton mittels rekombinanter Mikroorganismen planen (FRITZ, 2008; www.isobionics.com/pagina11.html¹⁶).

Im Vergleich zu allen bislang bekannten biotechnischen Produktionssystemen werden mit Lyophilisaten von *P. sapidus* bei molaren Umsatzraten von bis zu 45 % die höchsten Raum-Zeitausbeuten an Nootkaton erzielt (FRAATZ, 2007). Neben Nootkaton werden bei dieser nebenproduktarmen Oxidation des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs Valencen (70 %ig aus Orangenschalenöl) hauptsächlich die Valencenalkohole α - und β -Nootkatol gebildet (siehe Abbildung 3).

¹⁵ Für einen detaillierten Vergleich der verschiedenen Transformationssysteme siehe auch FRAATZ, 2007

¹⁶ Aufruf der Seite: 19.01.2009

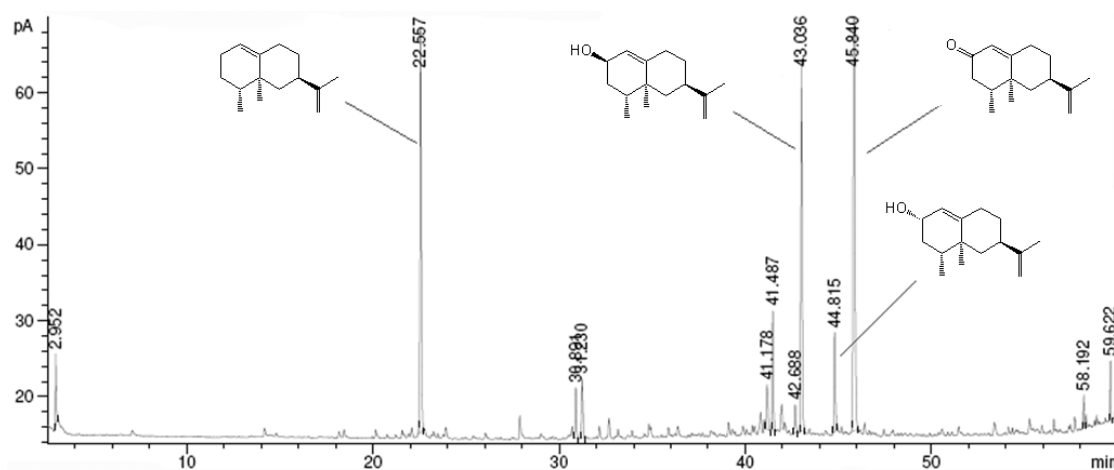


Abbildung 3: Biotransformation von (+)-Valencenol zum (+)-Nootkaton mit Lyophilisaten des Basidiomyceten *P. sapidus* (GC-FID-Chromatogramm, Methode nach FRAATZ, 2007).

Die Darstellung von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencenol mittels *P. sapidus* erfolgt in einem mehrstufigen Prozess: Zunächst wird durch submerse Kultivierung des Pilzes Biomasse produziert und durch Ernte und Lyophilisierung der Biokatalysator bereitgestellt und lagerfähig (-20°C) gemacht. Anschließend wird die Transformation des Substrates in Anwesenheit des Biokatalysators in einem Puffersystem durchgeführt. Die Abtrennung der Zielprodukte erfolgt mittels Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (siehe Abbildung 4).

Jeder dieser Schritte verfügt über Optimierungspotenzial, von denen bereits einige durchgeführt werden konnten. Durch Arbeiten von FRAATZ (2007) konnte beispielsweise das verwendete Vollmedium im Hinblick auf die Kosten, durch Substitution der Kohlenstoffquelle Glucose durch PalantinosTM-Melasse und der Stickstoffquelle L-Asparagin durch Ammoniumnitrat, um 70 % reduziert werden.

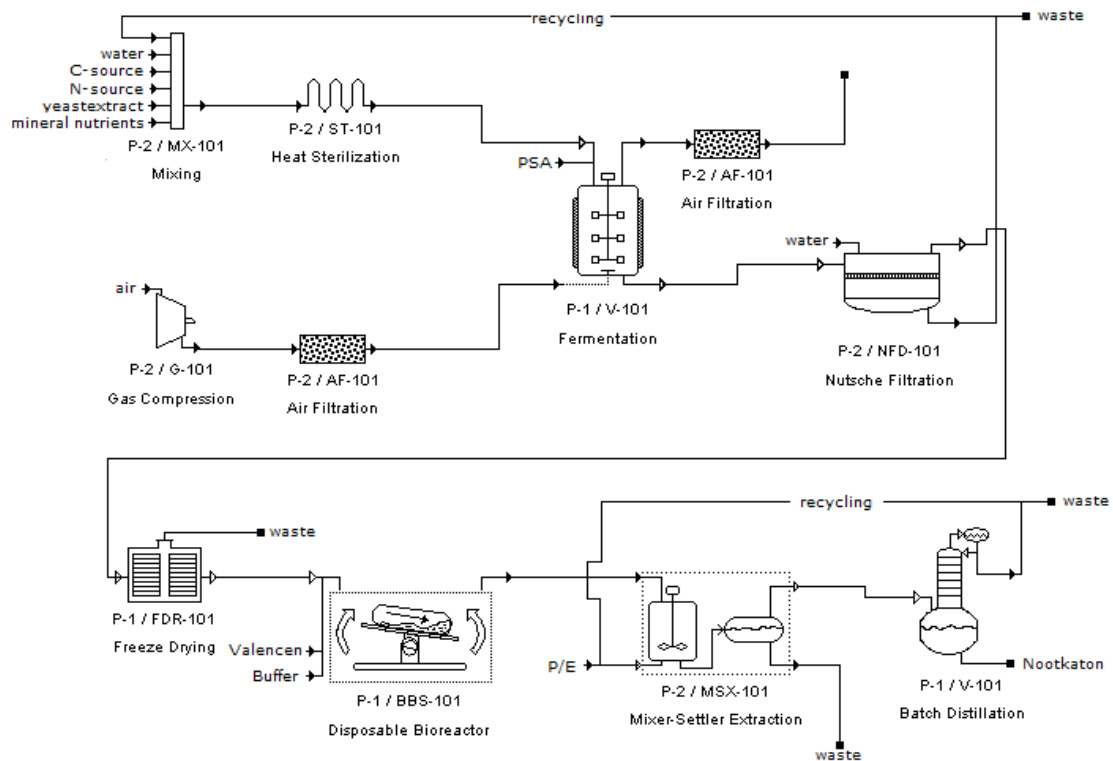


Abbildung 4: Fließschema des mehrstufigen Prozess zur Darstellung von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen mittels *P. sapidus*.

2007 konnte das entsprechende (+)-Valencen oxidierende Enzym über eine dreistufige chromatographische Trennung mittels FPLC gereinigt werden und durch *de novo* Sequenzierung mittels ESI-MS/MS Peptidsequenzen mit Homologien zu Lipoxygenasen aus *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* und *Gibberella moniliformis* erhalten werden (FRAATZ, 2007). Inzwischen konnte die gesamte cDNA-Sequenz kloniert und sequenziert werden (FRAATZ *et al.*, 2009). Die übersetzte Proteinsequenz zeigte eine Homologie von 44% zu einer Lipoxygenase aus dem Ascomyceten *Gibberella moniliformis*. Mit dieser Arbeit sollte die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton mit Lyophilisaten von *P. sapidus* hinsichtlich der Raum-Zeit Ausbeuten an (+)-Nootkaton optimiert werden. Hierzu war die Kenntnis möglicher nichtflüchtiger metabolischer Zwischenstufen erforderlich. Homologiestudien zu dem klonierten Gen des Enzyms legen die Bildung des Nootkatons über Hydroperoxide nahe (siehe Abb. 5).

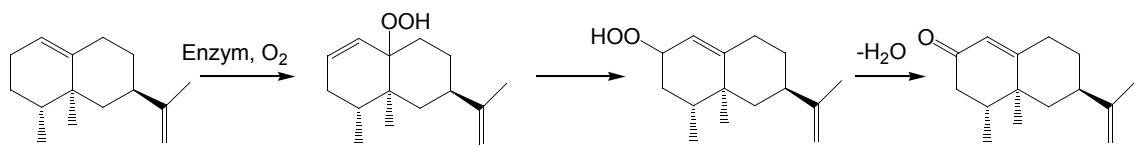


Abbildung 5: Hypothetische enzymatische Bildung von Nootkaton über Hydroperoxide.

Über chromatografische Verfahren (DC, HPLC) sollten nicht flüchtige Biotransformationsprodukte isoliert und anschließend über spektrometrische (GC-MS, LC-MS, HPLC-DAD, NMR) und chemische (spezifische Färbereagenzien, Derivatisierung, Oxidation) Verfahren identifiziert werden. Ein verbessertes Verständnis des Transformationssystems sollte schließlich zur Optimierung der Umsatzrate genutzt werden. Zudem sollte der energie- und zeitintensive Schritt der Lyophilisierung durch ökonomischere Aufschlussmethoden ersetzt werden. Ein weiteres Ziel bestand in der Entwicklung eines ökologischen und ökonomischen Downstreamprozesses. Hierzu waren Lösungsmittel sowie verschiedene unpolare Adsorbentien auf ihre Eignung hinsichtlich einer spezifischen Produktabtrennung zu testen.

1.5.3 Hydrolyse von Capsanthindiestern

Capsanthin [(3R,3'S,5'R)-3,3'-Dihydroxy- β,κ -carotin-6-on] ist ein oxyfunktionalisiertes Tetraterpen. Es gehört zur Gruppe der Xanthophylle. Capsanthin ist fettlöslich und weist in Lösung eine orange-rote Färbung auf. Es ist als E 160c in Deutschland zum Färben von Lebensmitteln beziehungsweise zum Erzielen von Farbeffekten bei Lebensmitteln zugelassen. Eingesetzt wird es zum Färben von Süßwaren, Fleisch- und Fischkonserven und Würstchen. Auch zum Färben von Kosmetika findet Capsanthin Verwendung. Als Futtermittelzusatzstoff wird Capsanthin vor allem in der Geflügelmast und Eierproduktion eingesetzt, um die Haut- und Eidotterpigmentierung zu verbessern.

Gewonnen wird Capsanthin hauptsächlich in Form von Paprikaoreolesin aus der Frucht der Paprika (*Capsicum annum*), wobei Capsanthin das Hauptcarotinoid darstellt. Capsanthin und andere Xanthophylle liegen in reifen Paprikafrüchten zu 80 % in Form von Diestern vor. Studien zur Bioverfügbarkeit

belegen, dass eine optimale Resorption aber nur mit freien Xanthophyllen gewährleistet werden kann (ETOH *et al.*, 2000). Um freie Xanthophylle für färbende Formulierungen zu erhalten, werden Xanthophyllester chemisch verseift (siehe Kapitel 1.2.2).

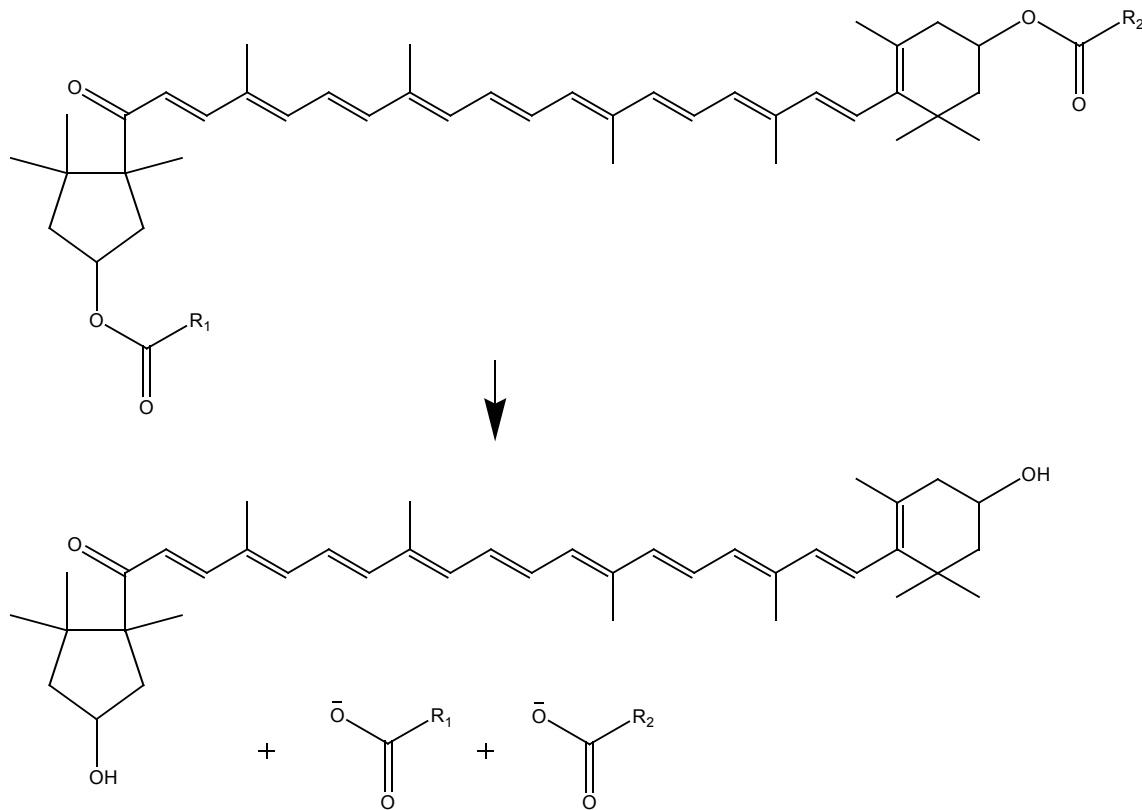


Abbildung 6: Hydrolyse von Capsanthinestern.

Ein enzymatisches Verfahren zur Hydrolyse von Xanthophylleestern könnte höhere Produktqualitäten unter Einsparung erheblicher Kosten für Energie und Arbeitsschutz liefern.

Arbeiten, die die enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern beschreiben wurden beispielsweise von LIU *et al.* (1998) und KHACHIK *et al.* (1997) durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde die Hydrolyse von Lutein-, Zeaxanthin- und β -Cryptoxanthinestern in Humanmilch und Serum durch eine *Candida rugosa*-Lipase untersucht. *C. rugosa*-Lipase ermöglichte die Teilhydrolyse von Capsanthinestern (BREITHAUPT, 2000). Ein umfangreiches Screening von kommerziell verfügbaren Lipasen, hinsichtlich der Eignung zur enzymatischen Carotinoidesterhydrolyse, wurde 2003 von ZORN *et al.* durchgeführt. Capsanthinester wurden in dieser Untersuchung ausschließlich von Lipasen aus *Pseudomonas* und *Candida* umgesetzt.

Arbeiten mit submers kultivierten Basidiomyceten führten zur Identifizierung von *P. sapidus* als hocheffizienten Capasanthinesterspalter (ZORN *et al.*, 2003). Das für die Xanthophyllesterhydrolyse verantwortliche Pilzenzym konnte im Kulturüberstand von *P. sapidus* lokalisiert werden und schließlich über mehrere chromatographische Stufen gereinigt sowie proteinbiochemisch charakterisiert werden (ZORN *et al.*, 2005a). Nach massenspektrometrischer *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS wurde das codierende Gen *via* Polymerase-Kettenreaktion aus einer cDNA-Bank von *P. sapidus* kloniert. Die Sequenzhomologien zu bekannten Lipasen aus *Candida* betragen maximal 44%.

Mit dieser Arbeit sollte die codierende Region der Lipase aus *P. sapidus* (*lip2*), bestehend aus 1641 bp, in *E. coli* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* spezifische Expressionsvektoren ligiert werden. Durch Expression der cDNA war anschließend die Produktion von aktiver rekombinanter Lip2 geplant. Dies sollte entweder direkt oder durch geeignete *Refolding*-Strategien zur Reaktivierung von *Inclusion Bodies* erreicht werden. Anschließend sollte der Einfluss der Wildtyp eigenen Signalsequenz sowie der Einfluss von verschiedenen C-terminalen Tags auf die Expression untersucht werden.

2 *Pleurotus* species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides

Reprinted from Bioresource Technology, 100, 2855-2860, Copyright 2009, with permission from Elsevier.

2.1 Abstract

Enzymatic synthesis of furanoterpenoids from β -myrcene and related monoterpenes was observed using a solubilised enzyme fraction of mycelium lyophilisates of several *Pleurotus* species. The initial enzymatic step, the incorporation of molecular oxygen into the conjugated 1,3-diene moiety, was similar to a 2 + 4 cycloaddition of 1,3-dienes with dienophilic $^1\text{O}_2$, and was followed by a non-catalysed degradation sequence leading to the furans. The cyclic peroxides 3,6-dihydro-4-(2-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)ethyl)-1,2-dioxine and 5-(3,6-dihydro-1,2-dioxin-4-yl)-2-methylpentan-2-ol were identified as key intermediates. Biotransformation of β -myrcene in ^{18}O -labelled HEPES-buffer did not yield a detectable label in perillene, so a water addition to 3,10-epoxy- β -myrcenes as an alternative was ruled out. The pathway suggested presents a substantiated biogenetic scheme for the formation of monoterpene furans and opens biotechnological access to valuable natural flavour compounds, such as perillene and rosefurane. Only one metabolite, identified as the new natural compound 6-methyl-2-methylene-hept-5-enal, carried the ^{18}O -label. The enzymatic formation of this compound through a 1,2-endoperoxide (3-(5-methyl-1-methylene-hex-4-enyl)-[1,2]-dioxetane) is suggested. The label may simply result from a chemical oxygen exchange between the carbonyl group and the ^{18}O -labeled water.

Keywords: *Pleurotus sapidus*, β -myrcene, endoperoxide, rosefurane, perillene

2.2 Introduction

Furanoterpenoids are widely distributed in *Eukarya*. They occur as trace constituents of numerous essential plant oils and impart characteristic odour impressions. Perillene [6], for example, shows a fresh citrus-flowery odour, while rosefuran [21] has a strong flowery rose-like note (OHLOFF, 1994). In the kingdom *Animalia* perillene is a pheromone of insects, for example in the wasp *Alloxysta pleuralis* (HUBNER *et al.*, 2002), some species of ants (LONGHURS *et al.*, 1979; BERNADI *et al.*, 1967) and in mites (DUSBABEK *et al.*, 1998; HIRAOKA *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 1989). Because of the low natural abundance of perillene (max. 0.18% of the essential oil in fresh leaves of a perillene-rich chemo-type of Chinese basil) an industrial recovery from plant sources appears impossible (HONDA *et al.*, 1994). This has stimulated the search for biotechnological options of production.

About 25 years ago perillene [6] was found in a basidiomycete of the *genus Phallus* (KIKUCHI *et al.*, 1984). Later it was discovered that submerged cultures of some basidiomycetes tolerated millimolar levels of monoterpenes, such as β -myrcene, and oxidised them to volatile compounds (KRINGS and BERGER, 1998; SCHRADER, 2007; SCHRADER and BERGER, 2001). Low concentrations of perillene ($< 1 \text{ mg l}^{-1}$) accumulated in the nutrient medium of a *Pleurotus* strain (BUSMANN and BERGER, 1994). Recently, supplementation of the liquid culture medium of *Pleurotus ostreatus* with various trideutero-labelled precursors revealed an intracellular pathway of perillene formation starting with the epoxidation of β -myrcene at the conjugated double bonds (KRINGS *et al.*, 2008a, b): Hydrolysis of 3,10-epoxymyrcene yielded α -(Z)-acardiol, and subsequent oxidation of the 1,4-diol gave the lactols, and finally perillene [6] and both acariolides [5; 5'].

Based on these results, obtained with a submerged cell culture, an attempt should be made to isolate the involved enzyme(s) using a solubilised enzyme fraction of mycelium lyophilisate. Surprisingly, different intermediates were encountered. The soluble enzyme generated perillene *via* a second pathway reported here.

2.3 Methods

2.3.1 Basidiomycetes

P. ostreatus (DSM 1833; DSM 3344; DSM 5332; DSM 5333; DSM 11191), *P. sajor-caju* (DSM 5339), *P. sapidus* (DSM 8266; CBS 195.92), *P. eryngii* (CBS 613.91) and *P. lampas* (CBS 323.49) were obtained from the culture collections of DSMZ, Braunschweig, Germany, and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, The Netherlands.

2.3.2 Chemicals

Agarose and HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany); magnesium sulfate, iron (III) chloride $\times 6\text{H}_2\text{O}$, calcium chloride $\times 2\text{H}_2\text{O}$, sodium chloride, and copper sulfate $\times 7\text{H}_2\text{O}$ were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany); manganese sulfate monohydrate, ammonium nitrate, cholic acid, β -myrcene, β -(*E*)-ocimene, BHT [butylated hydroxytoluene], H_2^{18}O (98% ^{18}O) and dipotassium hydrogen phosphate were from Fluka (Seelze, Germany); D-(+)-glucose monohydrate, L-asparagine monohydrate, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, hydrochloric acid and EDTA were from Merck (Darmstadt, Germany); OBAS [4-octylbenzol amidosulfobetaine] was obtained from Chalbiochem (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany) and zinc sulfate $\times 7\text{H}_2\text{O}$ was from J.T. Baker B.V. (Deventer, The Netherlands). Rose Bengal was from Chemos (Regenstauf, Germany) and ethanol (96%) was from Kraul & Wilkening and Stelling (Hannover, Germany). β -myrcene, β -(*E*)-ocimene, dichloromethane, methanol and azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) were distilled before use. High-purity water was prepared with an E-pure water purification system (Barnstead, Dubuque, IA). Hydroxymyrcene (>99%) was donated by Erich Ziegler GmbH, Aufseß, Germany

2.3.3 Production of lyophilised biomass

Mycelia of the studied fungi were maintained as described previously (LINKE *et al.*, 2005). Biomass was collected from the submerged cultures after 5 days, separated from the supernatant by centrifugation, and lyophilised, using VaCo 2-5 (Zirbus, Germany).

2.3.4 Solubilisation

Lyophilised biomass (20 g l⁻¹) was shaken at 150 rpm in a 200 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] buffer (pH 5.5) containing 4 g l⁻¹ cholic acid and 0.25 g l⁻¹ OBAS [4-octylbenzyl amidosulfobetaine]. For the labelling experiment the buffer was prepared with H₂¹⁸O (98%). After one h the insoluble fraction was removed by centrifugation (100,000g). The filtered supernatant (0.45 µm) was used for the biotransformation.

2.3.5 Biotransformation

Soluble enzyme fraction (1.5 ml) was treated with 4 µl of the respective precursor and incubated for 16 h at 24 °C and 150 rpm in the absence of light in 4 ml flasks. The solution was extracted with 1.5 ml azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) after adding BHT (*t*-butylated hydroxytoluene dissolved in methanol) as an internal standard. After drying the organic phase over Na₂SO₄ the products were analysed by means of high resolution gas chromatography (HRGC).

2.3.6 Inhibitor studies

Carbon monoxide inhibitory experiments were carried out by bubbling CO (quality 3.7) through the enzyme solution for 2 min just before biotransformation was started. In the same manner nitrogen was bubbled for 2 min through the enzyme solution as a control. The headspace of the flasks was aerated before

the biotransformation was started. Inhibitory experiments with N₂ as a cover gas were carried out by filling the headspace of the flasks.

2.3.7 HRGC and HRGC-MS analysis

HRGC and HRGC-MS (mass spectrometry) was carried out as described previously (KRINGS *et al.*, 2008a).

2.3.8 NMR

¹H- and ¹³C NMR identification was performed on a BRUKER Advance DRX-500 (¹H at 500 MHz, ¹³C at 125 MHz) in CDCl₃.

2.3.9 Synthesis of bioconversion products

Epoxymyrcenes, myrcenedihydrodiols and acari-type compounds were synthesised as described elsewhere (KRINGS *et al.*, 2008a).

6-Methyl-2-methylene-hept-5-enal [8] was obtained in a two step synthesis: 6-methyl-2-methylene-hept-5-en-1-ol was synthesised as described by TAKANO *et al.* (1984). The product (2 mmol) was added to a solution of pyridinium dichromate (PDC, 6 mmol in 10 ml of DMF and 10 ml of CH₂Cl₂). The solution was stirred for 2 h, hydrolysed in water, and subsequently extracted three times with pentane. The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using hexane as the eluent affording the pure aldehyde in a total yield of 28%.

6-Methyl-2-methylene-hept-5-enal [8], HR-EIMS *m/z* 138.1046 (calcd for C₉H₁₄O, 138.10458), KI (ZB-WAX): 1382; MS[*m/z*(%)]: 138, M⁺(2), 123(2), 120(2), 109(4), 95(19), 79(6), 77(6), 69(70), 67(25), 65(8), 55(9), 53(23), 51(12), 50(7), 42(7), 41(100), 40(21), 39(88), 38(8).

¹H NMR(CDCl₃): δ: 1.64 (3H, bs, -CH₃ trans), 1.74 (3H, bs, -CH₃ cis), 2.28 (2H, m, CH-CH₂-CH₂), 2.48 (2H, m, CH₂-CH₂-C), 5.08 (H, m, C=CH-CH₂), 6.01 (H, s, H₂C=C), 6.23 (H, s, H₂C=C), 9.56 (1H, d, C-CH=O)

^{13}C NMR(CDCl_3): d: 18.1 ($-\text{CH}_3$ cis), 22.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}$), 26.1 ($-\text{CH}_3$ trans), 28.4 ($\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 123.6 (C=CH-C), 133.0 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 134.6 (C=C-CH_3), 150.3 (C-C-CO), 195.2 (C-CH=O)

Synthesis of 3,6-dihydro-4-(2-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)ethyl)-1,2-dioxine [10] and 5-(3,6-dihydro-1,2-dioxin-4-yl)-2-methylpentan-2-ol [15] was carried out according to the method of MATSUMOTO and KONDO (1975).

3,6-Dihydro-4-(2-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)ethyl)-1,2-dioxine [10], RI (VF-5 ms /ZB-WAX): 1460/1713, MS, m/z (%): 184, M^+ (trace), 166(trace), 154 (trace), 137(2), 125(5), 109(8), 85(94), 82(34), 81(50), 79(60), 77(28), 69(45), 68(75), 67(80), 59(100), 57(38), 55(35), 53(32), 43(65), 41(95), 39(70).

^1H NMR(CDCl_3): d: 1.29 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.33 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.63 (2H, m, $-\text{C}_{\text{epoxide}}\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.19 (2H, m, $\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.76 (1H, qn, $\text{CH}_2\text{-CH-C}_{\text{epoxide}}$), 4.50 (2H, s, $\text{C-CH}_2\text{-O}$), 4.59 (2H, s, $-\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 5.73 (1H, s, $-\text{C=CH-CH}_2$)

^{13}C NMR(CDCl_3): d: 24.8 ($\text{C}_{\text{epoxide}}\text{-CH}_3$), 26.8 ($\text{C}_{\text{epoxide}}\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 29.2 ($\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 58.6 ($\text{C}_{\text{epoxide}}\text{-CH}_3$), 63.7 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{epoxide}}\text{-C}_{\text{epoxide}}$), 70.0 ($\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 72.3 ($\text{C-CH}_2\text{-O}$), 117.9 (C=CH-CH_2), 134.8 ($\text{CH}_2\text{-C=CH}$)

5-(3,6-Dihydro-1,2-dioxin-4-yl)-2-methylpentan-2-ol [15], RI (VF-5 ms): 1495, MS, m/z (%): 186, M^+ (not detected), 168(10), 153(7), 150(12), 135(3) 95(33) 94(100), 82(22), 81(22), 59(77), 43(45).

^1H NMR(CDCl_3): d: 1.12 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.12 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 1.30 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.40 (H, m, $-\text{COH-CH-CH}_2$), 1.74 (1H, qn, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}$), 4.38 (2H, s, $\text{C-CH}_2\text{-O}$), 4.44 (2H, s, $-\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 5.33 (1H, s, $-\text{C=CH-CH}_2$)

^{13}C -NMR(CDCl_3): d: 21.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 29.2 (COH-CH_3), 32.7 ($\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 43.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COH}$), 69.7 ($-\text{COH}$), 69.7 ($\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 72.2 ($\text{C-CH}_2\text{-O}$), 117.6 (C=CH-CH_2), 135.7 ($\text{CH}_2\text{-C=CH}$)

6-Methyl-5,6-epoxy-2-methylene-hept-5-enal [13] RI (ZB-WAX): 1639, MS, m/z (%): 154, M^+ (trace), 139(1), 136(1), 111(12), 96(79), 95(77), 85(18), 81(18), 67(82), 59(100), 43(60), 41(95)

6-Hydroxy-6-methyl-2-methylene-hept-5-enal [18] RI (ZB-WAX): 1853, MS, m/z (%): 156, M^+ (trace), 141(1), 138(1), 123(4), 109(5), 98(20), 95(21) 83(19), 79(15), 69(26), 59(100), 43(76), 41(56), 39(44).

2.4 Results and discussion

2.4.1 Solubilisation of active enzyme fractions from fungal mycelium lyophilisates

The active biomass of several *Pleurotus* species was separated by centrifugation, freeze dried and re-suspended in the presence of a detergent in a HEPES-buffer. Among a series of detergents and combinations tested a mixture of 4.0 g l⁻¹ cholic acid and 0.25 g l⁻¹ 4-octylbenzol amidosulfobetaine HEPES-buffer was most suitable for the solubilisation of an active enzyme. The bioconversion was carried out using the supernatant in 1.5 ml micro-assays for 16 h.

2.4.2 Volatile products

Fig. 7 shows the peak concentration of the main β -myrcene [1] bioconversion product perillene [6] using the soluble fraction of several *Pleurotus* lyophilisates.

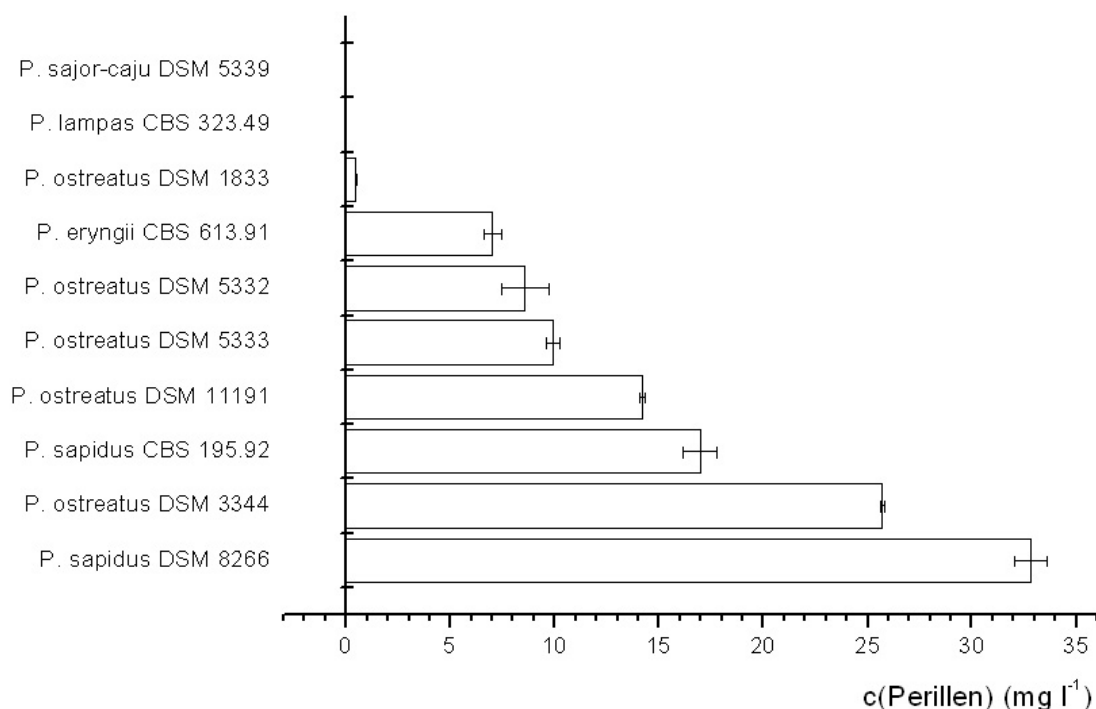


Abbildung 7: Activity screening of basidiomycetes of the genus *Pleurotus*. The soluble enzyme fraction was treated with β -myrcene for 16 h in absence of light. Perillene concentration was measured by GC-FID after extracting the solution as described under *Material and Methods*. Quantification was performed according to the standard BHT.

Inactivated (cooking in HEPES-buffer for 20 min) lyophilisates did not give any perillene or other transformation products.

The soluble enzyme fractions of *P. sapidus* and *P. ostreatus* did not show qualitative differences in the metabolite spectrum, but *P. sapidus* (DSM 8266) yielded the highest perillene concentration; thus, lyophilisates of *P. sapidus* (DSM 8266) were used in the following.

In liquid cultures of *P. ostreatus* perillene formation started with a P450 monooxygenase catalysed epoxidation of the conjugated double bonds of β -myrcene [1]. Of all epoxides found, only the 3,10-epoxide was opened in an L-asparagine catalysed reaction to α -(Z)-acaridiol [2-(4-methyl-3-pentenyl)-2-butene-1,4-diol]. All of the bioconversion products generated with submerged cultures of *P. ostreatus* (KRINGS *et al.*, 2008a) were found in as well in the soluble enzyme fractions of *P. ostreatus* and *sapidus* (Table 1) but in higher concentrations, if mycelium lyophilisates were the source of the enzyme(s). Based on reference substances, mass spectra and RI (KOVÁTS, 1954) major transformation products (Table 1) were identified, among them α -(Z)-acaridiol. This compound was shown to be key in perillene [6] formation using labelled substrates and submerged cultures of *P. ostreatus* (KRINGS *et al.*, 2008a, b), and it was converted almost completely to perillene in a fed-batch bioreactor process (KRINGS and BERGER, 2008).

To confirm that the soluble enzyme fraction of lyophilised mycelium converted β -myrcene [1] along the previously established pathway, the biotransformation was either carried out either in the presence of the P450 inhibitor carbon monoxide, or in a HEPES-buffer made up with ^{18}O -labeled water (98%). Surprisingly, upon saturation of the sample with CO the expected inhibition of the formation of perillene was not observed. In the complete absence of oxygen (medium and headspace), the generation of perillene stopped. The biotransformation of β -myrcene [1] conducted in ^{18}O -labeled HEPES-buffer resulted in the recovery of the oxygen label in just one compound: 6-methyl-2-methylene-hept-5-enal [8]. This C9 compound, however, cannot be associated with the perillene generation. Obviously, both oxygen atoms of the dioxygenated “acari-compounds” and the remaining oxygen atom of perillene originated from molecular oxygen, and not from water. Because α -(Z)- and α -(E)-acaridiol did not carry an oxygen label, another pathway to the “acari-

compounds” and perillene, besides the one described for liquid cultures of intact *P. ostreatus* cells (KRINGS *et al.*, 2008a, b), must exist.

2.4.3 The second pathway to furanoterpenoids

As the labelling experiment excluded water as the source of the oxygen atom, the pathway from β -myrcene [1] to perillene [6] must run through the intermediate formation of the six-membered 1,4-endoperoxide (Figure 8).

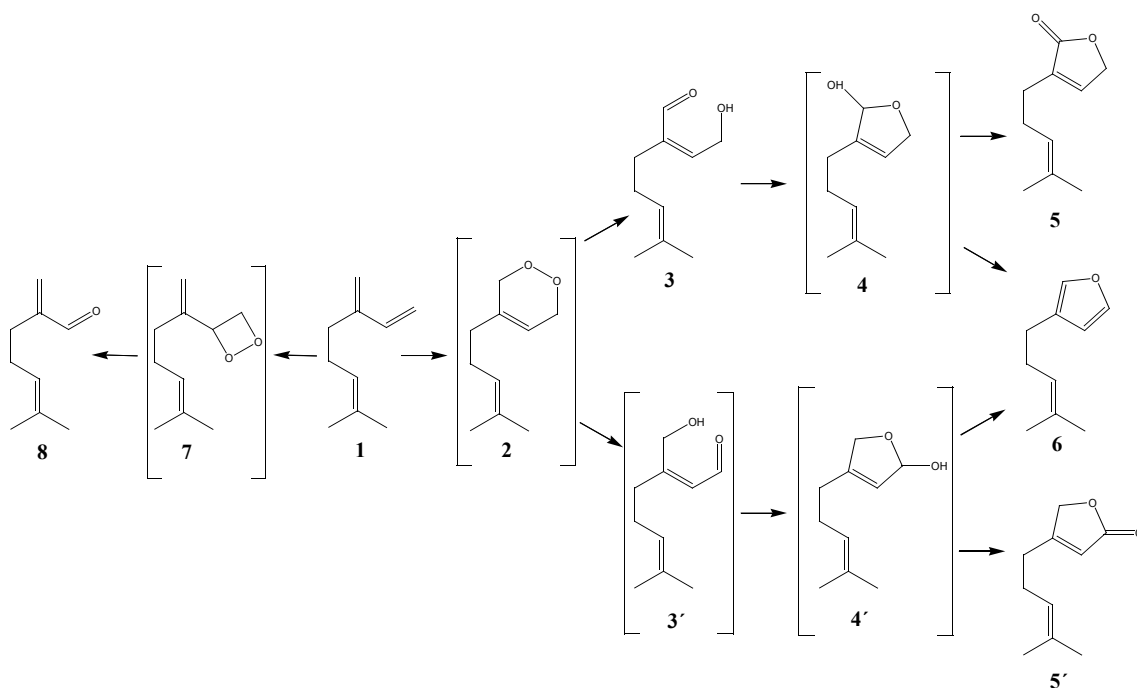


Abbildung 8: Enzymatic synthesis of 1,2-endoperoxide vs. 1,4-endoperoxide starting from β -myrcene; only the latter leads to perillene.

This pathway proceeds through acari-compounds, such as α -(Z)-acariolal [3] and the corresponding lactols [4]. Supplementation of the synthetic 1,4-endoperoxide [2] to a fungal lyophilisate should have confirmed this route. However, the assumed direct precursor 1,4-endoperoxide [2] was not amenable *via* photo-oxygenation (1,4-cyclo-addition) of β -myrcene because of the presence of the more reactive 6,7-double bond (MATSUMOTO and KONDO, 1975).

Therefore, indirect proof of the “endoperoxide”-pathway was achieved using the substrate analogues, 6,7-epoxy [9] and 7-hydroxy- β -myrcene [14], respectively. Both endoperoxides [10,15] were synthesised and introduced in transformation assays with and without the solubilised enzyme fraction of *P. sapidus*. Regardless of the presence of the active biocatalysator the

endoperoxide [10] degraded to epoxyperillene [11] in a molar yield of about 50% within 16 h (Table 1).

Table 1: Volatile compounds^a analysed in β -myrcene supplemented HEPES buffer of solubilised *P. sapidus* mycelium lyophilisate (1.5 ml buffer, 4 μ l β -myrcene, 16 h, 24 °C, 150 rpm)

Product	[mg l ⁻¹] \pm (x-) ^b
6,7-Epoxymyrcene [9]	56.4 \pm 1.0
1,2-Epoxymyrcene	4.9 \pm 0.1
3,10-Epoxymyrcene	3.6
6,7-Myrcenedihydrodiol	<0.1
6,7-Myrcenedihydrodiol	<0.1
3,10-Myrcenedihydrodiol	8.7 \pm 0.1
α -(Z)-Acaridiol	1.2
α -(E)-Acaridiol	17.5 \pm 0.3
α -(Z)-Acariolal [3]	12.5 \pm 0.2
α,α -Acariolide [5]	1.2
α,β -Acariolide [5]	3.4 \pm 0.1
Perillene [6]	32.8 \pm 0.8
6-Methyl-2-methylene-hept-5-enal [8]	31.4 \pm 0.8
6,7-Epoxyperillene [11]	<0.1
3,6-Dihydro-4-(2-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)ethyl)-1,2-dioxine [10]	<0.1

^aControls were found free (< 0.1 mg ml⁻¹) of bioconversion products

^bmeans of duplicates

In the same manner [15] reacted to hydroxyperillene in a molar yield of approximately 99% within 16 h (Table 1). Millimolar concentrations of Fe²⁺ reduced the reaction time to 1 h for both endoperoxides. This is in accordance with results of SUZUKI *et al.* (1989) who demonstrated that ferrous iron catalysed the decomposition of [10] to epoxyperillene [11]. Degradation products attributable to intermediate 1,2-endoperoxides were not detected with either substrate. Addition of 6,7-epoxymyrcene [9] produced the 6,7-epoxy-endoperoxide [10] and 6,7-epoxyperillene [11] in a ratio of 1:3. The addition of myrcenol [14] yielded 7-hydroxyperillene [16] and only traces of the endoperoxide precursor [15]. The 1,4-endoperoxide of β -myrcene appeared to be even less stable under conditions: attempts to locate [2] in chromatograms failed.

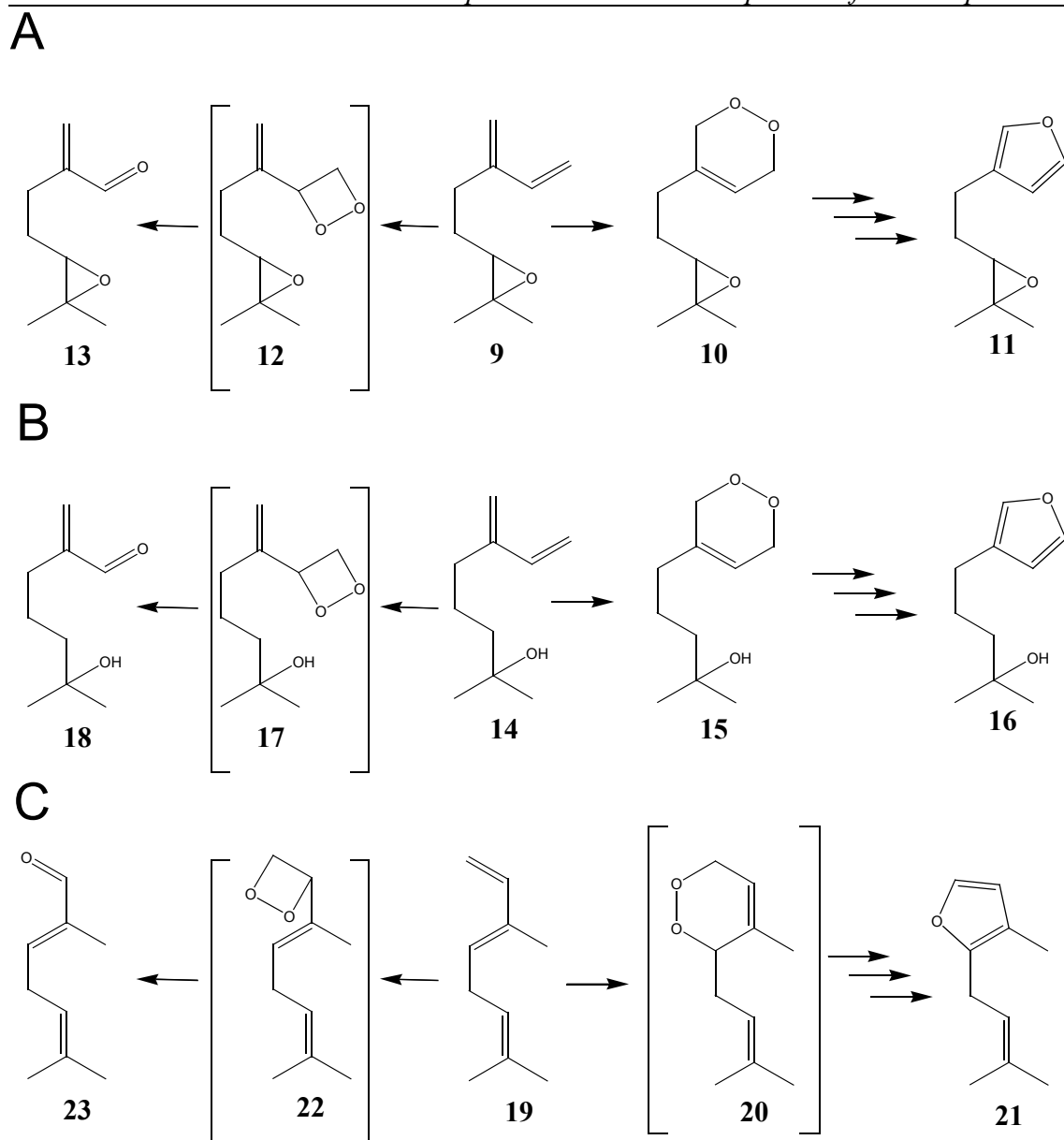


Abbildung 9: Enzymatic synthesis of epoxyperillen(A), hydroxyperillene(B) and rosefuran (C) from the respective analogues of β -myrcene.

The bioconversion of β -myrcene [1] and its oxygenated derivatives [9,14] indicated that the enzyme(s) involved possess a broad substrate specificity. Thus, (*E*)- β -ocimene [19], a structural isomer of β -myrcene, was examined as a possible precursor of rosefuran (Figure 9), an important building block of the essential oil of *Rosa damascensa* (BREITMEIER, 1999). Indeed, (*E*)- β -ocimene was converted to rosefuran [21], epoxyrosefuran and epoxyocimene, but in lower concentrations compared to β -myrcene (Tab. 2, Figure 9).

Table 2: Volatile compounds analysed in precursor supplemented HEPES buffer of solubilised *P. sapidus* mycelium lyophilisate (1.5 ml buffer, 1000 mg l⁻¹, 16 h, 24 °C, 150 rpm)

Precursor	Epoxymyrcene [9]	Epoxymyrcene [9] ^b	Endoperoxide [10]	Endoperoxide [10] ^b	Endoperoxide [10] + Fe ²⁺
[mg l ⁻¹] ± (x-) ^a					
Endoperoxide [10]	5.8 ± 0.2	-	528.3 ± 5.3	521.4 ± 7	<0.1
Epoxyperillene [11]	18.0 ± 0.2	-	473.5 ± 1.2	482.2 ± 8.1	992 ± 7.3
	Hydroxymyrcene [14]	Hydroxymyrcene [14] ^b	Endoperoxide [15]	Endoperoxide [15] ^b	Endoperoxide [15] + Fe ²⁺
[mg l ⁻¹]					
Endoperoxide [15]	<0.1	-	25.1 ± 7.2	32.9 ± 9.2	<0.1
Hydroxyperillene [16]	8.5 ± 0.1	-	972 ± 22	972 ± 22	1007 ± 49
	β-(E)-Ocimene [19]	β-(E)-Ocimene [19] ^b			
[mg l ⁻¹]					
Epoxyocimene	17.2 ± 0.3	-			
Epoxyrosefuran	8.4 ± 0.1	-			
Rosefuran	13.3 ± 0.1	-			

^a means of duplicates^b reaction in HEPES buffer (chemical blank)

The corresponding degradation product [23] of a presumed 1,2-endoperoxide [22] of the terminal double bond of (*E*)-β-ocimene was not found.

The non-enzymatic counterpart, the photo-oxidation of acyclic conjugated dienes was thoroughly investigated (MATSUMOTO *et al.*, 1985). Conventional sensitizers, such as Rose Bengal or tetraphenylporphyrin were extensively used. 1,4-Endoperoxides of acyclic monoterpenes, such as 6,7-epoxymyrcen, myrcenol and hymenthrene were prepared (MATSUMOTO and KONDO, 1975). TURNER and HERZ (1977) and SUZUKI *et al.* (1989) showed that these endoperoxides were substrates for the synthesis of 3-alkylfurans *via* Fe(II)- or Ru(II)-induced decomposition. A hypothetical model for the biogenesis of naturally occurring 3-alkylfurans was presented: DEMOLE *et al.* (1973) synthesised solanofuran (5-(4-methyl-2-furyl)-6-methylheptan-2-one) through a "diene-addition" of O₂ to a conjugated acyclic diene system and discussed a possible biogenetic significance. Another work proposed a furanoterpenoid biosynthetic pathway including a P450 activity in higher plants (GAIKWAD and MADYASTHA, 2002). The present inhibition experiments using CO showed that a P450 monooxygenase activity must be ruled out. This was supported by the H₂¹⁸O-experiment which indirectly showed that the oxygen of dioxygenated β -myrcene transformation products [3-5, 3'-5'] and of perillene derivatives [6,11,16] originated from atmospheric oxygen.

2.4.4 Identification of labelled 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal

One single metabolite eluting right in front of perillene in the gas chromatogram carried an ¹⁸O-label when the incubation buffer was made up using H₂¹⁸O. This compound was absent from the liquid medium of submerged cultured *P. ostreatus*, but occurred as a minor compound after cell disruption (KRINGS *et al.*, 2008a; HAPETTA, 2007). The mass spectrum of this compound was unknown (Wiley, NIST). The determination of the accurate mass (138.1046 u, empirical formula C₉H₁₂O (138.10458)) and the interpretation of the fragmentation pattern excluded a hydrogenated β -myrcene (*m/z* 138), but suggested the loss of a C1-unit from an oxygenated β -myrcene. The increase of the abundance of the isotopic peak at *m/z* 140 allowed the calculation of an approximate 50% ¹⁸O-label in this compound, if produced during a bioconversion carried out in ¹⁸O-labelled buffer. Considering the source substrate (β -myrcene) and the chromatographic and spectrometric data the structure of this compound was

supposed to be 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal [8]. This would well explain the approximate 50% ^{18}O -label as caused by an oxygen exchange between the carbonyl group and the ^{18}O -labeled water through intermediate geminal carbonyl hydrates.

The aldehyde [8] was synthesised and its structure confirmed by NMR: The ^{13}C -spectrum showed a molecule with 9 carbon atoms and two double bonds at positions 2,9 and 5,6, respectively, indicated by the large chemical shift of 4 C-atoms (123.6-150.3). The signal at a chemical shift of 195.2 was attributed to the C-atom of the aldehyde group. Two quaternary C-atoms at 150.3 (C2) and 134.6 (C6) were located at double bonds. The ^{13}C and the ^1H spectral data were in good agreement with published data of melonal [2,6-dimethyl-5-hepten-1-al] (AYER and ANDERSON, 1983), except from a large difference of the chemical shifts at C2 and C9 of melonal (C2: 45.9; C9: 113.3) compared with the double bond structure of 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal [8] (C2: 150.3; C9: 133.0, respectively). The missing protons at C2 and C9 were the basic difference in the ^1H spectrum of 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal [8] (d: 6.01 (H, s, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), 6.23 (H, s, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$)) compared to melonal (d: 1.11(3H, d, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}$), 1.41 (H, m, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}$)). RI and mass spectrometric data of the synthetic compound were identical with the degradation product of β -myrcene [1] which was hence identified as the new natural compound 6-methyl-2-methyene-hept-5-enal [8].

The enzymatic formation of [8] is easily explained by the generation of an intermediate β -myrcene-1,2-endoperoxide [7] along with the 1,4-endoperoxide [23]. The instable four-membered dioxo-ring is degraded through the loss of methanal. When 6,7-epoxy [9] or 7-hydroxy- β -myrcene [14] were used as substrates, transformation products eluted right in front of the respective perillene derivatives [11,16] which showed mass spectra matching the aldehydes [13,18] corresponding to 6-methyl-2-methyenehept-5-enal [8]. The fragmentation pattern of the mass spectra of both compounds were similar to each other with a mass difference of two (difference of epoxy to hydroxy) in the higher mass fragments. Taking together the chromatographic and mass spectrometric data and the postulated enzymatic mechanism shown for β -myrcene (Figure 8) the two compounds were tentatively identified as the aldehydes [13,18] (Figure 9). Both compounds were not described previously, and the final confirmation of their structures is under way.

2.4.5 Conclusion

The soluble enzyme fraction of *P. sapidus* lyophilisates transformed β -myrcene [1] and β -myrcene derivatives [9,14] to furans [6,11,16,21] via the corresponding endoperoxides [2,10,15,20]. The degradation products [8,13,18] indicated that 1,2-endoperoxides [7,12,17,22] were generated besides the 1,4-endoperoxides [2,10,15,20]. It is concluded that a dioxygenase-type enzyme was able to introduce molecular O₂ at the 1,3-diene moieties of the monoterpene precursors β -myrcene, 6,7-epoxymyrcene, 7-hydroxymyrcene and β -(*E*)-ocimene. The endoperoxides [2,10,15,20] were key intermediates which decomposed to the corresponding furanoterpenoids without the need of another enzyme (Table 2).

Preliminary experiments with an endoperoxide specific colour reagent have shown that it will be possible to visualise the catalytically active enzyme on IEF and native PAGE gels. This will accelerate current work on the purification, characterisation and cDNA sequencing of the dioxygenase enzyme.

2.5 Acknowledgement

This work was financed by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG KR 2958/1-1). We thank H. Ziegler for providing reference chemicals, F. Robic for her valuable assistance and D. Albert, Department of Organic Chemistry, Leibniz University of Hannover, for his support in NMR analysis.

3 A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone *via* a stereo-specific allylic hydroperoxidation

submitted

3.1 Abstract

A selective and highly efficient allylic oxidation of the sesquiterpene (+)-valencene to the grapefruit flavour compound (+)-nootkatone was achieved with lyophilisate of the edible mushroom *Pleurotus sapidus*. The catalytic reaction sequence was elucidated through the identification of intermediate, (+)-valencene derived hydroperoxides. A specific staining of hydroperoxides allowed the semi-preparative isolation of two secondary (+)-valencene hydroperoxides, 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-4(S)-yl-hydroperoxide and 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(R)-yl-hydroperoxide using thin layer chromatography. The identification was based on HPLC-MS und GC-MS data. Chemical reduction of the biotransformation products yielded a tertiary alcohol identified as 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol. This suggested a lipoxygenase-type oxidation of (+)-valencene *via* secondary and tertiary hydroperoxides and confirmed homology data of the key enzyme obtained previously from amino acid sequencing.

Keywords: *Pleurotus sapidus*, valencene dioxygenase, nootkatone, (+)-valencene hydroperoxide

3.2 Introduction

Flavour compounds which show a unique odour, a low perception threshold, and a limited occurrence in plants are perfect targets for flavour biotechnology. A prominent example is (+)-nootkatone [5], an important constituent of the flavour of grapefruit. With (+)-valencene [1], together with limonene and myrcene the main constituent of orange (*Citrus sinensis*) peel oil, a suitable precursor is readily available. When (+)-valencene [1] is treated with strong oxidising agents, such as *t*-butyl chromate (HUNTER and BROGDEN, 1965), sodium dichromate (SHAFFER *et al.*, 1975), *t*-butyl peracetate (WILSON and SHAW, 1978), or *t*-butyl hydroperoxide (SALVADOR and CLARK, 2002), (+)-nootkatone [5] is formed in high yields. However, a shortcoming of these chemical syntheses is that the products must not be labelled as "natural". The industrial trend towards sustainable processes ("White Biotechnology") combined with the strong preference of consumers for natural products are driving forces for innovative biotechnological solutions.

A multitude of biocatalysts from microorganisms to higher plants have been studied for their ability to convert (+)-valencene [1] to (+)-nootkatone [5] (DHAVLIKAR and ALBROSCHHEIT, 1973; OKUDA *et al.*, 1994; FURUSAWA *et al.*, 2005; DRAWERT *et al.*, 1984; DEL RÍO *et al.*, 1991; DE KRAKER *et al.*, 2003; SAKAMAKI *et al.*, 2005; KASPERA *et al.*, 2005). Lyophilisate of the edible fungus *Pleurotus sapidus* was found to selectively oxidise (+)-valencene [1] to (+)-nootkatone [5] in industrially relevant concentrations (FRAATZ *et al.*, 2009, MÜLLER *et al.*, 2005, FRAATZ, 2007). Although the responsible enzyme of *P. sapidus* has been characterised on a molecular level (FRAATZ *et al.*, 2009), details of the catalytic reaction mode remained unknown. This paper reports on the identification of intermediate (+)-valencene hydroperoxides and, hence, reveals the reaction sequence triggered by the novel (+)-valencene dioxygenase.

3.3 Material and methods

3.3.1 Microorganism and Chemicals

The basidiomycete *Pleurotus sapidus* (DSM 8266) was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). Magnesium sulfate, iron (III) chloride \times 6 H₂O, calcium chloride \times 2 H₂O, sodium chloride and copper sulfate \times 7 H₂O were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany); manganese sulfate monohydrate, copper chloride, ammonium nitrate, cholic acid, (+) valencene (70%), (+)-nootkatone and dipotassium hydrogen phosphate were from Fluka (Seelze, Germany); D-(+)-glucose \times H₂O, L-asparagine \times H₂O, yeast extract, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, thymol, sodium borohydride and hydrochloric acid were from Merck (Darmstadt, Germany); zinc sulfate \times 7 H₂O was from Baker (Deventer, The Netherlands). Ethanol (96%) was from Kraul & Wilkening und Stelling (Hannover, Germany). Dichloromethane, methanol and azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12) were distilled before use. High-purity water was prepared using an E-pure water purification system (Barnstead, Dubuque, IA).

3.3.2 Cultivation, production of lyophilised biomass

Production of biomass and lyophilisation were described previously (FRAATZ *et al.*, 2009).

3.3.3 Biotransformation

50 g l⁻¹ of the lyophilised biomass was shaken with 1.4 μ l (+) valencene (Fluka, 70%) at 150 rpm and 24 °C in a 20 mM TRIS HCl buffer (pH 7.5, 1.5 ml) in the absence of light in 4 ml flasks. After 16 h of transformation the solution was extracted with azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12) after adding thymol (1 g l⁻¹) dissolved in pentane / diethyl ether (1:1.12) as an internal standard. The upper organic phase was poured off, dried (Na₂SO₄) and analysed without further treatment by means of thin layer chromatography and high resolution gas chromatography with flame ionisation detection (HRGC-FID) and mass spectrometry (HRGC-MS). The analysis of non-volatile products was achieved

by means of high performance liquid chromatography with UV/VIS and mass spectrometric detection (HPLC-DAD-MS). The pentane / diethyl ether extract was evaporated with a stream of N₂ and re-dissolved in the respective solvent for HPLC and the solvents used for reduction and oxidation reactions.

3.3.4 HRGC / HRGC-MS

One μL was injected into a Hewlett Packard HP 6890 GC system (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA) equipped with an CIS 4 injector with controller (0.5 min splitless; 60 °C (0 min), 12 °C s⁻¹ – 240 °C (3 min); Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany), a Varian WCOT Fused Silica CP Wax52CB capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness; Varian, Palo Alto, CA, USA), and a flame ionisation detector (250 °C, 40 ml min⁻¹ H₂, 450 ml min⁻¹ air flow, 45 ml min⁻¹ make up gas) using the following temperature program: 40 °C (hold for 3 min) to 250 °C with a rate of 3 °C min⁻¹ and hold for 10 min. Hydrogen was used as carrier gas (58.4 kPa head pressure, 1.5 ml min⁻¹ constant flow).

HRGC-MS analysis was carried out using the same capillary column and temperature program with helium as the carrier gas (38 cm s⁻¹). Identification of transformation products was achieved by comparison of EI mass spectra with data from reference compounds or literature (Wiley 6 for MassLab. 1996; NIST 02, June 2002 spectral libraries) using a Fisons GC 8000 gas chromatograph and a Fisons MD 800 mass selective detector (interface: 230 °C, ion source: 200 °C, quadrupole: 100 °C, EI ionisation (70 eV), scan range m/z 33-300 amu).

3.3.5 Thin layer chromatography (TLC)

TLC was carried out on aluminium sheets covered with silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) and azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12) as the mobile phase. The TLC plates were dried and subsequently stained with either anisaldehyde or the hydroperoxide specific “Huber” reagent (3.0 g α -naphthol, 150 ml methanol, 1350 ml H₂O, 0.5 g K₂S₂O₅, 20 ml acetic acid, 0.5 g FeSO₄ × 7 H₂O, 2.2 g 2-[(4-amino-3-methylphenyl)ethylamino]ethyl sulfate) (HUBER *et al.*,

1972). Semi-preparative isolation of putative hydroperoxides was achieved by scratching off the silica gel of the respective R_f -area of a processed unstained TLC-sheet. The silica gel was desorbed with azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12), centrifuged, dried and concentrated for further use.

3.3.6 HPLC and HPLC-MS

A Eurospher-100 C18, 250×4 mm, 5 μ column was used, MeOH:H₂O (80:20 v/v) at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, and detection at 210 nm (UV/Vis-photodiode array detector MD 910 (Jasco, Groß-Umstadt, Germany)).

LC-MS was carried out using a Shimadzu LC-MS-QP8000a (APCI-positive mode, Corona: 3.2 kV, HV lens: 0.5 kV, Cone: 30 V, Source: 120 °C, Probe 400 °C) system consisting of a Shimadzu DGU-12A degasser, a LC-10AD/LC-10ATVP gradient former and SPD-10AvP UV-detector (210 nm) and the same chromatographic conditions. The injection volume was 20 μ l.

3.3.7 NMR

¹H- and ¹³C-NMR were performed on a BRUKER Advance DRX-500 (¹H at 500 MHz, ¹³C at 125 MHz) and samples were dissolved in CDCl₃.

3.3.8 Synthesis of bioconversion products

β -Nootkatol was synthesised as described elsewhere (SHOJI *et al.*, 1984). 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S) -dimethyl -1,3,4,7,8,8a -hexahydro-2H -naphthalen-4a(R)-ol was obtained in a two step synthesis: 6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-hexahydro-1-oxa-cyclopropa[D]naphthalen-2-one was synthesised as described by WASSON and HOUSE (1963). The product (0.02 mmol) was added to a solution of N₂H₄ (2 equ. N₂H₄+H₂O and 0.2 equ acetic acid in ethanol) as described by WHARTON und BOHLEN (1961). The solution was stirred for 10 min, hydrolysed in water, and subsequently extracted three times with azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), and the solvent was removed under vacuum.

6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-hexahydro-1-oxa-cyclopropa[D]naphthalen-2-one, KI (ZB-WAX): 2308; MS [m/z(%): 234, M⁺(5), 219(12), 163(40), 162(36), 121(54), 119(41), 109(43), 107(100), 95(62), 93(74), 91(40), 81(44), 79(41), 69(69), 67(57), 55(55), 41(57).

¹³C-NMR(CDCl₃): d: 14.3 (C-CH₃-CH), 14.8 (C-CH₃-C), 20.6 (C-CH₃), 28.9 (CH-CH₂-CH₂), 30.0 (C_{epoxid}-CH₂-CH₂), 32.2 (CH₂-CH₂-C), 36.4 (C-CH₂-CH), 39.9 (CH₂-CH-CH₂), 40.5 (C-CH₂-CO), 41.7 (C-C-CH₂), 62.3 (CH₂-C_{epoxide}-HC_{epoxide}), 68.4 (CO-HC_{epoxide}-C_{epoxide}), 109.2 (CH₂=C), 148.7 (H₂C=C-C), 205.6 (C-C=O)

2(R)- Isopropenyl- 8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol, KI (ZB-WAX): 2054; MS [m/z(%): 220, M⁺ (19), 205(11), 202(46), 161(63), 159(54), 131(55), 121(58), 119(69), 109(71), 107(69), 105(73), 95(100), 93(58), 91(61), 81(57), 69(88), 55(87), 41(81).

¹³C-NMR(CDCl₃): d: 14.0 (C-CH₃-CH), 14.4 (C-CH₃-C), 20.7 (C-CH₃), 25.6 (CH₂-CH₂-CH), 31.5 (C-CH₂-CH), 32.5 (HOC-CH₂-CH₂), 32.7 (CH-CH₂-CH), 35.1 (H₂C-CH-C), 38.9 (H₂C-CH-CH₂), 39.6 (CH-C-CH₂), 70.9 (HC-COH-CH₂), 108.5 (CH₂=C), 130.1 (CH=CH-COH), 133.5 (H₂C-CH=CH), 150.6 (H₂C=C-C)

3.3.9 Chemical modification of (+)-valencene derived hydroperoxides

Indirect detection of the hydroperoxides [2; 2'; 3; 3'] was achieved after the biotransformation products were dissolved in 0.5 ml MeOH and treated with NaBH₄ as described by SCHULTE-ELTE *et al.*, 1974. After 1 h on ice the solution was hydrolysed in 0.5 ml water. The resulting alcohols were detected using HPLC and HRGC analysis, respectively. For HRGC, the solution was extracted with azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12) and dried (Na₂SO₄).

In addition, biotransformation products were dissolved in pyridine and treated with CuCl as described by SCHULTE-ELTE *et al.*, 1974. The sample was evaporated with a stream of N₂ after an incubation of 2 h and dissolved in MeOH (HPLC) and azeotropic pentane / diethyl ether (1:1.12) (HRGC), respectively.

3.4 Results and discussion

High transformation rates of (+)-valencene [1] to (+)-nootkatone [5] and to α -, β -nootkatol [4,4'] were observed when rehydrated lyophilisate of *P. sapidus* was used (FRAATZ *et al.*, 2009; MÜLLER *et al.*, 2005). The oxidation was found to proceed highly regio-specifically at C7, one of the two allylic positions of the ring double bond of (+) valencene (Fig. 10).

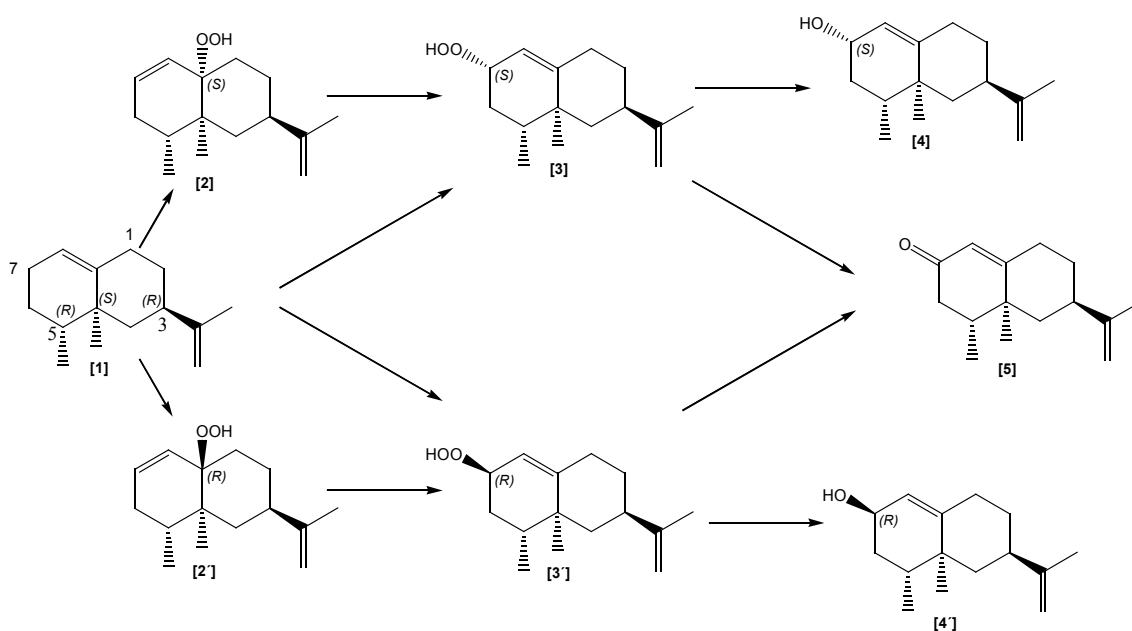


Abbildung 10: Reaction mode and products of novel (+)-valencene dioxygenase from *P. sapidus*. [1]: 3-Isopropenyl-4a,5-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalene, (+)-valencene. [2]: 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-yl-hydroperoxide. [2']: 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(S)-yl-hydroperoxide. [3]: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(S)-yl-hydroperoxide. [3']: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(R)-yl-hydroperoxide. [4]: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(S)-ol, β -nootkatol. [4']: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(R)-ol, α -nootkatol. [5]: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one, (+)-nootkatone.

This suggested the contribution of a cytochrome P450 activity to yield nootkatols which were subsequently oxidised to (+)-nootkatone [5]. An activity-guided three-step chromatographic purification procedure of active biomass resulted in highly concentrated fractions of the (+)-valencene [1] transforming activity. These fractions did not show any distinct absorption between 300 and 800 nm, indicating the absence of a haem group. An electrophoretically pure band exhibiting the catalytic activity was subjected to protein sequencing (FRAATZ *et al.*, 2009). Best homologies were found to lipoxygenase of

Ascomyetes. As lipoxygenases typically incorporate dioxygen into unsaturated fatty acids, this finding did neither match the structure of the substrate nor the observed specificity of the catalytic reaction.

3.4.1 Secondary (+)-valencene hydroperoxides [3,3']

After 16 h of incubation of re-hydrated lyophilisate of *P. sapidus* with (+) valencene, the GC-FID analysis of a solvent extract of biotransformation products resulted in up to 280 mg l⁻¹ (+)-nootkatone [5], 62 mg l⁻¹ α -nootkatol [4], and 14 mg l⁻¹ α -nootkatol [4]. This was in good accordance with prior results (FRAATZ *et al.*, 2009) but hydroperoxides [2,2',3,3'] of (+) valencene, as to be expected from a lipoxygenase action, were not detected by HRGC-MS. Thin layer chromatography (TLC) of the same extract was carried out. The separated compounds were stained either with anisaldehyde or with a hydroperoxide specific agent (HUBER, 1972), respectively. One discrete Huber-positive spot was found at R_f = 0.71. Control experiments using heat inactivated lyophilisate or valencene (Fluka, 70%) were negative (data not shown). The anisaldehyde staining visualised some more spots, among them nootkatone [5] and α - and β -nootkatol [4,4']. As the putative (+)-valencene hydroperoxide was sufficiently separated from (+)-nootkatone [5] and the nootkatols [4,4'], the spot corresponding to R_f 0.71 ± 0.05 was scratched off from a TLC-plate performed in parallel, but without staining, and re-dissolved in azeotropic pentane / diethyl ether. After removal of the TLC-material by centrifugation, subsequent drying, and reduction of the desorption solution, the sample was analysed by GC-MS and HPLC-DAD-MS. The GC-MS analysis resulted in the detection of (+)-nootkatone [5] as the main compound and of α,β -nootkatols [4,4'] in the same ratio (3.4:1.0, Fig. 11, 1) as was observed with the standard bioconversion extract (4.4:1.0, *vide infra*). This indicated that the assumed (+)-valencene hydroperoxides underwent a degradation when submitted to a GC separation. The HPLC chromatograms of the extract and the isolated spot showed a peak with a RI distinctly different to (+)-nootkatone [5] and the chromatographically not resolved nootkatols [4,4'] (Fig. 12A,B). The peak showed an UV-spectrum with an absorption maximum at 207 nm that fitted well to literature spectra of the diastomeric (+)-valencene hydroperoxides [3,3'] (HUANG *et al.*, 2001), The

APCI⁺-MS spectrum of the compound (Table 1) showed a less intense protonated molecular ion [MH⁺] at m/z 237 which fitted to a valencene hydroperoxide as well as to a valencene diepoxide. The latter can be ruled because epoxides are Huber negative. The most intensive ions were found at m/z 219 (base peak) and m/z 203 (50% of base peak) which corresponded to MH⁺-H₂O and MH⁺-H₂O₂ (Tab. 1). (+)-Nootkatone [5] and α,β -nootkatol [4,4'] analysed under the conditions showed intense ions at m/z 203 and 219 as well (Tab. 1).

Table 3: APCI⁺-spectra of main (+)-valencene biotransformation products according to Fig. 12A

Compound	[APCI ⁺ -Ions], m/z	[%] of base peak
α,β -Nootkatol [4,4']	[MH ⁺], 221	< 1
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂], 251	5
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂ O], 235	5
	[MH ⁺ -H ₂], 219	7
	[MH ⁺ -H ₂ O], 203	100
Nootkatone [5]	[MH ⁺], 219	100
	[MH ⁺ -H ₂], 217	30
	[MH ⁺ + MeOH], 251	37
Hydroperoxide [3, 3']	[MH ⁺], 237	1
	[MH ⁺ -H ₂], 235	1
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂ O], 251	25
	[MH ⁺ -H ₂ O], 219	100
	[MH ⁺ -H ₂ -H ₂ O], 217	25
	[MH ⁺ -H ₂ O ₂], 203	50

A decomposition of the (+)-valencene hydroperoxide during the GC-MS process to nootkatone [5] and the nootkatols [4,4'] prior to ionisation cannot be ruled out as the origin of these ions. The HPLC detection of (+)-nootkatone [5] and of α,β -nootkatol [4,4'] (Fig. 12A) suggested that a considerable part of the (+)-valencene hydroperoxides was already transformed to products during the bioconversion of (+)-valencene in the presence of fungal lyophilisate.

Hydroperoxide staining, HPLC and TLC retention, together with UV- and APCI⁺-mass spectra all suggest that the isolated compounds are hydroperoxides of (+)-valencene.

3.4.2 Stereochemistry of the secondary (+)-valencene hydroperoxides

The analytical data obtained so far do not allow to determine whether secondary [3,3'] or tertiary [2,2'] (or both) hydroperoxides were generated. As concentrated solutions of hydroperoxides may be hazardous, the preparation of the pure compounds was not attempted. (+)-Nootkatone [5] was made amenable from (+)-valencene [1] using photooxidation/triplet oxygen (³O₂) (SCHULTE *et al.*, 1974). First oxidation products were suggested to be the (+)-valencene hydroperoxides [3,3'] which were subsequently converted to (+)-nootkatone [5] with strong inorganic bases or transition metal catalysis. DAVIES and DAVIES (1989) showed that the tertiary β-hydroperoxide [2'] generated with singulett oxygen (¹O₂) immediately rearranges (Schenk rearrangement, (SCHENK, 1958)) to give the secondary β-hydroperoxide [3']. The involvement of hydroperoxides in the generation of (+)-nootkatone [5] was proven indirectly by specific reduction and preservation of the stereochemistry of the respective (+)-valencene hydroperoxide to the corresponding alcohol with several reducing agents, such as NaBH₄ or NaHSO₃ (SCHULTE *et al.*, 1974).

In order to follow this indirect approach, the extract of the isolated Huber stained TLC-spot and the extract of a (+)-valencene [1] bioconversion were treated with NaBH₄ and, in a separate reaction, with CuCl, respectively. The reduction of the assumed pure secondary (+)-valencene hydroperoxides [3,3'] gave the respective alcohols which were identified with GC-MS as α- and β-nootkatol [4,4'] and quantified to a molar ratio of 2.7:1.0 (Fig. 11, 2).

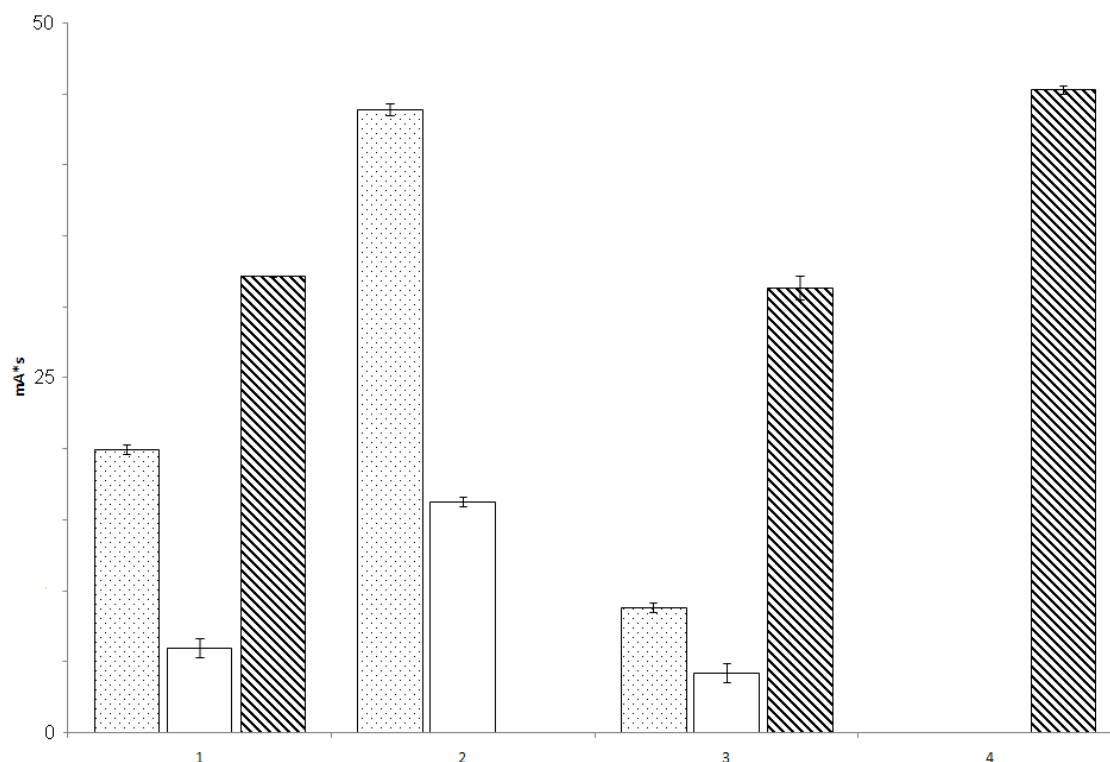


Abbildung 11: GC-FID analysis of purified hydroperoxides (TLC). Controls: Purified hydroperoxides without NaBH₄ (1) or CuCl (3), respectively; 2 Huber spot treated with NaBH₄; 4 Huber spot treated with CuCl. α-Nootkatol [4'] (dotted), β-nootkatol [4] (white), nootkatone [5] (shaded). The relative concentration is denoted in mA*s. Error bars represent measurement in means of duplicates.

This evidences that the recovered spot of TLC showing the positive Huber staining comprised both, α- and β-(+)-valencene hydroperoxide [3,3'] as the main constituents. Provided that the stereochemistry is completely retained during the reduction, the molar ratio of the alcohols represents the molar ratio of the hydroperoxides. GC-MS analysis of the same sample without NaBH₄ (Fig. 11, 1) reduction yielded α- and β-nootkatol [4,4'] in almost the same molar ratio (3.3:1.0) and (+)-nootkatone [5] as the main compound. GC-MS analysis of the reduced sample showed consequentially only α- and β-nootkatol but in an inverse molar ratio of 1.0:1.33 (data not shown). As the reduction of (+)-nootkatone [5] with NaBH₄ resulted in more than 95% of the β-alcohol [4] (KASPERA *et al.* 2005), this finding additionally supports that (+)-nootkatone [5] was already generated during the bioconversion and not on the GC-column only.

HPLC analysis of the reduced bioconversion extract proved that indeed the peaks of the hydroperoxides [3,3'] and (+)-nootkatone [5] disappeared and those of the nootkatols [4,4'] increased (Fig. 12C). The transformation of the

isolated TLC spot, however, yielded (+)-nootkatone [5] without side products, whereas the transformation extract reacted with CuCl resulted in (+)-nootkatone [5] (Fig. 12D) and some minor fractions of α,β -nootkatol [4, 4'] which were detected by GC-MS only (data not shown). This indicated that also fractions of α - and β -nootkatol [4,4'] were already present in the bioconversion extract.

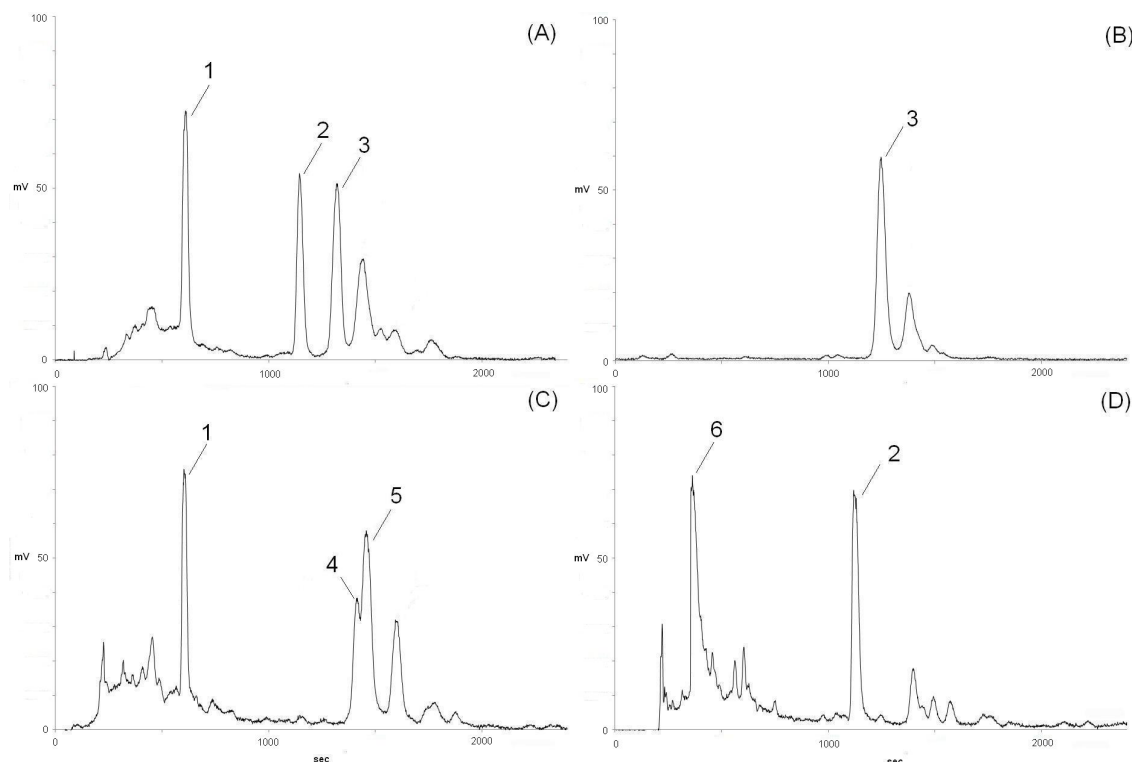


Abbildung 12: HPLC-DAD chromatograms (210 nm) obtained with biotransformation extract (A), isolated TLC spot with hydroperoxide activity (B), biotransformation extract solved in MeOH treated with NaBH₄ (C), biotransformation extract dissolved in pyridine and treated with CuCl (D). Peak assignment: 1 thymol (IS); 2 nootkatone [5]; 3 secondary hydroperoxids [3, 3']; 4 α -nootkatol [4']; 5 β -nootkatol [4]; 6 pyridine (solvent).

3.4.3 Tertiary (+)-valencene hydroperoxides [2,2']

The reaction mode of a (+)-valencene dioxygenase (Fig. 10) suggests the occurrence of tertiary hydroperoxides [2,2'] as well. For the lipoxygenase catalysed oxidation of unsaturated fatty acids the driving force for the rearrangement of double bonds is the stabilisation of the primary diallylic radical through conjugation. In the case of the (+)-valencene dioxygenase only the allylic carbon radical at C7 can be stabilised to a tertiary radical, whereas C1 cannot. Because of the fast rearrangement (Schenk rearrangement) of the tertiary hydroperoxides [2,2'] to the secondary hydroperoxide [3, 3'] the tertiary

hydroperoxides [2,2'] were not detectable. Spectral and chromatographic data of the corresponding tertiary alcohols are not available. Therefore, the tertiary β -alcohol 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol was synthesised. With this as a reference, the respective tertiary alcohol was found by GC-MS after NaBH₄ reduction of the bioconversion extract as a minor compound, corresponding to 4% of the peak area measured for β -nootkatol [4]. The respective tertiary α -alcohol 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol was not synthesised and, therefore, not identified in the extract. Nevertheless, the occurrence of the tertiary alcohol [2'] supported the transient presence of tertiary (+)-valencene [1] derived hydroperoxides [2, 2'].

3.4.4 (+)-Valencene dioxygenase of *P. sapidus*

Extracellular enzymes of fungi have been described for the biotransformation of (+)-valencene [1]. WILLERSHAUSEN and GRAF (1990) used concentrated supernatants of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* with high lignin peroxidase activity, whereas another approach applied fungal laccases to yield (+)-nootkatone [5] (HUANG *et al.*, 2001). Using submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum* 8 mg l⁻¹ of (+)-nootkatone were produced in three days (KASPERA *et al.*, 2005) and the involvement of a cytochrom P450 was postulated. The breakthrough to higher product yields with basidiomycetes was achieved when lyophilisate of the edible mushroom *P. sapidus* were used instead of whole cells in submerged cultures. After transformation of (+)-valencene [1] for 13 h, up to 250 mg l⁻¹ (+)-nootkatone were obtained and α - and β -nootkatol [4,4'] were identified as side products (MÜLLER *et al.*, 2005). A reaction mechanism or a characterisation of the enzymatic activity was not given.

Specific staining of a TLC separated solvent extract after (+)-valencene [1] biotransformation with lyophilisates of *P. sapidus* gave strong evidence that the target flavour compound (+)-nootkatone [5] was generated *via* intermediate hydroperoxides. The confirmed reaction mechanism as shown in Figure 10 is close to the catalytic mechanism of known lipoxygenases and supports parallel

work on the biochemical and molecular characterisation of this novel (+)-valencene dioxygenase. Based on database search, the translated amino acid sequence of 396 amino acids showed on the protein level homologies of ~50% to putative lipoxygenases from *Aspergillus fumigates* and *Laccaria bicolor* as well as 26% homology to the sequence of lipoxygenase-1 from soybean (Fraatz *et al.*, 2009). Dioxygenases, such as lipoxygenases, start the catalytic reaction by abstraction of a hydrogen atom from the substrate molecule. The highly substrate specific lipoxygenases require a (Z,Z)-1,4-pentadienyl moiety (diallylic position). The resulting secondary carbon radical is stabilised along the adjacent double bonds. The first predominant oxidation products are the respective conjugated diene hydroperoxides caused by the reaction of the carbon centred radical with triplet oxygen ($^3\text{O}_2$). This is the first report on a lipoxygenase-type enzyme from a fungus which accepts a terpene hydrocarbon instead of an unsaturated fatty acid as the substrate (FRAATZ *et al.*, 2009). For further investigation of the biochemical and structural properties the (+)-valencene dioxygenase will be heterologously expressed in an appropriate host.

3.5 Acknowledgements

Support of the work by the “Deutsche Bundesstiftung Umwelt” (AZ 13187-32) is gratefully acknowledged.

4 Heterologous expression of an extracellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*.

Reprinted from Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57, 16-21,
Copyright 2008, with permission from Elsevier.

4.1 Abstract

The 1641 bp cDNA encoding an extra-cellular lipase of the basidiomycete *Pleurotus sapidus* (Lip2) was cloned from a cDNA library. Expression of the cDNA in *Escherichia coli*, with and without signal sequence, led to the production of recombinant Lip2, mainly as inclusion bodies with low catalytic activity. Refolding yielded catalytically active protein. A C-terminal His tag was used for purification and immunochemical detection. The recombinant lipase hydrolysed xanthophyll esters with high efficiency, and omitting the signal sequence did not alter the catalytic properties. The *P. sapidus* lipase represents the first enzyme of the lipase/esterase family from a basidiomycetous fungus characterised on the molecular level and expressed in a manageable host.

Keywords: basidiomycete, fungi, carboxylesterase, carotenoid ester

4.2 Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) accept biotic and abiotic substrates and may transform them in water, organic solvents, or in ionic liquids to products of industrial importance (SCHMID, 1998). However, only few enzymes have become known to catalyse xanthophyll ester hydrolysis (KHACHIK *et al.*, 1997; BREITHAUPT, 2000; ZORN *et al.*, 2003). Xanthophylls are widely used as colorants and antioxidants in the feed, food, pharmaceutical, and cosmetics industries. Most of the naturally occurring xanthophylls are present as mono- and diesters of fatty acids in plant sources, such as *Tagetes erecta* (marigold) and *Capsicum annuum* (paprika) (BREITHAUPT *et al.*, 2002). The conventional method to liberate free xanthophylls from their ester precursors is saponification by hot (80°C) and concentrated sodium hydroxide solution. This process results in the formation of side products, causes high energy costs, and imposes high requirements concerning safety issues and waste disposal. Enzyme technology could provide a green process alternative.

Screening basidiomycete species, an extra-cellular lipase from *Pleurotus sapidus* (Lip2) with the distinct property to convert xanthophyll esters into free xanthophylls was found, purified and sequenced (ZORN *et al.*, 2005). The novel enzyme represented an octamer with a molecular mass of 430 kDa, an isoelectric point of 4.5, and worked best at pH 5.8 and 40°C. Its active site contained the well-known Ser-Glu-His catalytic triad. A 23-aa signal peptide preceded the N-terminus of the enzyme (ZORN *et al.*, 2005a) (EMBL accession number AJ810032). This paper reports on the purification, refolding and characterisation of Lip2 expressed in *E. coli*.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Cultivation and lipase production

Mycelia of *P. sapidus* [8266 DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)] were maintained as described previously (LINKE *et al.*, 2005).

4.3.2 RNA purification and cDNA library construction

Mycelium of the submerged culture (5th culture day) was separated *via* centrifugation (9 000 x g, 15 min, 4 °C). To purify RNA, 100 mg of mycelium were chopped off with a scalpel, and ground in a mortar under liquid nitrogen. Total RNA was extracted with the RNeasy-Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. A cDNA library was constructed using the RNA as template with the SMART PCR cDNA Library Construction Kit (CLONTECH, Saint-Germain-en-Laye, France).

4.3.3 Cloning of expression plasmids

The plasmid pET101/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) with a strong RBS and a C-terminal His tag was used (Fig. 13). Four different constructs of Lip2 were cloned. The lip2 cDNA was amplified from a cDNA library using the following primers: For s-Lip2-His and s-Lip2 the forward primer included the signal peptide sequence of lip2 (5'-CACCATGTTCTTCGTTCTACAGGC-3'). For Lip2-His and Lip2 the sequence of the signal peptide was omitted (5'-CACCATGGCAAACAGCGTAACGCTTG-3'). All forward primers contained the sequence CACC at the 5' end of the primer, the overhang sequence of the vector used. For s-Lip2 and Lip2, the reverse primer included the stop codon TGA (5'-TCAAAGTGGATTTGCCAGAGT-3'). A reverse primer without stop codon (5'-AAGTGGATTTGCCAGAGTAC-3') was used to generate s-Lip2-His and Lip2-His. The PCR fragments were purified by gel electrophoresis and extracted from the gel using the Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel). The purified DNA was cloned into the pET101/D-TOPO plasmid *via* the TOPO

cloning reaction, yielding the plasmids pET101s-lip2-His, pET101lip2-His, pET101s-lip2 and pET101lip2.

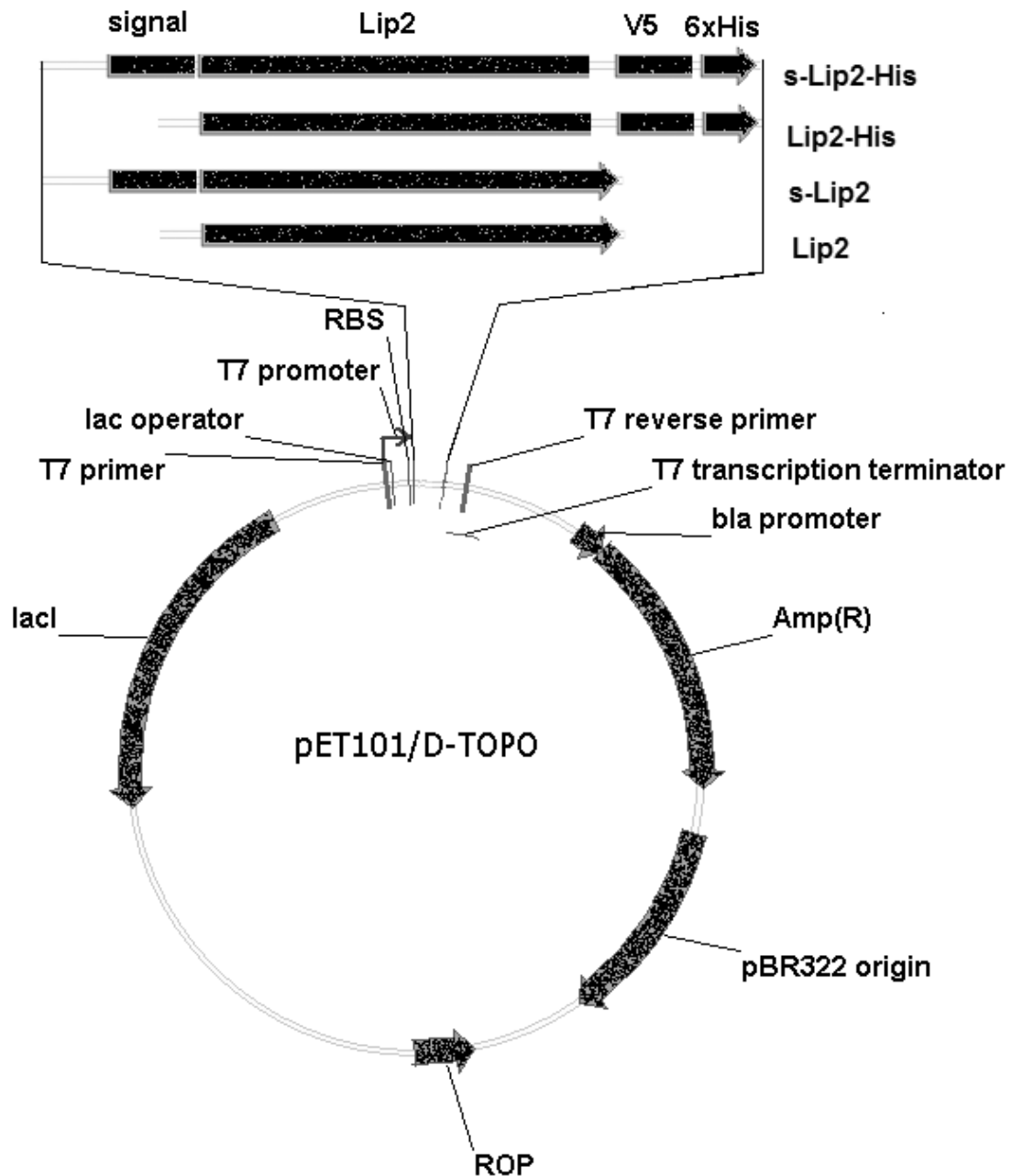


Abbildung 13: Plasmid for the expression of Lip2 variants. A pET101/D-TOPO® vector was used for construction of the different variants. Expression of the gene of interest was under the control of the T7 promoter for a high-level, IPTG-inducible expression (DUBENDORFF and STUDIER, 1991; STUDIER *et al.*, 1990). The vector contained C-terminal fusion tags, a V-5 epitope and a polyhistidine tag for detection and purification of recombinant fusion proteins. An ampicillin resistance gene was used for selection.

4.3.4 Expression of Lip2 variants

E. coli BL21(DE3) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was transformed with the four plasmids encoding the different variants of Lip2. Expression was performed at 27 or 37 °C and 250 rpm, using 50 ml of LB medium (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 10 g l⁻¹ NaCl) containing 50 mg ml⁻¹ ampicillin. Expression was induced using 1 mM isopropyl-L-dithiogalactopyranosid (IPTG) at an OD₆₀₀ of 1.5. The cells were harvested 4 h after induction by centrifugation at 6000 × g and 4 °C for 15 min.

4.3.5 DNA sequencing and alignment

The plasmid-DNA was sequenced by MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Germany) and aligned with clustalW (HIGGINS *et al.*, 1994) against the lip2 cDNA sequence (AJ810032).

4.3.6 SDS-PAGE and Western blot analysis

Cell extracts were prepared using ice-cold lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH 8.0, 0.1% DNase, 1 mg ml⁻¹ lysozyme) for 30 min at 4 °C. After four freeze and thaw cycles the crude extract was centrifuged for 30 min at 12 000 × g and 4 °C. The supernatants as well as the pellets were mixed or re-suspended, respectively, in loading buffer (Laemmli loading dye). SDS-PAGE was performed according to LAEMMLI (1970) using 4% (w/v) polyacrylamide in the stacking gels and 14% (w/v) polyacrylamide in the resolving gels. Proteins were stained with 0.1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 or silver (BLUM *et al.*, 1987). PageRuler pre-stained protein ladder plus (FERMENTAS, St. Leon-Rot, Germany) was used for the preparation of a calibration curve for determination of molecular masses. After transferring the proteins to a nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) the clones carrying the pET101s-lip2-His or the pET101lip2-His

plasmid were immunoblotted using an anti-His(C-term)-AP antibody (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

4.3.7 Isoelectric focusing (IEF)

IEF polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (Pharmacia LKB) using Servalyt™ Precotes™ precast gels with an immobilised pH gradient of pH 3 - 6 (Serva, Heidelberg, Germany). The pI of the lipase was estimated using a low-pI (2.8 - 6.5) calibration kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Gels were silver stained (BLUM *et al.*, 1987). For activity staining the Lipase overlay assay (4.3.9) was used.

4.3.8 Refolding and Purification

Cell extracts were prepared with ice-cold lysis buffer as described under Section 4.3.6. The inclusion bodies were pelleted by centrifugation (12 000 × g). After washing with 0.5% (v/v) Triton X-100, the inclusion bodies were dissolved in 20 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 8 M urea, 1 mM EDTA and 10 mM dithiothreitol (DTT). After an incubation time of 1 h at room temperature, the suspension was diluted to 200 ml with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 10 mM CaCl₂ and 1 mM EDTA and incubated for 10 days at 4 °C (LEE *et al.*, 1994). For protein purification under native conditions the Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) was used.

4.3.9 Lipase overlay assay

60 ml of a solution containing 0.008 g Tris-HCl and 0.025 g NaCl in 100 ml H₂O and 1.2 g agar agar were heated to 100 °C for 1 min (modified after NUERO *et al.* (1994)). After cooling to about 65 °C, 60 ml of a solution containing 1 g polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80) and 0.02 g CaCl₂ in 100 ml H₂O (pH adjusted to 6.8 with 0.1 N NaOH) were added. The IEF gel was

covered with the mixture and after incubation at 35 °C over night the plates were covered with 0.1 N NaOH. Formation of a whitish precipitate indicated active fractions.

4.3.10 *p*-NPP lipase activity assay

Lipase activity was determined using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) (WINKLER and STUCKMANN, 1979). Solution A contained 30 mg *p*-NPP (Sigma) dissolved in 10 ml propane-2-ol. Solution B contained 0.207 g sodium deoxycholate (Sigma) and 0.1 g gum arabic (Sigma) dissolved in 90 ml 0.2 M Tris/HCl buffer (pH 7.5). Solution A was added in small quantities to Solution B while stirring continuously until complete dissolution. This substrate solution was prepared daily, pre-warmed to 37 °C, and dispensed in 200 µl quantities into test plates. Absorbance of duplicates was measured at 410 nm against an appropriate blank.

4.3.11 Xanthophyll ester cleaving activity

The hydrolytic activity of the recombinant protein was tested by HPLC-DAD analysis using a xanthophyll ester isolate of *Capsicum annum* (ZORN *et al.*, 2005).

4.3.12 Protein Concentration

The protein concentration of duplicate samples was estimated by the method of LOWRY *et al.* (1951) using DC-Protein-Assay (Bio-Rad, Hercules, USA) and bovine serum albumin as a standard. In the range used the calibration curve was linear with a regression coefficient of $R^2 = 0.998$.

4.3.13 MALDI peptide mapping

Protein bands separated by 1D SDS-PAGE were excised, washed, reduced and carboxamidomethylated, and tryptically digested. The resulting peptides were extracted, desalted and analyzed on a Bruker Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) as described (FORNO *et al.*, 2004). The peptide fingerprints were then subjected to database searches (NCBI, Fungi) using the Mascot system.

4.4 Results

Lip2 is an extra-cellular protein containing a 23 amino acid signal peptide, which targets the protein to the extra-cellular compartment of *P. sapidus*. As nothing is known about the processing of basidiomycetous pro-proteins and about the influence of the signal sequence on the correct protein folding in *E. coli*, two different constructs of the N-terminus were cloned as described (4.3.3): s-Lip2-His and s-Lip2 containing the complete pro-protein, and Lip2 and Lip2-His missing the signal sequence. The constructs s-Lip2-His and Lip2-His were cloned with a C-terminal His tag to facilitate detection and purification. S-Lip2 and Lip2 were cloned with the native stop codon to compare their activities with those of the two hybrid proteins. The plasmid-DNA of the clones was sequenced and compared with the published sequence of Lip2 (EMBL accession number CAH17527) (Fig. 14).

```

A      1 MFFVLQAVLGLFAIQTAATPLPRANSVTLDSATFTGTTSGRVTKFLGIPYAQPPTGDRRF
B      1 MFFVLQAVLGLFAIQTAATPLPRANSVTLDSATFTGTTSGRVTKFLGI PYAQPPTGDRRF
      *****

A      61 RLPEPIPPYTGTVRATAFGPACQQSARLPLPDGLASDVVDLIVNTAYKAVFPDNECLS
B      61 RLPELIPPYTGTVRATAFGPACQQSARLPLPDGLASDVVDLIVNTAYKAVFPDNECLS
      **** *****

A      121 INVVVPTSATPTSKLPVAVWIFGGGFELGSPSLYDGGLIVERSIQLGEPVIYVSMNYRLS
B      121 INVVVPTSATPTSKLPVAVWIFGGGFELGSPSLYDGGLIVERSIQLGEPVIYVSMNYRLS
      *****

A      181 AFGFLASQEVKDTGVGNLGLQDQREALRWIQKYISSFGGDPTKVTIWGESAGAI SVALHM
B      181 AFGFLASQEVKDAGVGNLGLQDQREALRWIQKYISSFGGDPTKVTIWGESAGAI SVALHM
      *****

A      241 VANNGNHEGLFRGAFMQSGSPIPVGDI SHGQTYDAIAAETGCSSAADTLACLRSPYAT
B      241 VANNGNHEGLFRGAFMQSGSPIPVGDI SHGQTYDAIAAETGCSSAADTLACLRSPYAT
      *****

A      301 LKTAVDRTPFIFDYQSLALARI PRADGVFLTDNPQRLVQAGKVANVPFVTGDCDDEGTLF
B      301 LKTAVDRTPFIFDYQSLALAWI PRADGVFLTDNPQRLVQAGKVANVPFVTGDCDDEGTLF
      *****

A      361 SLANLNVTTTSQVRTYIKTFFMPQSTNAELDQMLNHYPDLDTQGSPFDTGILNALSPQFK
B      361 SLANLNVTTTSQVRTYIKTFFMPQSTNAELDQMLNHYPDLDTQGSPFDTGILNALSPQFK
      *****

A      421 RLAAFQGDVAVFQAPRRFFLQQRSGKQNTWAFLSKRFKVAPFLGSFHASDILNVYFGGELG
B      421 RLAAFQGDVAVFQAPRRFFLQQRSGKQNTWAFLSKRFKVAPFLGSFHASDILNVYFGGELG
      *****

A      481 DYLINFVNLDPNQGGRGINWPKYTTSSPNLVTFNDNLLFPVTTITQDTFRTDAINFLTGV
B      481 DYLINFANNLDPNGQGRGINWPKYTTSSPNLVTFNDNLLFPVTTITQDTFRTDAINFLTGV
      *****

A      541 TLANPL
B      541 TLANPL
      *****

```

Abbildung 14: Alignment of the translated nucleotide sequence of the cloned *P. sapidus* lipase gene lip2 (B) with the amino acid sequence of Lip2 (EMBL accession number CAH17527) (A). The sequence alignment was performed with ClustalW. The N-terminal sequence of the mature *P. sapidus* protein is printed in bold. Active site residues are marked. Sequences of lip2 are equal except for the underlined signal peptid in all four constructs and united in sequence (B).

The same five differences were detected on the protein level in all four constructs. These differences are supposed not to result from amplification mistakes, but from an isoenzyme sequence. The supernatant of the *P. sapidus* strain, which was used as source for the construction of the cDNA library, showed good activity against paprika oleoresin indicating that the sequence to be amplified should code for a functional protein. Cell lysates of all *E. coli* clones showed a very low activity against *p*-NPP as substrate when incubated at 27 °C or 37 °C. IEF analysis with activity overlay showed lipase activity at the application point only. The soluble and insoluble fractions were analysed by SDS-PAGE (Fig. 15A), and the s-Lip2-His and Lip2-His clones were also blotted

and detected by anti-His-antibodies (Fig. 15B). SDS-PAGE and Western blot showed one strong band with the expected size in the induced insoluble fraction in both s-Lip2-His (63 kDa) and Lip2-His (60 kDa). Some weaker bands may represent partially hydrolysed proteins with an intact C-terminus.

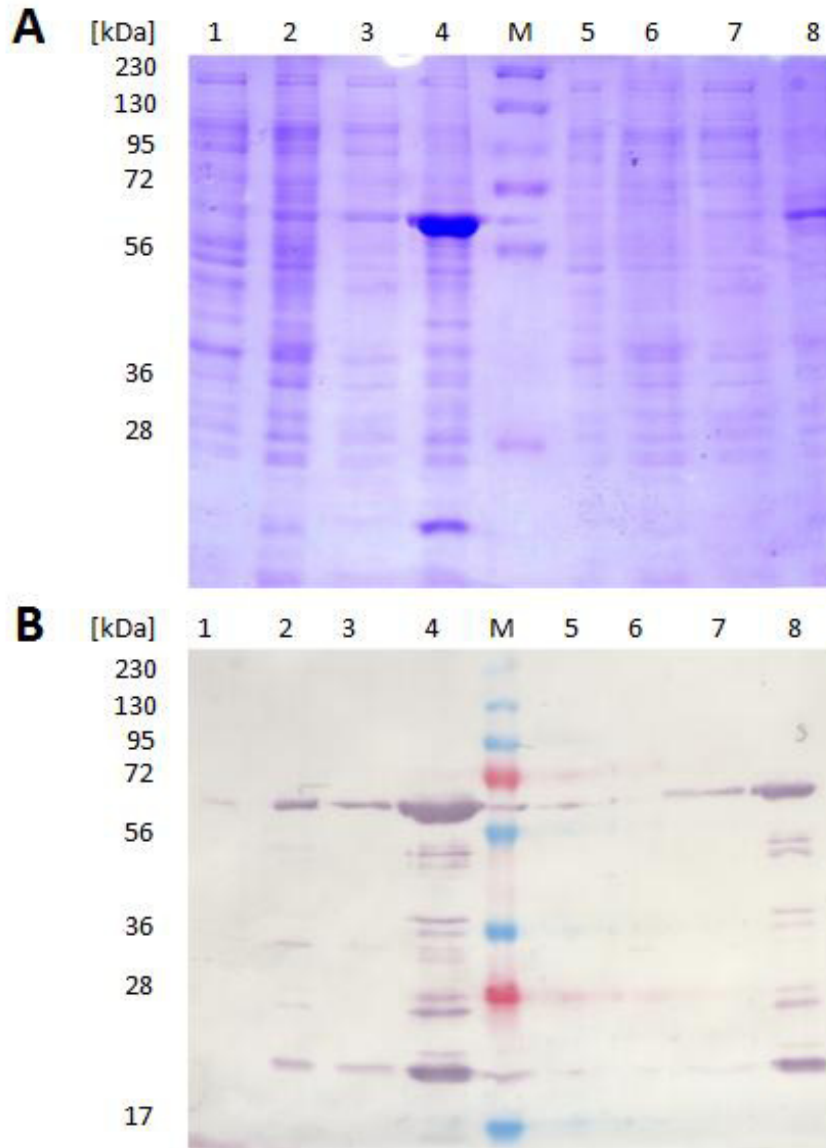


Abbildung 15: Expression of Lip2 variants containing a His tag in *E. coli* BL21(DE3): Coomassie blue stained SDS-PAGE gel (A) and Anti-His blot (B). *E. coli* bearing Lip2-His (1: not induced, soluble; 2: not induced, insoluble; 3: induced, soluble; 4: induced, insoluble) and *E. coli* bearing s-Lip2-His (5: not induced, soluble; 6: not induced, insoluble; 7: induced, soluble; 8: induced, insoluble) were cultivated over night. Recombinant protein production was induced using IPTG for a cultivation time of 4 h.

The bands with the expected size were excised from the SDS-gel and analysed by MALDI-mapping. The data showed similarity to the translated plasmid-DNA sequence of lip2 and reinforced three sequence differences to the published sequence of Lip2 (Fig. 16).

A:

1 MFFVLQAVLG LFAIQTAATP LPRANSVTLD **SATFTGTTSG** **RVTKFLGIPY**
 51 **AQPPTGDRRF** **RLPEPIPYPY** **GTVRATAFGP** **ACPQQSARLP** LPDGLASDVV
 101 DLIVNTAYKA VFPDNEDCLS INVVVPTSAT PTSKLPVAVW IFGGGFELGS
 151 PSLYDGGGLIV **ERSIQLGEPV** **IYVSMNYRLS** **AFGFLASQEV** **KDIGVGNLGL**
 201 **QDQREALRWI** **QKYISSFGGD** **PTKVTIWGES** AGAISVALHM VANNGNHEGL
 251 FRGAFMQSGS PIPVGDISHG QTYYDAIAAE TGCSSAADTL ACLRSVPYAT
 301 LKTAVDRTPF **IFDYQSLALA** **RIPRADGVFL** **TDNPQRLVQA** GKVANVPFVT
 351 **GDCDDEGTLF** **SLANLNVTTT** **SQVRTYIKTF** FMPQSTNAEL DQMLNHYPLD
 401 LTQGSFPDGTG ILNALSPQFK **RLAAFQGDV** **FQAPRRFFLQ** QRSKGQNTWA
 451 **FLSKRFRKQVAP** FLGSFHASDI LNVYFGGELG DYLINFVNNL DPNQGQGRGIN
 501 WPKYTTSSPN LVTFNDNLLF PVTITQDTFR TDAINFLTGV TLANPLKGEL
 550 RGHPFEGKPI PNPLLGLDST RTGHHHHHHH

B:

1 MADLANSVTL **DSATFTGTTS** **GRVTKFLGIP** **YAQPPTGDRR** **FRLPEPIPYPY**
 51 **TGTVRATAFG** **PACPQQSARL** PLPDGLASDV VDLIVNTAYK AVFPDNEDCL
 101 SINVVVPTS SA TPTSKLPVAV WIFGGGFELG SPSLYDGGGLI **VERSIQLGEP**
 151 **VIYVSMNYRL** **SAFGFLASQE** **VKDIGVGNL** **LQDQREALRW** IQKYISSFGG
 201 DPTKVTIWGE SAGAISVALH MVANNGNHEG LFRGAFMQSG SPIPVGDISH
 251 GQTYYDAIAA ETGCSSAADT LACLRSVPYA TLKTAVDRTP **FIFDYQSLAL**
 301 **ARIPRADGVF** **LTDNPQRLVQ** AGKVANVPFV **TGDCDDEGTL** **FSLANLNVTT**
 351 **TSQVRTYIKT** FFMPQSTNAE LDQMLNHYPL DLTQGSFPDGT GILNALSPQF
 401 **KRLAAFQGDA** **VFQAPRRFFL** **QQRSGKQNTW** **AFLSKRFRKVA** PFLGSFHASD
 451 ILNVYFGGEL GDYLINFVNN LDPNGQGRGI NWPKYTTSSP **NLVTFNDNLL**
 501 **FPVTITQDTF** **RTDAINFLTG** VTLANPLKGE LRGHPFEGKP IPNPLLGLDS
 551 TRTGHHHHHH

Abbildung 16: MALDI-MS peptide mapping of s-Lip2-His (A) and Lip2-His (B): Peptide sequences which fit to the translated nucleotide sequence of the cloned *Pleurotus sapidus* lipase genes *s-lip2-His* (A) and *lip2-His* (B) are printed bold. Differences to the published sequence of Lip2 (EMBL accession number CAH17527) are underlined.

The variants with the signal sequence (s-Lip2-His) were larger than the construct without (Lip2-His), thus, the pro-peptide of s-Lip2-His was not cleaved in *E. coli*. No expression was detected by SDS-PAGE for the clones S-Lip2 and Lip2, neither in the insoluble nor in the soluble fraction (data not shown). In s-Lip2-His and Lip2-His most of Lip2 was expressed as inclusion bodies.

The protein located in the insoluble fraction was refolded as described (4.3.8). Contaminants of the insoluble enzyme fraction of s-Lip2-His and Lip2-His were removed using a Ni²⁺-NTA column (Fig. 17).

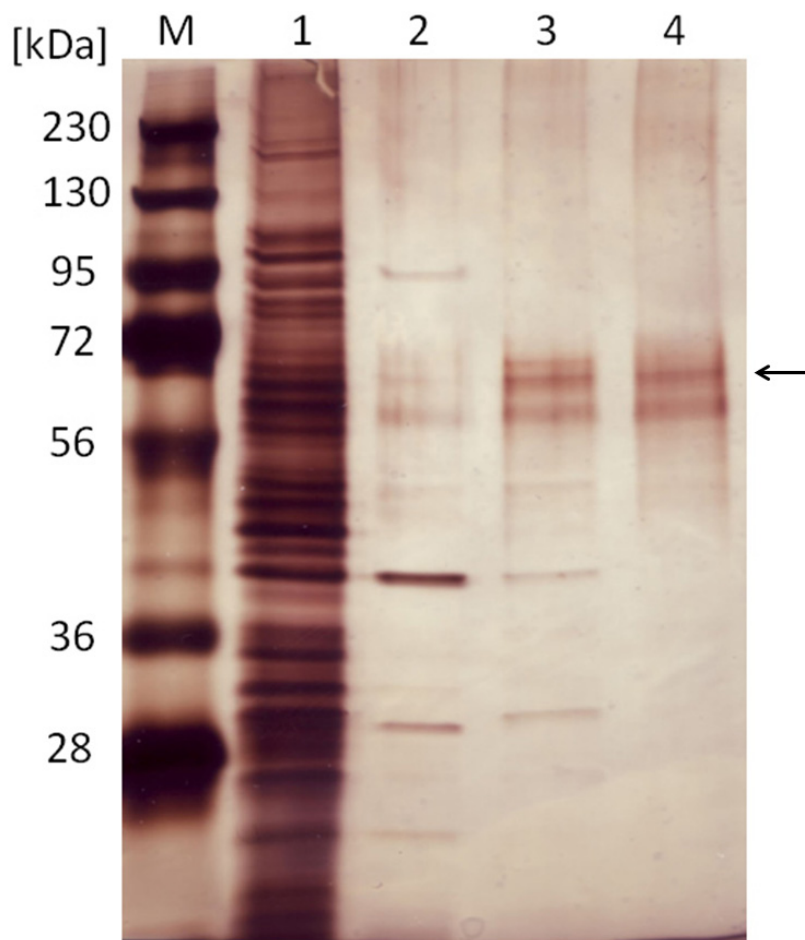


Abbildung 17: Purification of Lip2-His with a Ni^{2+} -NTA column: 1: insoluble enzyme fraction after refolding; 2: flow through; 3: washing with 40 mM imidazole, 4: elution with 250 mM imidazole, silver stained SDS-PAGE gel.

The refolded fractions of the clones s-Lip2-His and Lip2-His showed activity against *p*-NPP (Tab. 4), while those of the clones s-Lip2 and Lip2 were inactive.

Tabelle 4: Specific activity of recombinant Lip2 variants.

	Specific activity <i>p</i> -NPP ^a (U/mg(mU/ml culture))	hydrolysis of xanthophyll esters ^b
s-Lip2	0 (0)	-
s-Lip2-His	31.4 ± 0.9 (111.0 ± 3.3)	+
Lip2	0 (0)	-
Lip2-His	30.0 ± 2.9 (116.6 ± 11.3)	+

^a Activity was measured in duplicate after refolding of the protein with *p*-NPP as substrate

^b Ability to hydrolyse xanthophyll esters detected after refolding of the protein with a HPLC based assay.

HPLC-DAD analyses of xanthophyll esters from *Capsicum annum* incubated with recombinant and refolded s-Lip2-His or Lip2-His showed the same product spectrum as was obtained with native Lip2 (Fig. 18). As with the native enzyme from *P. sapidus* supernatant (ZORN *et al.*, 2005), the chromatograms were dominated by the end product of hydrolysis, capsanthin, while the concentrations of mono- and diesters were significantly decreased.

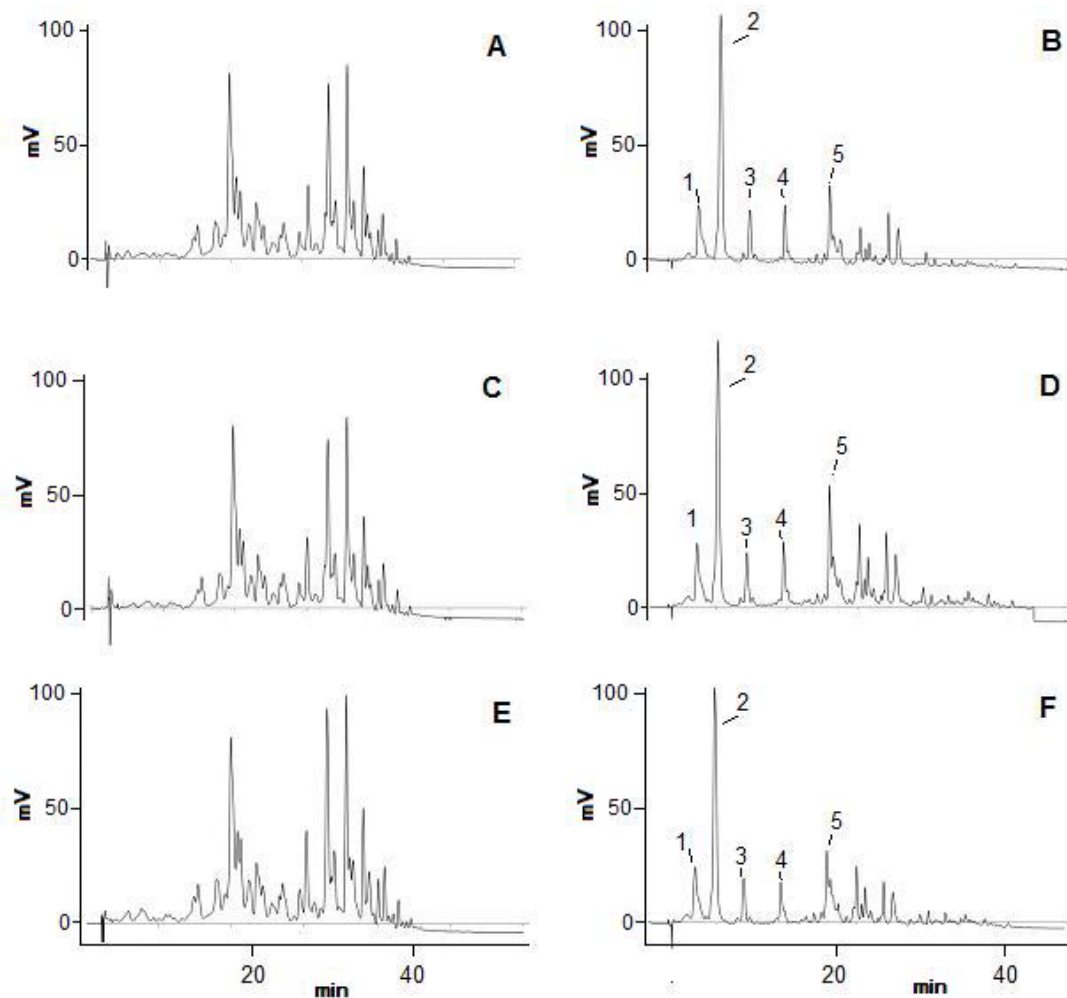


Abbildung 18: HPLC-DAD chromatograms (450 nm) obtained with refolded s-Lip2 (A), refolded s-Lip2-His (B), refolded Lip2 (C), refolded Lip2-His (D), inactivated wild-type Lip2 (E) and wild-type Lip2 (F) used to hydrolyze xanthophyll esters derived from *Capsicum annum*. Peak assignment: 1 (Z)-capsanthin; 2 all-(E)-capsanthin; 3 zeaxanthin; 4 β -cryptoxanthin; 5 all-(E)- β -carotene. Peaks between 20 and 45 min correspond to xanthophyll mono- and diesters. Reactivated or inactivated enzyme was mixed with the assay substances as described by ZORN (2005).

4.5 Discussion

Numerous esterases and lipases from a large variety of organisms have been functionally expressed in heterologous hosts, but only one lipase from a basidiomycetous yeast has recently been cloned and expressed in *E. coli* (DEANGELIS *et al.*, 2007). Lip2 represents the first basidiomycetous fungus lipase that has been functionally expressed in a heterologous host.

Refolding yielded soluble and functional proteins for s-Lip2-His and Lip2-His. Apparently, neither the particular codon usage of *P. sapidus* nor the lacking glycosylation restricted the active expression of Lip2 in *E. coli* (Tab. 4). Both variants had similar catalytic activity against *p*-NPP and paprika oleoresin, indicating that the structure of the active sites was not significantly altered. The signal sequence was neither essential nor prejudicial for *E. coli* to produce active enzyme. This was shown for other lipases, for example for lipase B from *Candida antarctica* (BLANK *et al.*, 2006). However, the C-terminal tag was necessary to express Lip2 in *E. coli*: No activity was found in the experiments with s-Lip2 and Lip2. SDS-PAGE indicated that no recombinant protein was produced with these constructs. A localization sequence in the C-terminus of this enzyme that interfered with functional expression in *E. coli* similar to peroxisomal targeting sequence motives (GOULD *et al.*, 1987) could explain this result. An improvement of active expression of Lip2 in *E. coli* could be achieved by using other vector constructs, for example one which contains a thioredoxin fusion sequence (TANG *et al.*, 2000) or one with an *E. coli* specific signal sequence for expression in the periplasm (BLANK *et al.*, 2006). Work in this direction has started.

With the annotation of the *Coprinopsis cinerea* genome (BIRREN *et al.*, unpublished) many putative lipase sequences with a low homology to known microbial and yeast lipases and a high homology to Lip2 have been revealed. These sequences may serve as starting points to screen for other lipases with likewise unusual properties.

The functional expression of Lip2 in *E. coli* opens the possibility to modify the present enzyme by site directed mutagenesis. Fusion proteins may be designed without a loss of activity to support (directed) immobilisation. Investigation of the substrate specificity of Lip2 for both hydrolytic and synthetic reactions may lead

to new applications which are not feasible with current microbial or yeast lipases (PANDEY *et al.*, 1999). No information about the 3-D structure of Lip2 is available yet. Heterologous expression can produce enough material for X-ray analysis, which in turn may contribute to explain the uncommon catalytic properties of Lip2.

4.6 Acknowledgements

Support of the work by the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (AZ 13164) is gratefully acknowledged.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der biotechnologischen Erschließung von Farb- und Aromastoffquellen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie.

Es wurde eine enzymatische Synthese von Furanoterpenen mit lyophilisiertem Mycel zahlreicher *Pleurotus* Arten durchgeführt. Als Substrate dienten Monoterpene, die eine 1,3-Dienstruktur aufweisen. Als Intermediate der enzymatischen Katalyse wurden 1,4-Endoperoxide identifiziert. Durch weitere nicht enzymatische Schritte werden aus diesen 1,4-Endoperoxiden die entsprechenden Furanoterpene gebildet. Mit 6-Methyl-2-methylen-hept-5-enal wurde zusätzlich eine neue natürliche Verbindung identifiziert, deren Bildung sich über ein 1,2-Endoperoxid als Zwischenstufe erklären lässt. Methoden zur Visualisierung entsprechender Enzymaktivitäten wurden entwickelt und die Enzyme biochemisch charakterisiert.

Zum Transfer der enzymatischen Bildung des Sequiterpenoids (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen in einen Industrieprozess war die Kenntnis des Bildungsmechanismus gefordert. Mit dieser Arbeit wurden tertiäre Hydroperoxide identifiziert. Durch eine Schenkumlagerung zu sekundären Valencenhydroperoxiden und durch anschließende Eliminierung von H₂O wurde (+)-Nootkaton gebildet. Eine P450-Katalyse kann ausgeschlossen werden.

Die codierende Region einer Lipase (*lip2*), die sich zur Capsantindiesterhydrolyse eignet, wurde in *E. coli* spezifischen Expressionsvektoren ligiert. Die Expression der cDNA führte zur Produktion von rekombinanter Lip2, welche hauptsächlich in Form von *inclusion bodies* vorlag. *Refolding*-Strategien ergaben aktives rekombinantes Protein. Die Lipase aus *P. sapidus* ist das erste Enzym eines höheren Basidiomyceten der Lipase/Esterase Familie, welches in einem heterologen Wirt exprimiert wurde.

Schlagwörter: *Pleurotus sapidus*, Basidiomyceten, Biokatalyse, Terpene

6 Summary

This work deals with the biotechnological exploration of sources of colorants and flavours for the food and cosmetics industry.

Enzymatic synthesis of furanoterpenoids from β -myrcene and related monoterpenes was observed using a solubilised enzyme fraction of mycelium lyophilisates of several *Pleurotus* species. The initial enzymatic step, the incorporation of molecular oxygen into the conjugated 1,3-diene moiety, was similar to a 2 + 4 cycloaddition of 1,3-dienes with dienophilic $^1\text{O}_2$, and was followed by a non-enzymatic reaction sequence leading to the furans. One metabolite was identified as the new natural compound 6-methyl-2-methylenehept-5-enal. The enzymatic formation of this compound through a 1,2-endoperoxide is suggested. Methods for the visualisation of enzyme activity were developed. The corresponding enzyme was biochemically characterised.

To transfer the enzymatic formation of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone from (+)-valencene into an industrial process, insight into the pathway was required. Tertiary hydroperoxides were identified as primary products. These undergo a Schenk rearrangement to give the secondary hydroperoxides which degrade to (+)-nootkatone by the loss of water. Hence, the common allylic hydroxylation by a P450-activity could be ruled out.

The 1641 bp cDNA encoding an extra-cellular lipase (Lip2) which possessed the distinct property to convert xanthophyll esters into free xanthophylls was cloned from a cDNA library. Expression of the cDNA in *E. coli* led to the production of recombinant Lip2, mainly as inclusion bodies with low catalytic activity. Refolding yielded catalytically active protein. The *P. sapidus* lipase represents the first enzyme of the lipase/esterase family from a basidiomycetous fungus characterised on the molecular level and expressed in a manageable host.

Keywords: *Pleurotus sapidus*, basidiomycete, biocatalysis, terpenes

7 Literaturverzeichnis

Akbayin H, Yildiz A, Ertekin AS (1998): An experimental study on mycelial development period of some *Pleurotus* species, *P. ostreatus*, *P. sapidus* and *P. sajor-caju*, on the media that contain certain amount of barley crumb or wheat flour. *Biochem Arch*, 14, 199-206.

Antranikian G, Heiden S (2006). White biotechnology: Status quo and future. *Nachrichten aus der Chemie*, 54, 1202-1206.

Ayer SW, Anderson RJ (1983): Degraded monoterpenes from the opisthobranch mollusc *Melibe leonine*. *Experientia*, 39, 255-256.

Bader A, Caponi C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I (2003): Acorenone in the essential oil of flowering aerial parts of *Seseli tortuosum* L. *Flavour Fragr J*, 18(1), 57-58.

Bairamian S, Beauchamp PS, Descalzo JT, Dev BC, Dev V, Frost SC, Nguyen CV (2004): California Lomatiums Part III. Composition of the hydrodistilled oils from two varieties of *Lomatium dissectum*. Isolation of a new hydrocarbon. *J Essent Oil Res*, 16(5), 461-468.

Barma DK, Kundu A, Baati R, Mioskowski C, Falck JR (2002): A convenient preparation of 3-substituted furans: synthesis of perillene and dendrolasin. *Org Lett*, 4(8), 1387-1389.

Bauer K, Garbe D, Surburg H (2002): Common fragrance and flavor materials. Wiley-VCH, Weinheim.

Berger RG (1995): Aroma biotechnology. Springer-Verlag, Berlin.

Bernadi R, Cardani C, Ghiringhelli D, Sela A (1967): On the components of secretion of mandibular glands of the ant *Lasius (Dendrolasius) fuliginosus*. Tetrahedron Lett, 40, 3893-3896.

Birren B, Nusbaum C, Abebe A *et al.* (unpublished)

Blank K, Morfill J, Gump H, Gaub HE (2006): Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 125, 474-483.

Blum H, Beier H, Gross HJ, (1987): Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8, 93-99.

Bouws H (2007): Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008): Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol, 80, 381-388.

Brauer B (2004): Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen. Doktorarbeit. Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Breithaupt DE, Wirt U, Bamedi A (2002): Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. J Agric Food Chem, 50, 66-70.

Breithaupt DE (2000): Enzymatic hydrolysis of carotenoid fatty acid esters of red pepper (*Capsicum annuum* L.) by a lipase from *Candida rugosa*. Z Naturforsch, 55C, 971-976.

Breitmeier E (1999): Terpene, Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone. Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart.

Breitmaier E (2005): Terpene. Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone. Wiley-VCH, Weinheim.

Buckenhüskes HJ (1999): Aktuelle Anforderungen an Paprikapulver für die industrielle Verarbeitung. Z Arzn Gew pfl, 4, 11-118.

Busmann D, Berger RG (1994): Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes. J Biotechnol, 37, 39-43.

Cane DE, Salaski, EJ, Prabhakaran PC (1990): Preparation of (-)-aristolochene from (+)-valencene: Absolute configuration of (+)-aristolochene from *aspergillus terreus*. Tetrahedron Lett, 31, 1943-1944.

Chida M, Sone Y, Tamura H (2004): Aroma characteristics of stored Tobacco cut leaves analyzed by a high vacuum distillation and canister system. J Agric Food Chem, 52(26), 7918-7924.

Crowell PL (1999): Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr, 129, 775-778.

Dastur KP (1973): A stereoselective approach to eremophilane sesquiterpenes. A synthesis of (\pm)-nootkatone. J Am Chem Soc, 95, 6509-6510.

Daugulis AJ, Bone DH (1977): Submerged cultivation of edible white-rot fungi on tree bark. J Appl Microbiol, 4, 159-166.

Davies AG, Davison IGE (1989): The rearrangements of allylic hydroperoxides derived from (+)-valencene, J Chem Soc Perkin Trans II, 825-830.

DeAngelis YM, Saunders CW, Johnstone KR, Reeder NL, Coleman CG, Kaczvinsky JR (2007): Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIP1. J Investig Dermatol, 127, 2138-2146.

Demole E, Demole C, Berthet D(1973): Chemical study of burley tobacco Flavor (*Nicotiana tabacum* L) . 3. Structure determination and synthesis of 5-(4-Methyl-2-furyl)-6-methylheptan-2-one(Solanofuran) and of 3,4,7-Trimethyl-1,6-dioxaspiro[4.5]dec-3-en-2-one (Spiroxabovolide) - 2 New flavor components of Burley Tobacco. Helv Chim Acta, 56, 265-271.

Dhavlikar RS, Albroscheit G (1973): Mikrobiologische Umsetzung von Terpenen: Valencen. Dragoco Rep, 12, 251-258.

Dordick JS (1989): Enzymic catalysis in monophasic organic solvents. Enzyme Microb Technol, 11, 194-211.

Drawert F, Berger RG, Godelmann R (1984): Regioselective biotransformation of valencene in cell suspension cultures of *Citrus* sp. Plant Cell Rep, 3, 37-40.

Dubendorff JW, Studier FW (1991): Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 Promoter with lac repressor. J Mol Biol, 219, 45-59.

Duetz WA, Bouwmeester H, Beilen JB van, Witholt B (2003): Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. Appl Microbiol Biotechnol, 61, 269-277.

Dufossé L (2006): Microbial production of food grade pigments. Food Tech Biotechnol, 44, 313-321.

Dusbabek F, Zahradnickova H, Simek P (1998): Chemical stability of assembly pheromone of argasid ticks (*Ixodidae: Argasidae*). Folia Parasitol, 45(1), 62-66.

Eisenbrand G (2006): Römpp-Lexikon Lebensmittelchemie. Thieme, Stuttgart.

Engel KH, Heidlas J, Albrecht W, Tressl R (1989): Biosynthesis of chiral flavor and aroma compounds in plants and microorganisms. ACS Symposium Series. 388, 8-22.

Erdtman H, Hirose Y (1962): The chemistry of the natural order cupressales. Acta Chem Scand, 16, 1311-1314.

Etoh H, Utsunomiya Y, Komori A, Murakami Y, Oshima S, Inakuma T (2000): Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice. Biosci Biotechnol Biochem, 64, 1096-1098.

Faber K (2004): Biotransformations in organic chemistry. Berlin, Springer.

Forno G, Fogolin MB, Oggero M, Kratje R, Etcheverrigaray M, Conradt HS, Nimtz M (2004): N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. Eur J Biochem, 271 (2004) 907-919.

Fraatz MA (2007): Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen. Dissertation, Leibniz Universität, Hannover

Fraatz MA, Kopp SJL, Berger RG, Zorn H (2008): Enzymatische Synthese von Nootkaton. Lebensmittelchemie, in press

Fraatz MA, Kopp SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H (2008): A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone, submitted

Fritz C (2008): Allylix will make terpene products in yeast. Industrial Bioprocessing, 30 , 3-4.

Fugmann B, Adam G (1997): Römpp-Lexikon Naturstoffe. Thieme, Stuttgart.

Furusawa M, Hashimoto T, Noma Y, Asakawa Y (2005): Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene, by biotransformation. Chem Pharm Bull (Tokyo) 53, 1513-1514.

Gabriele B, Salern G (1997): A new and efficient synthesis of rosefuran. A general synthesis of furans by palladium-catalysed cycloisomerization of (Z)-2-en-4-yn-1-ols. Chem Commun, 1083-1084.

Gaikwad NW, Madyastha KM (2002): Biosynthesis of β -substituted furan skeleton in the lower furanoterpenoids: A model study. Biochem Biophys Res Commun, 290, 589–594.

Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008): Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. Trends Biotechnol, 26, 139-145.

Gould SJ, Keller A-G, Subramani S (1987): Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase . J Cell Biol, 105, 2923-2931.

Gonzalez P, Labarère J (2000): Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. Microbiology, 146, 209-221.

Guo L-Q, Lin J-Y, Lin J-F (2007): Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. Food Chem, 100, 643-649.

Hapetta D (2007): Metabolismus von β -Myrcen in *Pleurotus ostreatus* DSMZ 1020 unter Berücksichtigung der Perillenbiogenese. Dissertation, Leibniz Universität, Hannover

Haring HG, Rijkens F, Boelens H, Gen A van der (1972): Olfactory studies on enantiomeric eremophilane sesquiterpenoids. *J Agric Food Chem*, 20, 1018-1021.

Heiden S (2006) in *Weißer Biotechnologie. Industrie im Aufbruch*. (Eds.: Heiden S, Zinke H) Biocom, Berlin, 9-32.

Hencken H (1992): Chemical and physical behaviour of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult Sci*, 71, 711-717.

Hendriks H, Malingre T, M, Batterman S, Bos R (1978): The essential oil of *Cannabis sativa* L. *Pharm Weekbl*, 113(17), 413-424.

Higashi-Okai K, Yamazaki M, Nagamori H, Okai Y (2001): Identification and antioxidant activity of several pigments from the residual green tea (*Camellia sinensis*) after hot water extraction. *J UOEH*, 23, 335-44.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680.

Hiraoka H, Mori N, Okabe K, Nishida R, Kuwahara Y (2003): Chemical ecology of astigmatid mites LXIX. Neryl formate [3,7-dimethyl-(Z)-2,6-octadienyl formate] as the alarm pheromone of an acarid mite, *Histiogaster rotundus* Woodring (*Acari: Acaridae*). *Appl Entomol Zool*, 38(3), 379-385.

Honda G, Yuba A, Nishizawa A, Tabata M (1994): Genetic control of geraniol formation in *Perilla frutescens*. *Biochem Genet*, 32, 155-159.

Hu S, Yang L, Pan J, Xu Z (1985): Comparative study on the components of essential oils from 12 *Artemisia* species as medicinal plants. *Zhongcaoyao*, 16(2), 80-82.

Huang R, Christenson PA, Labuda IM (2001): Process for the preparation of nootkatone by laccase catalysis. Patent US 6200786.

Huber W, Fröhlike E (1972): Ein neues Sprühreagens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden, *Chromatographia*, 5, 256-257.

Hubner G, Volkl W, Francke W, Dettner K (2002): Mandibular gland secretions in alloxytine wasps (*Hymenoptera, Cynipoidea, Charipidae*): do ecological or phylogenetical constraints influence occurrence or composition? *Biochem Syst Ecol*, 30 (6), 505-523.

Hunter GLK, Brogden WB Jr (1965): Conversion of valencene to nootkatone. *J Food Sci* 30, 876-878.

Iramma G, Shailaja DN, Shivaleela K (1999): Impact of fungal growth on the physical properties of silk fabric. *Indian Silk*, 38, 24-27.

Ito M, Honda G (2006): Geraniol synthases from *perilla* and their taxonomical significance. *Phytochemistry (Oxf)*, 68, 446-453.

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

Kaspera R, Krings U, Nanzad T, Berger RG (2005b): Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 477-483.

Kaspera R, Krings U, Pescheck M, Sell D, Schrader J, Berger RG (2005a): Regio- and stereoselective fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Z Naturforsch C*, 60, 459-466.

Khachik F, Spangler CJ, Smith Jr JC (1997): Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *J Agric Food Chem*, 69, 1873-1881.

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

Kikuchi T, Kadota S, Tanaka K, Nishi A (1984): Odorous metabolites of an acellular slime mold, *Physarum polycephalum* Schw., and a basidiomycete, *Phallus impudicus* Pers. *Chem Pharm Bull*, 32, 797-800.

Kondo H, Yamaguchi S (1919): Volatile componets of *Perilla citriodora*. *Ykugaku Zasshi*, 446, 263-275.

Kovàts E (1958): Gas-Chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. 1. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv Chim Acta*, 41, 1915-1932.

Kraft P; Bajgrowicz JA, Denis C, Fràter G (2000): Allerlei Trends: die neuesten Entwicklungen in der Riechstoffchemie. *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger* 112, 3106-3138.

Kraker J-W de, Schurink M, Franssen MCR, König WA, Groot A de, Bouwmeester HJ (2003): Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron*, 59, 409-418.

Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Mircobiol Biotechnol*, 49, 1-8.

Krings U, Hapetta D, Berger RG (2008a): Bioconversion of β -myrcene to perillene by *Pleurotus ostreatus*. *Biocatal Biotransform*, 26, 288-295.

Krings U, Hapetta D, Berger RG (2008b): A labeling study on the formation of perillene by submerged cultured oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Appl Microbiol Biotechnol, 78, 533-541.

Krings U, Berger RG (2008c): In situ recovery of the aroma compound perillene from stirred-tank cultured *Pleurotus ostreatus* using gas stripping and adsorption on polystyrene. Biotechnol Lett, 30, 1347-1351.

Krings U, Krügener S, Rinne S, Berger RG (2008d): Bioconversion of β -myrcene to perillene – metabolites, pathways, and enzymes. Proc. Weurman Symposium 2008, in press

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

Larraya LM, Pérez G, Ritter E, Pisabarro AG, Ramírez L (2000): Genetic Linkage Map of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol, 66, 5290-5300.

Leal WS, Kuwahara Y, Suzuki T, Nakao H (1989): Pheromone study on astigmatid mites. Part XXV. Chemical taxonomy of economically important *Tyrophagus* mites (*Acariformes*, *Acaridae*). Agric Biol Chem, 53(12), 3279-3284.

Lee YP, Chung GH, Rhee JS (1993): Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. BBA, 1169, 156-164.

Linden H, Sandmann G (1999): Carotene hydroxylase and method for producing xanthophyll derivatives. WO2000/061764.

Linke D, Bouws H, Peters T, Nimtz M, Berger RG, Zorn H (2005a): Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. Agric Food Chem, 53, 9498-9505.

Linke D, Zorn H, Gerken B, Parlar H, Berger RG (2005b): Foam fractionation of exo-lipases from growing *Pleurotus sapidus*. *Lipids*, 40, 323-327.

Liu Y, Xu MJ, Canfield LM (1998): Enzymatic hydrolysis, extraction, and quantitation of retinol and major carotenoids in mature human milk. *J Nutr Biochem*, 9, 178-183.

Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessenn L (1999): Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* 17, 282-289.

Longo MA, Sanromán MA (2006): Production of food aroma compounds. *Food Technol Biotechnol*, 44, 335-353.

Longhurst C, Baker R, Howse PE (1979): Chemical crypsis in predatory ants. *Experientia*, 35, 870-87.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.

Lynen F (1967) Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure Appl Chem*, 14, 137-167.

MacLeod WD Jr, Buiges N (1964): Sesquiterpenes. I. nootkatone, A new grapefruit flavor constituent. *J Food Sci*, 29, 565-568.

Maehashi K, Matsuzaki M, Yamamoto Y, Udaka S (1999): Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 555-559.

Majetich G, Behnke M, Hull K (1985): A stereoselective synthesis of (±)-nootkatone and (±)-valencene *via* an intramolecular sakurai reaction. *J Org Chem*, 50, 3615-3618.

Marshall JA, Ruden RA (1971): The stereoselective total synthesis of racemic nootkatone. *J Org Chem*, 36, 594-596.

Martín JF, Gudiña E, Barredo JL (2008): Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories* 2008, 7:3

Matsumoto M, Kondo K (1975): Sensitized photooxygenation of linear monoterpenes bearing conjugated double-bonds. *J Org Chem*, 40, 2259-2260.

Matsumoto M, Dobashi S, Kuroda K, Kondo K (1985): Sensitized photooxygenation of acyclic conjugated dienes. *Tetrahedron*, 41, 2147-2154.

Maurer (2006) in *Weiße Biotechnologie. Industrie im Aufbruch.* (Eds.: Heiden S, Zinke H) Biocom, Berlin, 118-119.

Muller B, Dean C, Schmidt C, Kuhn J-C (1998): Process for the preparation of nootkatone. Patent US 5847226.

Müller M, Dirlam K, Wenk HH, Berger RG, Krings U, KAspera R (2005): Method for the production of flavour-active terpenes. Patent WO 2005/078110 A1.

Miyazawa M, Nakamura Y, Ishikawa Y (2000): Insecticidal sesquiterpene from *alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem*, 48, 3639-3641.

Ntanios FY, Duchateau GSMJE (2002): A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterol-enriched spreads. *Int J Vitam Nutr Res*, 72, 32-39.

Nuero OM, García-Lepe R, Lahoz C, Santamaría F, Reyes F (1994): Detection of lipase activity on ultrathin-layer isoelectric focusing gels. *Anal Biochem*, 222, 503-505.

Ohloff G (1994): Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives. Berlin, Springer.

Ohloff G, Demole E (1987): Importance of the odoriferous principle of bulgarian rose oil in flavor and fragrance chemistry. J Chromatogr, 406, 181-183.

Ohloff G (1971): Präparative Möglichkeiten mit Singulett-sauerstoff. Nachr Chem Techn, 24, 446-448.

Okito K, Sakaida I, Hino K (2002): Current Strategies for chemoprevention of hepatocellular carcinoma. Oncology, 62, Suppl.1, 24-28.

Okuda M, Sonohara H, Takigawa H, Tajima K, Ito S (1994): Nootkatone manufacture with *Rhodococcus* from valencen. Patent JP 06303967A.

Onken J, Berger RG (1999): Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. J Biotechnol, 69, 163-168.

Ortuño A, García-Puig D, Fuster MD, Pérez ML, Sabater F, Porrás I, García-Lidón A, Río JA del (1995): Flavanone and nootkatone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. J Agric Food Chem 43, 1-5.

Ourisson G, Rohmer M, Poralla K (1987): Prokaryotic jopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. Annu Rev Microbiol, 41, 301-333.

Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999): The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem, 29, 119-131.

Peláez AA, Meneses MM, Miranda RLA, Megias RMD, Barcena GR, Loera O (2008): Advantages of solid fermentation state with *Pleurotus sapidus* in sugar cane silage. Arch Zootec, 57, 25-33.

Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI (2002): Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569, 31-34.

Pesaro M, Bozzato G, Schudel P (1968): Total synthesis of racemic nootkatone. *Chem Commun*, 1152-1154.

Pommer H (1977): Die Wittig-Reaktion in der industriellen Praxis. *Angew Chem*, 89, 437-443

Rehm H-J, Reed G, Kelly DR (1998). *Biotechnology*. 8a, Wiley-VCH, Weinheim

Río JA del, Ortuño A, Puig DG, Iborra JL, Sabater F (1991): Accumulation of the sesquiterpenes nootkatone and valencene by callus cultures of *Citrus paradisi*, *Citrus limonia* and *Citrus aurantium*. *Plant Cell Rep*, 10, 410-413.

Rohmer M (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16, 565-574.

Sakamaki H, Itoh K-I, Taniai T, Kitanaka S, Takagi Y, Chai W, Horiuchi CA (2005): Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*. *J Mol Catal B-Enzym*, 32, 103-106.

Salvador JAR, Clark JH (2002): The allylic oxidation of unsaturated steroids by tertbutyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts. *Green Chemistry*, 4, 352-356.

Sauer AM, Crowe WE, Laine RA, Henderson G (2006): Efficient And economic assymetric synthesis of nootkatone, tetrahydronootkatone, their precursors and derivatives. Patent US 7112700 B1.

Sawamura M, Kuriyama T (1988): Quantitative determination of volatile constituents in the pummelo (*Citrus grandis* Osbeck forma Tosa-buntan). J Agric Food Chem, 36, 567-569.

Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, Boer L de, Berger RG, Zorn H (2008): Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade β -carotene. Appl Microbiol Biotechnol, 77, 1241-1250.

Schenck GO, Neumuller OA, Eisfeld W (1958), Justus Liebigs Ann Chem, 202.

Schmid RD, Verger R (1998): Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. Angew Chem Int Ed, 37, 1608-1633.

Schrader J, Berger RG (2001): Biotechnological production of flavor and fragrance compounds. In: Biotechnology. (Eds. Rehm H-J, Reed G, Wiley-VCH, Weinheim.

Schrader J (2007): Microbial flavour production. In: Berger RG (ed) Flavour and fragrances, Springer, Berlin, pp. 507-566.

Schreier P (1997): Enzymes and flavour biotechnology. Adv Biochem Eng Biotechnol, 55, 51-72.

Schwab W, Schreier P (2002): Enzymic formation of flavour volatiles from lipids. In: Lipid Biotechnology (Eds. Kuo TM, Gardner HW, Dekker), New York, 293-318.

Schulte-Elte K-H, Fracheboud MG, Ohloff G (1974): Procédé pour la préparation d'une cétone bicyclique. Patent CH 541533.

Serra S, Fuganti C, Brenna E (2005): Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. Trends Biotechnol, 23, 193-198.

Shaffer GW, Eschinasi EH, Purzycki KL, Doerr AB (1975): Oxidations of valencene. *J Org Chem*, 40, 2181-2185.

Shoji N, Umeyama A, Asakawa Y (1984): Structural determination of nootkatol, a new sesquiterpene isolated from *Alpinia oxyphylla* Miquel possessing calcium-antagonistic activity. *J Pharm Sci*, 73, 843-844.

Sikkema J, Bont JAM de, Poolman B (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 59, 201-222.

Sowden RJ, Yasmin S, Rees NH, Bell SG, Wong L-L (2005): Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3. *Org Biomol Chem*, 3, 57-64.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006): Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101, 87-96.

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990): Use of T7 RNA-polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185, 60-89.

Suzuki M, Ohtake H, Kameya Y, Hamanaka N, Noyori R (1989): Ruthenium(II)-catalyzed reactions of 1,4-epiperoxides. *J Org Chem*, 54, 5292-5302.

Takano S, Morimoto M, Satoh S, Ogasawara K (1884): Synthesis of perillene and rosefuran from common starting materials. *Chemistry Lett*, 1261-1262.

Tang SJ, Sun KH, Sun GH, Chang TY, Lee GC (2000): Recombinant expression of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 20, 308-313.

Taskova RM, Zorn H, Krings U, Bouws H, Berger RG (2006): A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from *Pleurotus* and *Lepista* sp. *Z Naturforsch C*, 61, 347-350.

Torii S, Inokuchi T, Handa K (1982): Functionalization of trans-Decalin. V. A synthesis of (\pm)-nootkatone and (\pm)-valencene from 4 β ,4a β -Dimethyl- Δ 6,7-octal-1-one ethylene acetal. Bull Chem Soc Jpn, 55, 887-890.

Turner JA, Herz W (1977): Iron(II)-induced decomposition of unsaturated cyclic peroxides derived from butadienes. A simple procedure for synthesis of 3-alkylfurans. J Org Chem, 42, 1900-1904.

Vandamme EJ (2003): Bioflavours and fragrances *via* fungi and their enzymes. Fungal Divers, 13, 153-166.

Veselovsky EE, Moiseenkof AM (1993): A short synthesis of some monoterpenoids from the adduct of myrcene with benzenesulfinyl chloride. Russ Chem Bull, (42)1, 102-106.

Wang Y, Zeng F, Hon CC, Zhang Y, Leung FC (2008): The mitochondrial genome of the *Basidiomycete* fungus *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). FEMS Microbiol Lett, 280, 34-41.

Wasson RL, House HO (1963): Isophorone oxide. Organic Synthesis, 4, 552.

Welsh FW, Murray WD, Williams RE (1989): Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. Crit Rev Biotechnol, 9, 105-169.

Werf MJ van der, Bont JAM de, Leak DJ (1997): Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology (Eds. Scheper T), Berlin, Springer.

Wharton P, Bohlen D (1961): Hydrazine reduction of α,π -epoxy ketones to allylic alcohols. J Org Chem, 26 (9), 3615-3616.

Willershausen H, Graf H (1991): Enzymatische Transformation von Valencen zu Nootkaton, Chemiker-Zeitung, 115, 358-360.

Wilson CW, Shaw PE (1978): Synthesis of nootkatone from valencene. *J Agric Food Chem*, 26, 1430-1432.

Winkler UK, Stuckmann M, (1979): Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J of Bacteriol*, 138, 663-670.

Yanami T, Miyashita M, Yoshikoshi A (1980): Synthetic study of (+)-nootkatone from (-)- β -pinene. *J Org Chem*, 45, 607-612.

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

Zhu BC, Henderson G, Sauer AM, Yu Y, Crowe W, Laine RA (2003): Structureactivity of valencenoid derivatives and their repellence to the Formosan subterranean termite. *J Chem Ecol*, 29, 2695-2701.

Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG (2003): Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme Microb Technol*, 32, 623-628.

Zorn H, Bouws H, Takenberg M, Nimtze M, Getzlaff R, Breithaupt D, Berger RG (2005a): An extra-cellular carboxylesterase from the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biol Chem*, 386, 435-440.

Zorn H, Peters T, Nimtze M, Berger RG (2005b): The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics*, 5, 4832-4838.

8 Anhang

Lebenslauf

Sven Krügener
geb. 28.12.1980 in Hannover, Niedersachsen

Schulbildung

30.6.2000 Abitur, Hannah Arendt Gymnasium Barsinghausen (Niedersachsen)

Zivildienst

9/2000-8/2001 Therapiestation für drogenabhängige Kinder und Jugendliche „Teen Spirit Island“, Hannover

Studium

10/2001-10/2003 Universität Hannover, Diplombiologie-Studium
Vordiplom bestanden

10/2003-9/2004 Universität Hannover, Bachelor-Studium Life Science
Bachelorarbeit: "Peptidasen aus Basidiomyceten"

10/2004-9/2006 Universität Hannover, Master-Studium Life Science,
Masterarbeit: "Biokonversion von Myrcen mit *Pleurotus sapidus*"

Promotion

Seit 10/2006 Universität Hannover, Wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Institut für Lebensmittelchemie bei Prof. Dr. Dr.
Ralf G. Berger

Zusatzausbildungen

Qualitätsmanagement/GMP-Beauftragter

Betriebsbeauftragter Gewässerschutz

Fortbildungslehrgang „Gentechnische Sicherheit“

Geprüfter Projektmanager Wirtschaftschemie GDCh

Hannover, den 10.6.2009

Hiermit erkläre ich, Sven Krügener, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Unterlagen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Juni 2009

Sven Krügener