

Enzymatische Synthese oxyfunktionaler Kohlenwasserstoffe

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemikerin

Ina Plagemann

geboren am 14.11.1983 in Hannover

2014

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

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 02. Dezember 2013

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der enzymatischen Synthese und Charakterisierung oxyfunktionaler Kohlenwasserstoffe.

Die brasilianische Frucht Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg) wurde mittels gaschromatographischer Verfahren (GC-FID, GC-O, GC-FPD, GC-MS) im Hinblick auf ihre flüchtigen, aromaaktiven Komponenten untersucht. Es konnten insgesamt 45 flüchtige Verbindungen identifiziert werden, von denen 23 sensorisch wahrnehmbar waren. Neben organischen Säuren und Alkoholen prägten vor allem oxyfunktionalisierte Terpenkohlenwasserstoffe das Aroma der Früchte. So konnten mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse β -Pinen, δ -Cadinen, 2-Phenylethanol sowie Linalool als aromabestimmende Substanzen ermittelt werden.

Die Oxyfunktionalisierung von Kohlenwasserstoffen wird enzymatisch oftmals durch Vertreter der Oxygenasen katalysiert, zu deren Klasse auch Lipoxygenasen gehören. Eine in früheren Arbeiten beschriebene Valencen transformierende Dioxygenase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* wurde als Lipoxygenase (LOX_{Psa1}) identifiziert. Das native Enzym konnte erstmals vollständig aus lyophilisiertem Myzel isoliert und die Aminosäuresequenz mittels nLC-ESI-MS/MS untersucht werden. Aufgrund einer hohen Substratspezifität gegenüber freier Linolsäure wurde LOX_{Psa1} als Lipoxygenase vom Typ 1 klassifiziert. Rekombinant in *Escherichia coli* produzierte LOX_{Psa1} zeigte für dieses Substrat K_m -, v_{max} - und k_{cat} -Werte von 40.3 μ M, 130.3 U mg^{-1} und 157 s^{-1} . Sowohl das native als auch das rekombinante Enzym besaßen pH- und Temperaturoptima bei pH 7 und 30-35 °C. Die Biokonversion von Linolsäure mit LOX_{Psa1} lieferte 9- und 13-Hydroperoxide in einem Verhältnis von 20:80, was massenspektrometrisch (MS²) nachgewiesen wurde. Anhand von Homologien der Aminosäuresequenz wurde eine S-stereospezifische Oxygenierung postuliert und mittels chiraler HPLC-Analytik bestätigt. Der Enantiomerenüberschuss des 13S-Linolsäurehydroperoxids betrug 94 %.

Schlagwörter

Oxyfunktionalisierung, Lipoxygenase, Terpenoide

Summary

This work deals with the enzymatic synthesis and characterization of oxyfunctional hydrocarbons.

The Brazilian fruit Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg) was investigated in terms of volatile, aroma-active compounds by means of gaschromatographic techniques (GC-FID, GC-O, GC-FPD, GC-MS). A total of 45 compounds were identified with 23 imparting a sensory impression. Among organic acids and alcohols particularly oxyfunctionalized terpenes were found to contribute to the flavour of the fruits. Application of aroma extract dilution analysis showed that β -pinene, δ -cadinene, 2-phenylethanol and linalool were the most potent odorants.

The enzymatic oxyfunctionalization of hydrocarbons often is catalyzed by oxygenases including lipoxygenases. A dioxygenase from the basidiomycet *Pleurotus sapidus* formerly described because of its ability to convert valencene, was identified as a potent lipoxygenase (LOX_{psa1}). For the first time, the native enzyme was isolated from lyophilized mycelium completely. Its amino acid sequence was investigated by nLC-ESI-MS/MS. Owing to a high specificity towards free linoleic acid, LOX_{psa1} was classified as lipoxygenase type 1. Using linoleic acid as the substrate, recombinant LOX_{psa1} produced in *Escherichia coli* exhibited K_m , v_{max} , and k_{cat} of 40.3 μ M, 130.3 U mg^{-1} , and 157 s^{-1} , respectively. The pH- and temperature optima were pH 7 and 30-35 °C in both the native and recombinant enzyme. Bioconversion of linoleic acid with LOX_{psa1} resulted in 9- and 13-hydroperoxids at a ratio of 20:80, which were identified by means of mass spectrometry (MS²). Based on homology of the amino acid sequence *S* stereospecific oxygenation was postulated and confirmed by chiral HPLC analysis. The enantiomeric excess of 13*S*-hydroperoxylinoleic acid was 94 %.

Keywords

oxyfunctionalization, lipoxygenase, terpenoids

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft, den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Weiterhin danke ich besonders Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Betreuung der Arbeit und sein stets offenes Ohr für anregende Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und Herrn Prof. Dr. Thomas Debener für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Muito obrigado sage ich Herrn Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Jr. und seinem Arbeitskreis von der Universidade Estadual de Campinas (Brasilien) für die interessante Kooperation und die Gastfreundschaft während des Besuchs im Frühjahr 2011.

Dem BMBF-Cluster Biokatalyse2021 und der AIF *via* Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V., Bonn, danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Das hervorragende Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Miteinander am Institut für Lebensmittelchemie werden mir stets in guter Erinnerung bleiben. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für diese unvergessliche Zeit.

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2010 bis Juli 2013 im Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der 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 (Förderkennzeichen: 0315172F)
2. „Aromastoffe aus Nebenströmen“, AiF 299 ZN

Teile dieser Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften publiziert, auf internationalen Fachtagungen vorgestellt und in Form von Posterpräsentationen veröffentlicht.

Veröffentlichungen

1. **Plagemann, I.**, Zelena, K., Krings, U., Berger, R. G. (2011): Volatile flavours in raw egg yolk of hens fed on different diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 2061-2065.
2. **Plagemann, I.**, Krings, U., Berger, R. G., Marostica, M. R., Jr. (2012): Volatile constituents of Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. *Journal of Essential Oil Research*, 24(1), 45-51.
3. **Plagemann, I.**, Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P. D., Krings, U., Berger, R. G. (2013): LOX_{Psa1}, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 99-104.
4. Leonhardt, R.-H., **Plagemann, I.**, Linke, D., Zelena, K., Berger, R. G. (2013): Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. - A Comparison of Substrate Specificity and Sequence Homology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 189-195.
5. **Plagemann, I.**, Krings, U., Berger, R. G. (2014): Isolation and characterization of wild-type LOX_{Psa1} from *Pleurotus sapidus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, DOI: 10.5560/ZNC.2013-0133. (*in press*)
6. Omarini, A. B., **Plagemann, I.**, Schimanski, S., Krings, U., Berger, R. G. (2013): Crosses between monokaryons of *Pleurotus* spp. represent a non-recombinant tool for the improved biotransformation of (+)-valencene to (+)-nootkatone. (*submitted*)

Tagungsbeiträge

1. **Plagemann, I.**, Zelena, K., Krings, U., Berger, R. G. (2012): Promiscuity of a novel lipoxygenase (LOX) from *Pleurotus sapidus*. Catalysing Bio-Economy – Biocatalysts for Industrial Biotechnology. *Book of abstracts* 22.
2. **Plagemann, I.**, Zelena, K., Arendt, P., Krings, U., Berger, R. G. (2012): Charakterisierung einer rekombinanten Lipoxygenase (LOX) aus *Pleurotus sapidus*. *Lebensmittelchemie*, 66(3), 62.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Terpene und Terpenoide.....	2
1.1.1 Klassifizierung	3
1.1.2 Biosynthese von Terpenen	3
1.1.3 Enzymatische Oxyfunktionalisierung von Terpenen	5
1.1.4 Struktur und Geruch terpenoider Verbindungen	9
1.2 Oxygenasen.....	10
1.2.1 Monooxygenasen	11
1.2.2 Dioxygenasen.....	17
1.3 Lipoxygenasen.....	21
1.3.1 Struktureller Aufbau von Lipoxygenasen.....	21
1.3.2 Mechanismus Lipoxygenase-katalysierter Reaktionen	23
1.3.3 Regiospezifität Lipoxygenase-katalysierter Reaktionen	24
1.3.4 Stereospezifität Lipoxygenase-katalysierter Reaktionen.....	25
1.3.5 Biologische und industrielle Bedeutung von Lipoxygenasen.....	26
1.4 Zielsetzung	28
2 Volatile constituents of Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> (Vell) O. Berg)	30
2.1 Abstract	30
2.2 Introduction	30
2.3 Experimental	31
2.3.1 Plant material	31
2.3.2 Chemicals.....	31

2.3.3	Extraction of volatile compounds	31
2.3.4	Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) and Flame Ionization Detection (GC-FID)	32
2.3.5	Aroma extract dilution analysis (AEDA)	32
2.3.6	Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).....	32
2.3.7	Gas Chromatography Flame Photometric Detection (GC-FPD)	33
2.3.8	Preparative Gas Chromatography (prep-GC).....	33
2.3.9	Identification.....	33
2.4	Results and Discussion	34
3	<i>LOX_{psa}1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus</i>	39
3.1	Abstract.....	39
3.2	Introduction.....	39
3.3	Material and methods.....	41
3.3.1	Chemicals.....	41
3.3.2	Protein concentration.....	41
3.3.3	SDS-PAGE and Western Blotting.....	41
3.3.4	Peptidolytic cleavage of the His-tag.....	42
3.3.5	Enzyme activity	42
3.3.6	Chemical characterization of reaction products.....	43
3.3.7	Substrate specificity	43
3.3.8	Preparation of racemic hydroperoxy linoleic acid	43
3.3.9	Synthesis of hydroxy linoleic acid	43
3.3.10	Purification of hydroxy linoleic acid	44
3.3.11	Chiral HPLC.....	44
3.3.12	Liquid chromatography / tandem mass spectrometry	44
3.4	Results and discussion.....	45
3.4.1	Effect of the His-tag on the activity of the recombinant LOX _{psa} 1	45
3.4.2	Catalytic and kinetic properties of the recombinant LOX _{psa} 1	46
3.4.3	Analysis of reaction products.....	48

3.5	Conclusion.....	51
4	<i>Isolation and characterization of wild-type LOX_{psa-1} from Pleurotus sapidus</i>	52
4.1	Abstract	52
4.2	Introduction	52
4.3	Materials and methods.....	53
4.3.1	Fungus	53
4.3.2	Purification of active enzyme	54
4.3.3	Preparative isoelectric focusing (pIEF)	54
4.3.4	Ion exchange chromatography (IEX).....	54
4.3.5	Size exclusion chromatography (SEC).....	54
4.3.6	Gel electrophoresis.....	55
4.3.7	Enzyme activity.....	55
4.3.8	Determination of pH and temperature optima	55
4.3.9	LOX identification	55
4.4	Results and discussion	56
5	<i>Ausblick</i>	60
6	<i>Literatur</i>	62
7	<i>Lebenslauf</i>	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Volatile compounds of Jabuticaba fruits	34
Tab. 2-2 Character impact compounds of Jabuticaba fruits.....	37
Tab. 3-1 Kinetic parameters of the recombinant LOX _{Psa} 1 compared to other LOX.....	47
Tab. 3-2 Alignment of LOX _{Psa} 1 and LOX-1 from soybean.....	50
Tab. 4-1 Summary of the purification of LOX _{Psa} 1 from <i>Pleurotus sapidus</i>	56

Abbildungsverzeichnis

Fig. 1-1 Schematische Darstellung der Biosynthese von Terpenen	4
Fig. 1-2 Biosyntheseweg von α - und β -Pinen	5
Fig. 1-3 Produktspektrum der Oxygenierung von Limonen durch P450-Monooxygenasen.....	6
Fig. 1-4 Mono- und Dioxygenase-katalysierte Transformation von (+)-Valencen	7
Fig. 1-5 Dioxygenierung von Terpenen durch <i>Pleurotus</i> spp.	8
Fig. 1-6 Exemplarische Darstellung Oxidoreduktase-katalysierter Reaktionen	11
Fig. 1-7 Katalysezyklus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	12
Fig. 1-8 Hydroxylierung von Codeinon durch <i>P. putida</i>	13
Fig. 1-9 Katalysezyklus Flavin-abhängiger Monooxygenasen am Beispiel der Baeyer-Villiger-Oxidation	15
Fig. 1-10 Enantioselektive Biotransformation von <i>p</i> -Ethyltolylsulfid.....	17
Fig. 1-11 Postulierter Mechanismus der Oxidation aromatischer Substrate durch Rieske-Dioxygenasen.....	18
Fig. 1-12 Mikrobielle <i>cis</i> -Hydroxylierung bei der Darstellung von L-Ascorbinsäure.....	19
Fig. 1-13 Postulierter TDO- und IDO-katalysierter Biosynthesewege zum Abbau von Tryptophan	20
Fig. 1-14 Schematische Darstellung der Lipoxygenase-Reaktion.....	24
Fig. 2-1 Chromatogramm of the extract of Jaboticaba fruits (CP-Wax column).....	36
Fig. 3-1 Peptidolytic cleavage of the His-tag from the recombinant LOX _{Psa} 1 using Factor Xa Protease.....	45
Fig. 3-2 Effect of pH on activity of the recombinant LOX _{Psa} 1	46
Fig. 3-3 Effect of temperature on activity of the recombinant LOX _{Psa} 1	47
Fig. 3-4 LC-MS/MS chromatogram of linoleic acid oxidized by recombinant LOX _{Psa} 1	48

Fig. 3-5 Separation by CP-HPLC-UV/Vis of stereoisomers of hydroxy linoleic acid (HODE)	49
Fig. 4-1 Preparative isoelectric focusing of a crude extract from <i>P. sapidus</i>	57
Fig. 4-2 SDS-PAGE of the purified LOX from <i>Pleurotus sapidus</i> after three-step purification.	57
Fig. 4-3 Sequence coverage of native LOX.....	58
Fig. 4-4 Effect of temperature and pH value on activity of the purified LOX.....	58

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AEDA	<i>aroma extract dilution analysis</i>
API	<i>atmospheric pressure ionization</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BVMO	Baeyer-Villiger-Monooxygenase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CHMO	Cyclohexanon-Monooxygenase
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CLLE	<i>continuous liquid-liquid extraction</i>
CP-HPLC	<i>chiral phase high-performance liquid chromatography</i>
CV	<i>column volume</i>
CYP	Cytochrom-P450
Da	Dalton
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DOX	Dioxygenase
ee	<i>enantiomeric excess</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	<i>electron impact mode</i>
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

FD	<i>flavor dilution factor</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
GC	Gaschromatograph(ie)
<i>G. max</i>	<i>Glycine max</i>
HODE	<i>hydroxy octadecadienoic acid / hydroxy linoleic acid</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HPOD	<i>hydroperoxy octadecadienoic acid / hydroperoxy linoleic acid</i>
i.d.	<i>inner diameter</i>
IDO	Indolamin-Dioxygenase
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPP	Isopentylpyrophosphat
KAS	Kaltaufgabesystem
LC	<i>liquid chromatography</i>
Lit.	Literatur
LOX	Lipoxygenase
M	molar
MCS	<i>multidimensional switching system</i>
MeOH	Methanol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MEP	Methylerythritol-4-phosphat
MVA	Mevalonat
m/z	Masse-Ladungsverhältnis

n.a.	<i>not available</i>
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n.d.	<i>not detected</i>
n.p.	<i>not perceived</i>
n.q.	<i>not quantified</i>
O	Olfaktometrie
ODP	<i>odor detection port</i>
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pIEF	präparative isoelektrische Fokussierung
<i>P. putida/ oleovorans</i>	<i>Pseudomonas putida/ oleovorans</i>
<i>P. sapidus/Psa</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
QTOF	<i>quadrupole time of flight</i>
RI	Retentionsindex
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
TDO	Tryptophan-Dioxygenase
THF	Tetrahydrofuran
tr	<i>trace</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)

UV	Ultraviolet
ValOx	Valencenoxygenase
Vis	<i>visible</i>
v/v	<i>volume by volume</i>
w/v	<i>weight by volume</i>

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- und Dreibuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

„Im achtzehnten Jahrhundert lebte in Frankreich ein Mann, der zu den genialsten und abscheulichsten Gestalten dieser an genialen und abscheulichen Gestalten nicht armen Epoche gehörte. Seine Geschichte soll hier erzählt werden. Er hieß Jean-Baptiste Grenouille, und wenn sein Name [...] heute in Vergessenheit geraten ist, so [...] weil sich sein Genie und sein einziger Ehrgeiz auf ein Gebiet beschränkte, welches in der Geschichte keine Spuren hinterlässt: auf das flüchtige Reich der Gerüche.“ [1]

Bereits Jahrtausende bevor Patrick Süskinds Romanfigur in „Das Parfum“ die Welt der Gerüche mit seinem phänomenalen Geruchssinn erkundete, wurden in vielen Kulturkreisen Duft- und Aromastoffe verwendet. So nutzen die Menschen schon seit Urzeiten aromatische Pflanzen um den Geschmack ihrer Nahrung zu beeinflussen. Im alten Ägypten und Mesopotamien wurden Rauchharze sowie wohlriechende Salben und Öle zu religiösen und medizinischen Zwecken eingesetzt. Antike Keilschriften und zahlreiche Passagen in der Heiligen Schrift wie die Rezeptur für „Salböl und Räucherwerk“ (2. Mose 30, 22-38) zeugen davon, dass dabei besonders Weihrauch und Myrrhe zum Einsatz kamen [2].

Wurden zunächst nur Pflanzen oder Pflanzenteile zur Aromatisierung eingesetzt, gelang den Arabern mit der Entwicklung von Destillationstechniken im 9. Jahrhundert schließlich die Isolierung der kostbaren Inhaltsstoffe [3]. Bis heute stellt dies einen bedeutenden Schritt für die Parfumherstellung und Aromaentwicklung dar.

Während in früheren Zeiten Duft- und Aromastoffe der wohlhabenden Oberschicht vorbehalten waren, sind sie heutzutage für jedermann zugänglich und in einer Vielzahl alltäglicher Produkte zu finden. Neben Kosmetikartikeln, Wasch- und Reinigungsmitteln werden beispielsweise auch Kunststoffe oder die Raumluft mit Riechstoffen angereichert. Durch die zunehmende Bedeutung industriell gefertigter und abgepackter Getränke und Nahrungsmittel steigt auch die Nachfrage nach Aromen in diesem Bereich stetig an. Vor allem fruchtige und süße Geschmacksnoten zur Aromatisierung von Erfrischungsgetränken und Milchprodukten spielen eine wichtige Rolle. Sie machen etwa 80 % der Aromastoffe aus.

Insgesamt werden in Deutschland jährlich etwa 11.100.000 t aromatisierte Lebensmittel¹ verzehrt. Rund 70 % der dort zugesetzten 1.220 t Aromastoffe² gelten nach der EU-Aromenverordnung als natürlich³ [4].

Allerdings kann dieser enorme Bedarf aufgrund knapper Ausgangsmaterialien zu oft hohen Preisen nicht ausschließlich durch Extrakte aus natürlichen Quellen gedeckt werden. Zunehmend stellt die moderne biotechnologische Produktion von Aromen eine effiziente und kostengünstige Alternative dar. Gegenüber chemischen Synthesewegen bietet sie den Vorteil, dass die Produkte meist eine hohe Enantiomerenreinheit aufweisen und zudem nach der Aromenverordnung als „natürliche Aromastoffe“ gekennzeichnet werden können. Insbesondere biokatalytische Lösungsansätze zur wertschöpfenden Oxyfunktionalisierung nicht oder kaum geruchsaktiver Kohlenwasserstoffe zu aromaaktiven Verbindungen stehen dabei im Fokus der Forschung.

Um der wachsenden Nachfrage der Verbraucher nach neuartigen Geschmackseindrücken und dem Wunsch nach gesunden, natürlichen Lebensmitteln gerecht zu werden, stellt zudem die Suche nach bisher unbekanntem Kompositionen in der modernen Aromaforschung einen wichtigen Punkt dar.

1.1 Terpene und Terpenoide

Natürlich vorkommende Duftstoffe gehören häufig zu der Familie der Terpenkohlenwasserstoffe und ihren oxyfunktionalisierten Derivaten – den sogenannten Terpenoiden. Mit etwa 40.000 Verbindungen, die sich alle vom Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) ableiten, stellen sie die größte Klasse an Naturstoffen dar [5]. Vor allem Pflanzen

¹ „Erzeugnis, das [...] Lebensmitteln zugesetzt wird, um ihnen einen besonderen Geruch und/oder Geschmack zu verleihen oder diese zu verändern“ (Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe a Ziffer i der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008)

² „chemisch definierter Stoff mit Aromaeigenschaften“ (Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe b der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008)

³ Natürliche Aromastoffe werden „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen [...]. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden.“ (Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe c der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008)

synthetisieren eine Fülle isoprenoider Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer strukturellen Diversität vielfältige Aufgaben übernehmen. Nadelbäume schützen sich beispielsweise mit der Produktion toxischer Monoterpene wie α - und β -Pinen, Limonen oder Myrcen vor Schädlings- oder Pilzbefall [6]. Sesquiterpene wie Germacren D und α -Farnesen dienen in Kiwi- und Apfelblüten als Lockstoffe für Insekten zur Bestäubung [7].

1.1.1 Klassifizierung

Terpene und Terpenoide lassen sich formal auf Isopren (C_5) zurückführen und werden so auch als Isoprenoide bezeichnet. Nach der von Leopold Ružička 1953 formulierten Isoprenregel [8] entstehen sie durch *head-to-tail* und *tail-to-tail* Verknüpfungen mehrerer C_5 -Einheiten. Monoterpene (C_{10}) setzen sich aus zwei, Sesquiterpene (C_{15}) aus drei und Diterpene (C_{20}) aus vier Isoprenuntereinheiten zusammen. Triterpene, zu denen beispielsweise auch Squalen und Calciferol gehören, sind C_{30} -Verbindungen; Tetraterpene, wie Carotine und Carotinoide besitzen ein C_{40} -Grundgerüst. Moleküle, die mehr als acht Isopreneinheiten enthalten, kommen zum Beispiel in Naturkautschuk vor und werden als Polyterpene ($> C_{40}$) bezeichnet [9]. Die enorme Vielfalt der Stoffklasse, die neben acyclischen auch zahlreiche cyclische Verbindungen enthält, ergibt sich aus Cyclisierungs- und Umlagerungsreaktionen wie denen nach Cope oder Wagner-Meerwein [10].

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird oftmals nicht klar zwischen Terpenen und Terpenoiden differenziert. Der Terminus „Terpen“ ist jedoch *per definitionem* für reine Kohlenwasserstoff-Verbindungen vorgesehen. Terpenoide sind hingegen oxyfunktionalisierte Moleküle. Aufgrund von Umlagerungs- und Abspaltungsreaktionen während der Biosynthese ist der Aufbau aus Isopreneinheiten oftmals nicht klar zu erkennen [11].

1.1.2 Biosynthese von Terpenen

Die Biosynthese von Terpenen basiert auf der initialen Bildung aktiver Isopren-Einheiten. Für die Bildung des Dimethylallylpyrophosphats (DMAPP) und dessen Isomer Isopentylpyrophosphat (IPP) sind heute zwei Biogenesewege bekannt. Bereits Mitte der 1950er wurde der sogenannte Mevalonat-Weg (MVA-Weg) aufgeklärt. Ausgehend von drei Molekülen Acetyl-CoA, die über Claisen-Kondensation und nachfolgende Aldol-Reaktion verknüpft werden, entsteht zunächst Mevalonat. Anschließend Phosphorylierungs-,

Decarboxylierungs und Dehydratisierungsreaktionen führen schließlich zum IPP und dem isomeren DMAPP (Fig. 1-1, linker Zweig) [12].

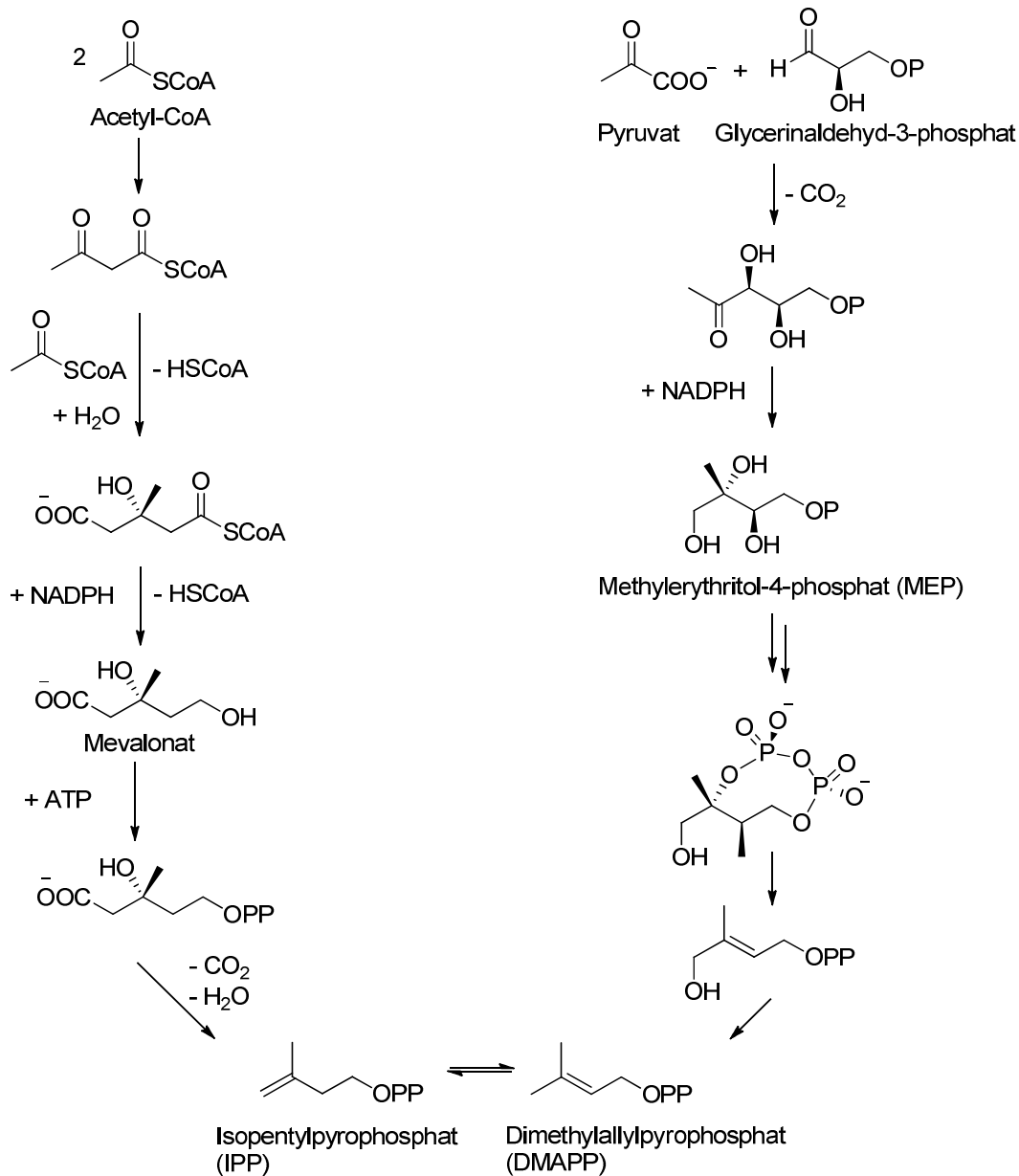


Fig. 1-1 Schematische Darstellung der Biosynthese von Terpenen [9, 13, 14]

(linker Zweig: MVA-Weg; rechter Zweig: MEP-Weg)

Für Bakterien, Algen und höhere Pflanzen beschrieb Michel Rohmer 1999 den Mevalonat-unabhängigen Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg). Ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd wird durch Decarboxylierung und Reduktion zunächst das namensgebenden Methylerythritol-4-phosphat erzeugt. In anschließenden Reduktions-, Phosphorylierungs-,

Cyclisierungs- und Umlagerungsschritten wird dies zu IPP bzw. DMAPP umgesetzt (Fig. 1-1, rechter Zweig) [14].

In einer Prenyltransferase-katalysierten nucleophilen Substitution werden die beiden C₅-Bausteine IPP und DMAPP zu Geranylpyrophosphat verknüpft. Entsprechende Terpensynthasen setzen dieses zu Monoterpenen (C₁₀) wie α - oder β -Pinen um. Sesquiterpene wie δ -Cadinen oder (+)-Valencen werden aus Farnesylpyrophosphat synthetisiert, das durch die Anbindung einer weiteren IPP-Einheit entsteht (Fig. 1-2). Bei beiden in Fig. 1-2 gezeigten Biosynthesewegen stellt eine allylische Umlagerung mit anschließender Bindungsrotation den ersten Schritt dar. In der nachfolgenden π -Cyclisierung entsteht unter Abspaltung des Diphosphatanions ein Carbokation, das elektrophil an eine verbleibende Doppelbindung addiert. Der entstandene Bicyclus deprotoniert abschließend zu α - oder β -Pinen bzw. δ -Cadinen [15].

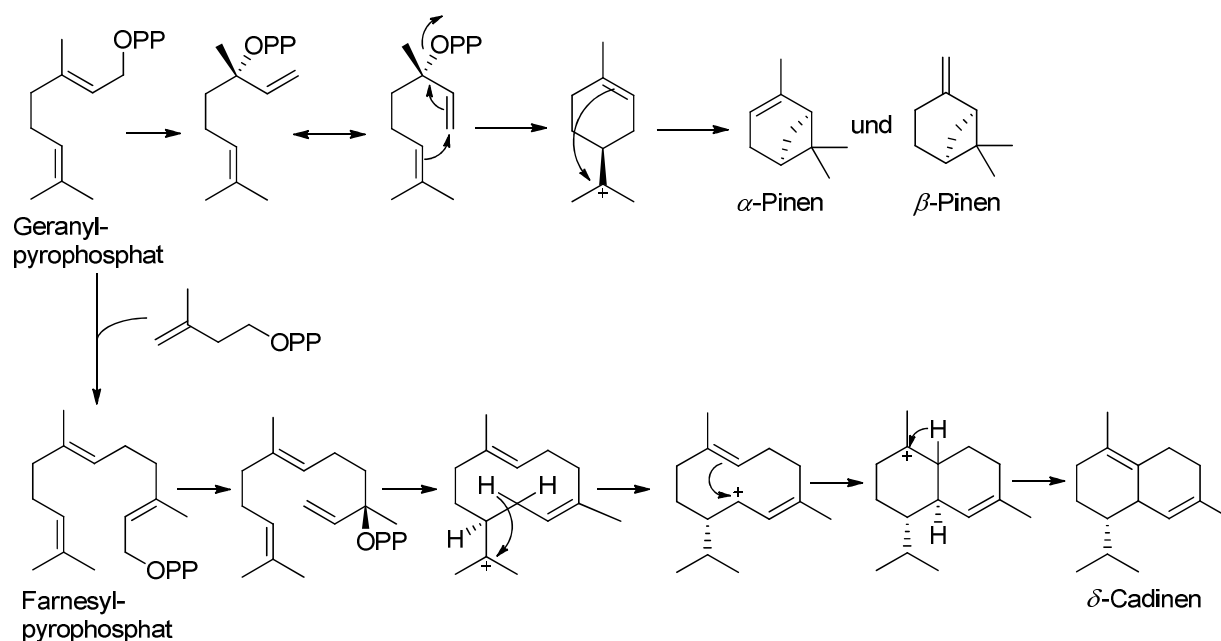


Fig. 1-2 Biosyntheseweg von α - und β -Pinen (oben) sowie δ -Cadinen (unten) [15, 16]

1.1.3 Enzymatische Oxyfunktionalisierung von Terpenen

Die Einsatzbereiche von Terpenoiden sind ebenso vielfältig wie die Substanzen selbst. Neben der bereits beschriebenen Anwendung als Duft- und Aromastoffe macht sich die Landwirtschaft beispielsweise die insektizide Wirkung von Estern der (+)-trans-Chrysanthemumsäure zunutze. Sie werden als sogenanntes Pyrethrum aus getrockneten Blüten verschiedener *Tanacetum*-Arten isoliert [17]. Auch in der Medizin finden sich

zahlreiche Anwendungsbeispiele. So dient das aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* gewonnene Diterpen (–)-Taxol zum Beispiel als Zytostatikum in der Tumorthherapie [18] und das aus *Artemisia annua* isolierte Sesquiterpen Artemisinin wird zur Behandlung von Malaria eingesetzt [19].

Klassischerweise werden Terpenoide aus ätherischen Ölen isoliert. Mit Konzentrationen von unter 5 % ist ihr Anteil in Pflanzen jedoch gering und die Isolierung der oft nur in Spuren vorliegenden Substanzen aufwändig, kostenintensiv und ineffektiv [20]. Auf der Suche nach wirtschaftlichen, saisonunabhängigen und gleichzeitig natürlichen Alternativen sind in den letzten Jahren zunehmend biotechnologische Verfahren zur Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen ins Visier der Aromaindustrie und -forschung gerückt. Nebenströme der Holz- und Lebensmittelindustrie stellen eine nahezu unbegrenzte Ressource wenig geruchsaktiver Terpenkohlenwasserstoffe dar. Mit einem Anteil von bis zu 90 % sind α - und β -Pinen die Hauptbestandteile des Terpentinöls. Jährlich fallen 160.000 t α -Pinen und 26.000 t β -Pinen an. Große Mengen (+)-Limonen werden als Nebenprodukt bei der Herstellung von Orangensaft gewonnen (50.000 t a⁻¹) [20]. Ihre Nutzung beschränkte sich bislang weitgehend auf den Einsatz als Lösungs- und Verdünnungsmittel in der Lack- und Farbenindustrie.

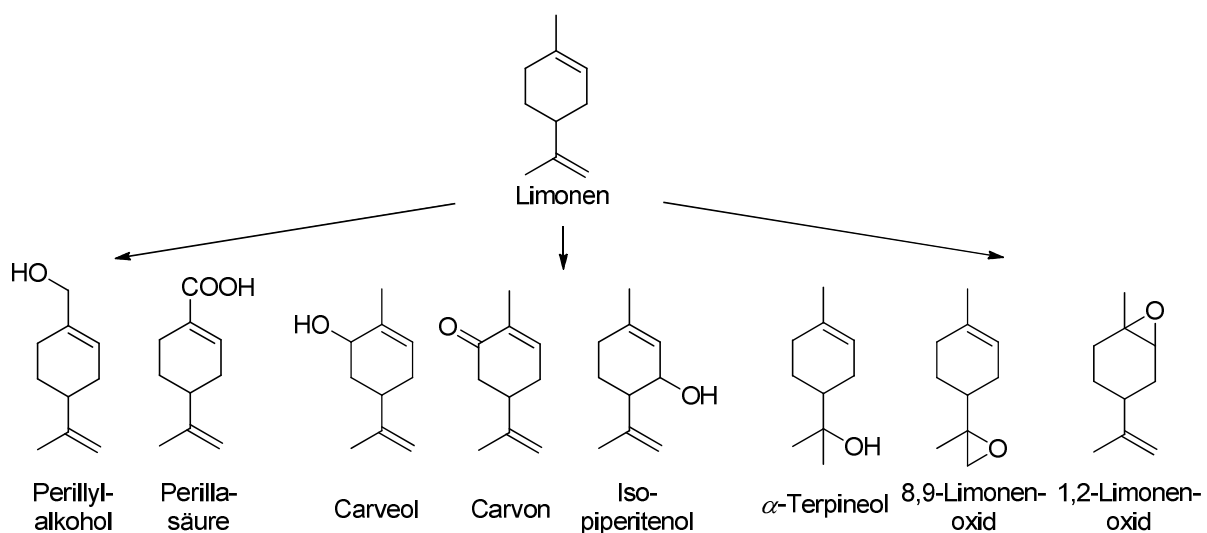


Fig. 1-3 Produktspektrum der Oxygenierung von Limonen durch P450-Monooxygenasen

Inzwischen sind zahlreiche Mikroorganismen bekannt, die in der Lage sind Terpene zu oxygenierten Verbindungen umzusetzen. Monooxygenierungen sind dabei meistens auf Cytochrom P450-Aktivität zurückzuführen. Van Beilen et al. beobachteten die

Transformation von (–)-Limonen zu (–)-Perillylalkohol und Spuren von Perillasäure durch eine P450-Hydroxylase aus *Mycobacterium sp.*, die rekombinant in *Pseudomonas putida* exprimiert wurde [21]. P450-Hydroxylasen aus *Mentha* spp. wiederum katalysieren die allylische Hydroxylierung an C6 zu (–)-*trans*-Carveol und (–)-Carvon sowie an C3 zu (–)-*trans*-Isopiperitenol [22]. Auch die bei einigen Mikroorganismen beobachtete Bildung von α -Terpineol und 1,2- bzw. 8,9-Limonenoxiden wird mit P450-Aktivität assoziiert [23].

Neben monocyclischen Terpenkohlenwasserstoffen können auch bicyclische Substrate durch Monooxygenasen funktionalisiert werden. Ausgehend von α -Pinen wurde unter Einfluss einer mutativ modifizierten P450_{cam}-Monooxygenase aus *P. putida* die Bildung von (+)-Verbenon und (+)-Verbenol beobachtet [24]. Rekombinant in *E. coli* exprimierte P450_{BM-3} aus *Bacillus megaterium* überführt α -Pinen hingegen in α -Pinenoxid, Myrtenol und Verbenol [25].

Ein weiteres Beispiel für die wertschöpfende Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen ist die Synthese von (+)-Nootkaton ausgehend von (+)-Valencen (Fig. 1-4). Während (+)-Valencen in großen Mengen aus Orangenöl isoliert werden kann, kommt (+)-Nootkaton in der Natur nur in sehr geringen Mengen vor. Es ist verantwortlich für den charakteristischen Geruch von Grapefruits und ist so beispielsweise ein beliebter Aromastoff in der Getränkeindustrie. Chemisch kann (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen unter Einsatz starker, zum Teil toxikologisch bedenklicher Oxidationsmittel wie *tert*-Butylchromat [26], Natriumdichromat [27], Triplett-Sauerstoff [28], *tert*-Butylperacetat [29] oder *tert*-Butylhydroperoxid [30] synthetisiert werden.

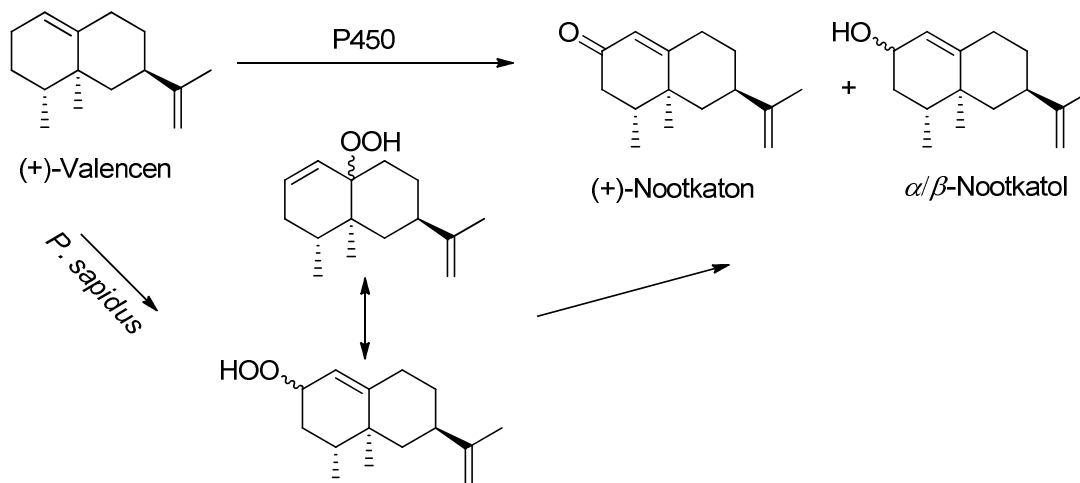


Fig. 1-4 Mono- und Dioxygenase-katalysierte Transformation von (+)-Valencen

Für die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton sind verschiedene Wege bekannt. Sowden et al. beobachteten, dass mutativ modifizierte P450_{cam}-Monooxygenasen aus *P. putida* neben α -Pinen auch (+)-Valencen als Substrat akzeptieren. Die Ausbeute an (+)-Nootkaton und dem entsprechenden β -Nootkatol beträgt > 85 %. Die Umsetzung mit den rekombinanten Monooxygenasen P450_{BM-3} aus *Bacillus megaterium* ist hingegen weniger spezifisch. In dem breiten Produktspektrum konnten u.a. α - und β -Nootkatol, (+)-Nootkaton, *cis*-(+)-Valencene-1,10-epoxid, *trans*-(+)-Nootkaton-9-ol und (+)-Nootkaton-13,14-epoxid identifiziert werden [31]. Ähnliches wurde bei der Biotransformation mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm, der die Monooxygenase CYP109B1 aus *Bacillus subtilis* exprimiert, beobachtet. Unter Verwendung eines Zweiphasensystems mit nicht-wassermischbaren organischen Lösungsmitteln gelingt es jedoch die Bildung der Nebenprodukte zu Gunsten von Nootkaton/ol zu limitieren [32].

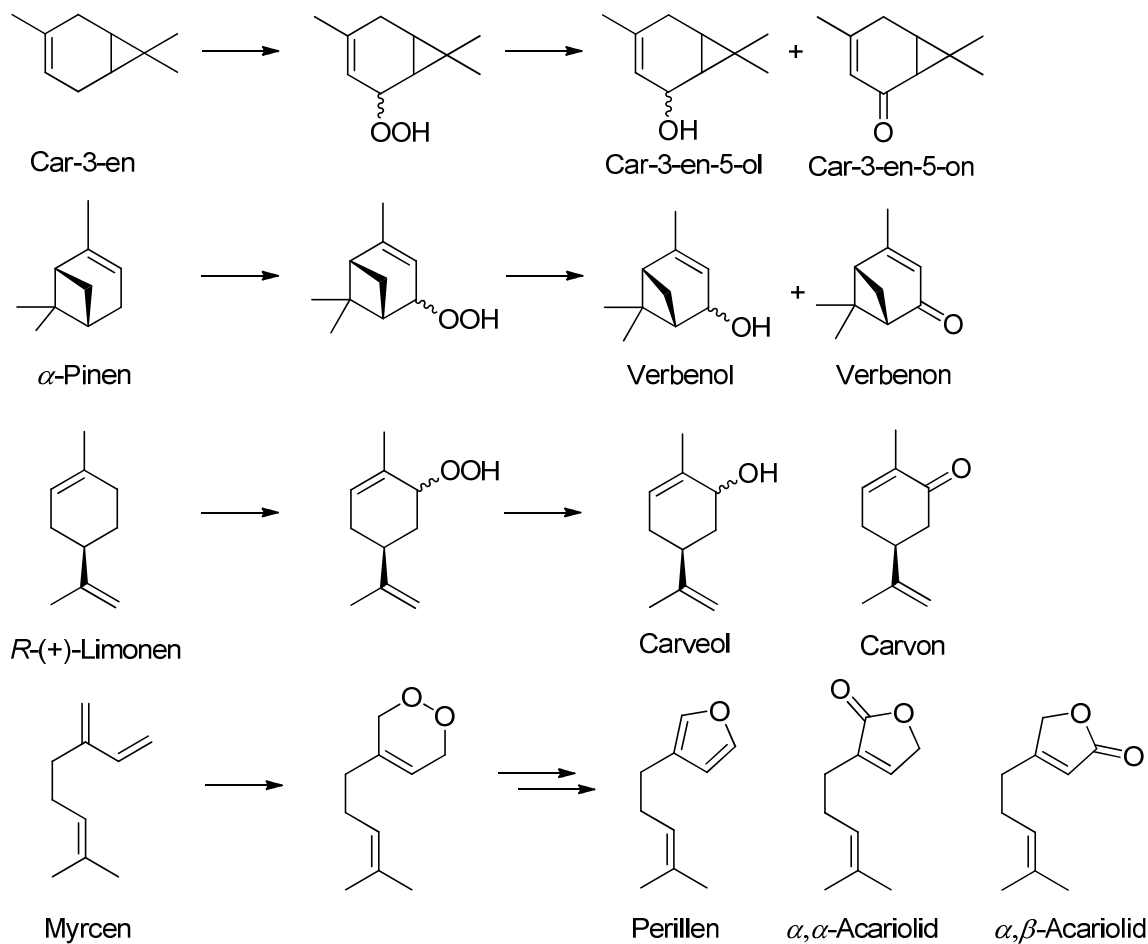


Fig. 1-5 Dioxygenierung von Terpenen durch *Pleurotus* spp.

Neben Monooxygenasen sind auch Dioxygenasen (DOX) in der Lage, Terpene zu oxyfunktionalisieren. Ein entsprechendes Enzym aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* katalysiert die regio- und stereospezifische Insertion von molekularem Sauerstoff in allylischer Position des (+)-Valencens. Die intermediär entstehenden Valencenhydroperoxide werden nachfolgend zu (+)-Nootkaton bzw. α -/ β -Nootkatol umgesetzt [33]. Analog erfolgt die Transformation von Car-3-en zu Car-3-en-5-on und *cis*-/*trans*-Car-3-en-5-olen über intermediäre Car-3-en-5-hydroperoxide [34, 35]. Biokonversionen von (*R*)-(+)-Limonen zu Carvon und *cis*-/*trans*-Carveolen [36], α -Pinen zu Verbenon und *cis*-/*trans*-Verbenolen [5] sowie β -Myrcen zu Perillen [37] werden ebenfalls auf DOX-Aktivität von *Pleurotus* spp. zurückgeführt.

Die DOX-katalysierte Spaltung von cyclischen sowie acyclischen Carotinoiden (CCD, *carotenoid cleaving dioxygenase*) führt in Pflanzen zur Bildung zahlreicher aromaaktiver Norisoprenoide. In Folge symmetrischer C9-C10/C9'-C10'-Fragmentierung von β -, ζ -Carotin, Lycopin und Phytoen wird in Tomaten die Bildung von β -Ionon, Pseudoionon und Geranylaceton sowie einem zentralen C₁₄-Dialdehyd-Spaltprodukt beobachtet [38]. 6-Methyl-5-hepten-2-on und 6-Methyl-5-hepten-2-ol resultieren aus der Spaltung von C5-C6/C5'-C6'-Doppelbindungen im Lycopin, sodass ihre Gehalte korrelieren [39]. Eine CCD1 aus Reis (*Oryza sativa*) ist in der Lage ausgehend von Lycopin neben Pseudoionon und 6-Methyl-5-hepten-2-on auch Geranial zu synthetisieren. Letzteres ist auf die Spaltung der C7-C8/C7'-C8'-Doppelbindungen zurückzuführen [40].

1.1.4 Struktur und Geruch terpenoider Verbindungen

Isoprenoide wie Mono-, Sesqui- und Diterpene leisten insbesondere bei frischen Früchten und Gemüse einen wesentlichen Beitrag zum charakteristischen Aromaprofil. Die Wahrnehmung und Unterscheidung der Geruchseindrücke erfolgt im Wesentlichen über das olfaktorische System, das, wie auch das gustatorische, auf chemosensorische Reize reagiert. Im Unterschied zu geschmacksaktiven Stoffen, die einen breiten Bereich unterschiedlicher Polaritäten und Molekülmassen aufweisen, handelt es sich bei olfaktorisch wahrnehmbaren Substanzen um kleine, nur bedingt wasserlösliche Moleküle. Sie gelangen mit der Atemluft zu der Riechschleimhaut (*Regio olfactoria*) im oberen Bereich der Nasenhöhle. Dieses Epithel enthält beim Menschen 10-30 Millionen Riechzellen, die einen bipolaren Aufbau besitzen.

Während sie lumenseitig über Zilien verfügen, die olfaktorische Rezeptorproteine enthalten, befinden sich am basalen Ende Axone, die gebündelt als *Nervus olfactorius* Reize an den Riechkolben übertragen. Des Weiteren verfügt die Riechschleimhaut über Stütz- und Basalzellen sowie sogenannte Bowman-Drüsen. Letztere sezernieren eine dünne Ca^{2+} -haltige Mucusschicht, die das gesamte Riechepithel überzieht und ihrem Schutz sowie der Adsorption von Geruchsstoffen dient [41]. Da jede Riechzelle nur über einen der etwa 350 Rezeptortypen verfügt, ist davon auszugehen, dass jeder Rezeptor durch eine Vielzahl verschiedener Geruchsmoleküle stimuliert wird [42, 43]. Die Differenzierung verschiedener Gerüche erfolgt durch eine für den jeweiligen Stoff charakteristische Kombination angeregter Nervenzellen [44].

Basierend auf dem von Emil Fischer formulierten Schlüssel-Schloss-Prinzip zur Beschreibung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, korreliert der Geruch einer Verbindung mit ihrer chemischen Struktur [45-47]. Unterschiede in der Regio- und Stereochemie sowie den funktionellen Gruppen können teilweise erhebliche Auswirkungen auf die Geruchsqualität und -intensität haben. Beispielsweise besitzt (*R*)-(+)-(*E*)- α -Ionon im Unterschied zu dem holzig riechenden (*S*)-(–)-(*E*)-Enantiomer einen fruchtig blumigen Duft [48]. Die Substitution der Hydroxygruppe des (*S*)-(–)- α -Terpineols durch eine Thiolgruppe bewirkt eine Veränderung des Geruchs von fliederartig zu Grapefruitsaft-ähnlich. Auch die Geruchsschwellenwerte zweier Isomere können stark variieren. So ist (+)-Nootkaton mit einem Schwellenwert von 0,001 mg/L in einer 1000fach geringeren Konzentration als das synthetische (–)-Nootkaton wahrnehmbar (in Wasser, 20 °C) [49]. Auch die völlige Geruchslosigkeit einzelner Stereoisomere ist bekannt [50].

1.2 Oxygenasen

Die in Abschnitt 1.1.3 beschriebene enzymatische Oxyfunktionalisierung von Terpenen erfolgt hauptsächlich durch Oxygenasen. Zusammen mit Dehydrogenasen, Reduktasen, Oxidasen und Peroxidasen gehören sie zu der Klasse der Oxidoreduktasen. Nach der internationalen EC-Nummerierung ist dies die erste von sechs Enzymklassen und katalysiert Redoxreaktionen.

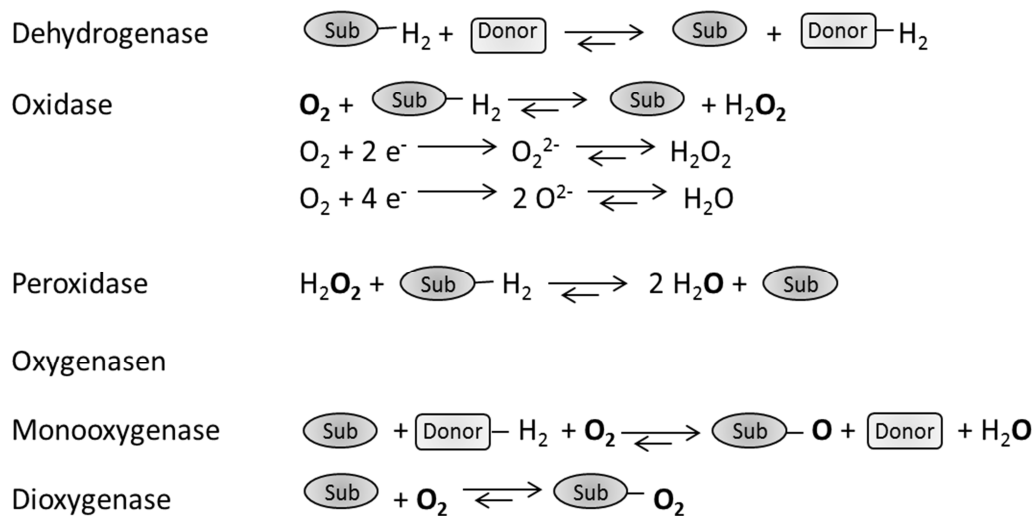


Fig. 1-6 Exemplarische Darstellung Oxidoreduktase-katalysierter Reaktionen

Während Dehydrogenasen ihre Substrate durch Abspaltung von H^- oxidieren, dient Peroxidasen, Oxidasen und Oxygenasen Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Fig. 1-6). In Oxidase-katalysierten Reaktionen werden zwei oder vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch dieser zu Wasserstoffperoxid und Wasser reduziert wird. Im Unterschied dazu fungiert in Peroxidasen Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel und wird biokatalytisch zu Wasser reduziert.

Für die Oxygenierung von Terpenen sind besonders Oxygenasen von Bedeutung, so dass sie im Folgenden besondere Beachtung finden sollen. Sie sind in der Lage die Übertragung von molekularem Sauerstoff zu katalysieren. Nach Anzahl der übertragenen Sauerstoffatome werden sie in Mono- und Dioxygenasen unterteilt [51]. Letztere umfassen auch Lipxygenasen (LOX), auf die in Abschnitt 1.3 näher eingegangen werden soll.

1.2.1 Monoxygenasen

Monoxygenasen sind in nahezu allen eukaryotischen und prokaryotischen Lebensformen zu finden. Sie katalysieren die Übertragung eines Atoms aus molekularem Sauerstoff auf ein Substrat. Unter gleichzeitiger Oxidation von NADH oder NADPH wird das zweite dabei zu Wasser reduziert. Die meisten Monoxygenasen benötigen zudem Cofaktoren wie Flavin, Häm oder Metallionen. Besonders verbreitet sind Häm-abhängige Cytochrom-P450-Monoxygenasen (CYP) sowie Flavin-abhängige Enzyme. In Eukaryoten kommen sie

hauptsächlich membrangebunden im endoplasmatischen Retikulum vor, während sie in Prokaryoten vor allem im Cytosol zu finden sind [52].

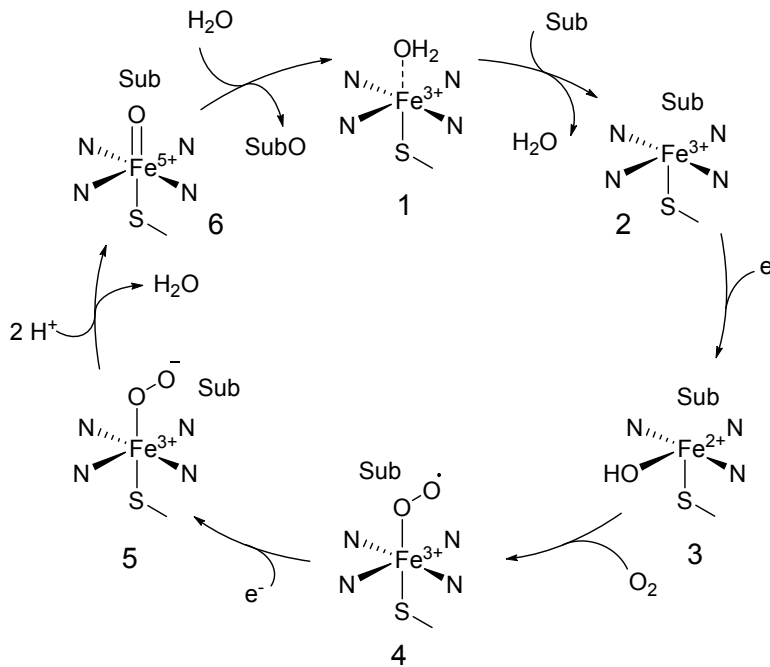


Fig. 1-7 Katalysezyklus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen [53]

Natürlich vorkommender molekularer Sauerstoff besitzt gegenüber organischen Substraten in der Regel eine eingeschränkte Reaktivität, so dass er in Oxygenase-katalysierten Reaktionen zunächst zu einem reaktiven Sauerstoffintermediat reduziert wird. Häufig fungieren NADH bzw. NADPH dabei als Elektronendonatoren. CYP enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Eisenatom, das durch einen tetradentaten Porphyrinliganden sowie je ein Wasser und Schwefel eines proteinogenen Cysteins in axialer Position koordiniert wird (1) (Fig. 1-7). In Gegenwart des Substrats wird das Wasser verdrängt und der sechsfach koordinierte *low-spin*- in einen fünffach koordinierten *high-spin*-Komplex überführt (2). Infolgedessen ist das Redoxpotential herabgesetzt und eine NADH-abhängige Cytochrom-P450-Reduktase kann das Eisen reduzieren (3) [54]. Die anschließende Anbindung von molekularem Sauerstoff führt zu einem Oxo-P450-Komplex (4), der durch die Übertragung eines weiteren Elektrons zu einem hoch reaktiven Komplex reduziert wird (5). Unter Spaltung der O-O-Bindung wird dieser schließlich zu Wasser und der oxidativ wirksamen Enzymform umgesetzt (6). Nach Insertion des Sauerstoffatoms in das Substrat liegt CYP wieder in der Ausgangsform vor [52].

In Flavin-abhängigen Monooxygenasen stellt ein Flavin-Sauerstoff-Intermediat die reaktive Spezies dar (Fig. 1-9), die in Abhängigkeit ihres Protonierungszustandes die Oxygenierung des Substrats nucleophil oder elektrophil katalysiert [52].

Die Palette an Monooxygenase-katalysierten Reaktionen ist breit. Neben Hydroxylierungen aliphatischer und aromatischer Verbindungen zählen hierzu im Wesentlichen Epoxidierungen von Olefinen, Baeyer-Villiger-Oxidationen von Ketonen sowie Oxidationen an Heteroatomen [52].

1.2.1.1 Hydroxylierung

Das Einbringen einer Hydroxylgruppe in ein Molekül, die Hydroxylierung, gehört zu den häufigsten enzymatischen Reaktionen. Entsprechende Monooxygenasen werden auch als Hydroxylasen bezeichnet. Hydroxylierte Verbindungen spielen im Stoffwechsel aller bekannter Organismen eine zentrale Rolle [55]. Zum Beispiel erfüllt die Hydroxylierung im Rahmen des Phase-1-Metabolismus in Säugerorganismen eine wichtige Funktion bei der Biotransformation hydrophober Xenobiotika. Die Oxidationsprodukte können in der Phase-2 an wasserlösliche Moleküle gekoppelt und ausgeschieden werden [56].

Hydroxylasen katalysieren die regio- und stereospezifische Insertion von Hydroxylgruppen in aromatische sowie aliphatische Verbindungen. Zudem sind sie in der Lage nicht aktivierte Kohlenwasserstoffatome zu funktionalisieren und stellen so eine vielversprechende Alternative zu konventionellen organischen Synthesewegen dar [53]. Oftmals kommen dabei Ganzellsysteme zum Einsatz, da Hydroxylasen meist membrangebunden als Multiproteinkomplexe vorliegen [55]. Industriell finden Hydroxylasen besonders bei der Produktion von Medikamenten und Aromastoffen Verwendung. Letztere wurde bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben.

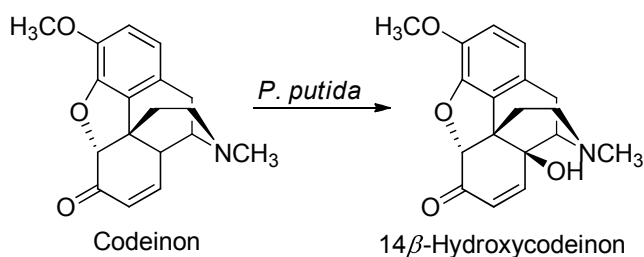


Fig. 1-8 Hydroxylierung von Codeinon durch *P. putida*

Codein und Codeinon können beispielsweise durch *P. putida* an dem chemisch kaum zu funktionalisierenden C14 hydroxyliert werden (Fig. 1-8). Diese Position ist für die analgetische Wirkung von zentraler Bedeutung [57].

Ein intensiv beforschtes Einsatzgebiet von Hydroxylasen ist die Steroidsynthese. Durch die Wahl geeigneter Organismen können heutzutage nahezu alle Positionen eines Steroidgerüsts regio- und stereospezifisch hydroxyliert werden [53]. So setzt eine Steroidhydroxylase aus *Bacillus megaterium* Progesteron zu 15β -Hydroxyprogesteron um [58], während *Acremonium strictum* das 15α -Derivat bildet [59]. An den Positionen 11α , 11β , 11α und 17α - sowie 6β und 17α kann die Hydroxylierung wiederum durch den Einsatz verschiedener *Trichoderma* spp. erzielt werden [60].

In monosubstituierten aromatischen Ringsystemen erfolgt die enzymatische Hydroxylierung bevorzugt in *o*- und *p*-Position, wohingegen *m*-Hydroxylierungen selten vorkommen [53]. Zum dabei ablaufenden Reaktionsmechanismus werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Donald M. Jerina postulierte in den 1960er Jahren, dass der aromatische Ring zunächst epoxidiert und das gebildete Arenoxid anschließend durch die 1,2-Verschiebung eines Hydrid-Anions (*NIH-shift*) zum Keton bzw. Phenol umgelagert wird [61]. Heutzutage erscheint jedoch auch die direkte enzymatische Hydroxylierung des Substrats nicht auszuschließen [62].

Zu den bekanntesten Hydroxylierungsreaktionen aromatischer Systeme zählt die Oxidation phenolischer Komponenten im Rahmen der enzymatischen Bräunung von Obst oder Gemüse. Sie ist auf die katalytische Aktivität von Polyphenoloxidasen (PPO) zurückzuführen. Infolge der Zerstörung pflanzlicher Zellkompartimenten überführen sie in Gegenwart von Sauerstoff Monophenole in *o*-Diphenole (Catechole) und oxidieren diese weiter zu *o*-Chinonen. Die bräunliche Verfärbung, die beispielsweise bei geschnittenem Apfel zu beobachten ist, resultiert aus Polymerisationsreaktionen der *o*-Chinone [63].

1.2.1.2 Epoxidierung

Eine wichtige Verbindungsklasse in der organischen Synthesechemie stellen Epoxide dar, da sie in der Lage sind mit zahlreichen nucleophilen Verbindungen zu reagieren. Ausgehend von Alkenen können sie über verschiedene Wege chemisch dargestellt werden. Besonders interessant sind dabei enantioselektive Methoden wie die nach Katsuki-Sharpless [64] oder Jacobsen [65]. Nachteilig ist jedoch zum einen den Einsatz stark oxidativer Agentien ($t\text{BuOOH}$ bzw. NaOCl oder *m*CPBA) und zum anderen eine eingeschränkte Selektivität bei der Funktionalisierung von terminalen und *cis*-Olefinen [53]. Als biologische Alternative bietet

sich die Verwendung von Monooxygenasen und auch Peroxidasen an. Terminale Alkene können beispielsweise über einen mehrstufigen radikalischen Reaktionsmechanismus durch eine Nicht-Häm-Eisen-haltige Monooxygenase aus *Pseudomonas oleovorans* zu (*R*)-Epoxiden transformiert werden [66]. Für die präparative Chemie stellt Styroloxid einen wichtigen Baustein dar. Ausgehend von Styrol kann das entsprechenden (*S*)-Enantiomer durch CYP aus *P. putida* generiert werden [67]. Enzymatische Epoxidierungen verlaufen zwar meistens hoch stereoselektiv, besitzen allerdings häufig den Nachteil einer niedrigen Produktausbeute. Bei der Biokonversion mit *P. oleovorans* liegt diese bei unter 20 % [66]. Aufgrund der Reaktivität der Reaktionsprodukte sind zudem häufig unerwünschte Nebenreaktionen zu beobachten, bei denen auch eine Schädigung des Enzyms nicht auszuschließen ist.

1.2.1.3 Baeyer-Villiger-Oxidation

Im Rahmen der chemischen Baeyer-Villiger-Oxidation werden Ketone unter Einsatz von Peroxycarbonsäuren als Oxidationsmittel zu Estern oder Lactonen umgesetzt. Die Peroxycarbonsäure reagiert dabei nucleophil mit der Carbonylgruppe des Substrats und bildet so das tetraedrische Criegee-Intermediat. Nach Zerfall der O-O-Bindung wird dieses durch 1,2-Verschiebung zum Ester oder Lacton umgelagert. Welche Gruppe wandert, wird dabei in der Regel durch die Stabilität des intermediäre auftretenden Carbeniumions bestimmt.

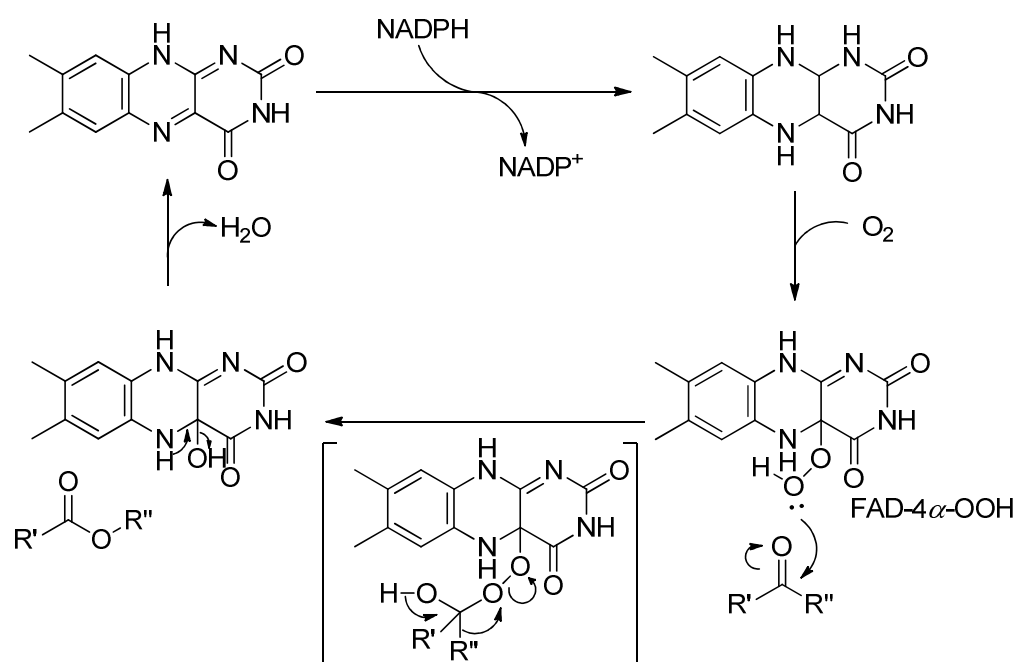


Fig. 1-9 Katalysezyklus Flavin-abhängiger Monooxygenasen am Beispiel der Baeyer-Villiger-Oxidation [68]

Enzymatisch erfolgt die Reaktion nach einem ähnlichen Mechanismus. Flavin-abhängige Monooxygenasen, sogenannte Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMO), bilden in Gegenwart von NAD(P)H und Sauerstoff das reaktive FAD-4 α -OOH-Intermediat. An Stelle der Peroxycarbonsäure reagiert dies nucleophil mit der Carbonylfunktion des Substrats (Fig. 1-9) [53].

Aufgrund ihrer Regio- und Stereoselektivität stellt die enzymatische Baeyer-Villiger-Oxidation einen bedeutenden, umweltfreundlichen Syntheseweg zur Gewinnung enantiomerenreiner Ester und Lactone dar. Eine der meist beforschten BVMO ist die Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter calcoaceticus*. Racemische Substrate wie Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on werden durch CHMO stereoselektiv zu den entsprechenden Lactonen umgesetzt. Die komplementären Enantiomere können hingegen selektiv durch die Biotransformation mit *P. putida* erhalten werden [66]. Der Einfluss der wandernden Gruppe auf die Enantioselektivität der Reaktion, zeigt sich am Beispiel der Oxidation prochiraler Ketone mit CHMO aus *A. calcoaceticus*. An C4 substituierte Cyclohexanoderivate werden überwiegend den entsprechenden (S)-Lactonen umgesetzt, wohingegen 4-*n*-Butylcyclohexanon zum (R)-Enantiomer führt [69].

Von besonderem Interesse ist die regio- und stereoselektive Darstellung von pharmakologisch wirksamen Verbindungen. So kann durch die Oxidation von Bicyclo[3.2.0]heptanon-Derivaten mit CHMO aus *A. calcoaceticus* Cyclosarkomycin synthetisiert werden. Dies dient als Precursor des Cytostatikums Sarkomycin [70]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Cyclopentadecanon-Monooxygenase aus *Pseudomonas* sp. für die potentielle Anwendung in der Entwicklung neuartiger Steroide geeignet ist. Sie katalysiert die regioselektive Baeyer-Villiger-Oxidation zahlreicher 3- und 17-Ketosteroide zu den entsprechenden Lactonen [71].

1.2.1.4 Oxidation von Heteroatomen

Zusätzlich zu Kohlenstoffverbindungen katalysieren Monooxygenasen auch die Oxidation von Stickstoff-, Schwefel- und Phosphoratomen [54]. Schwefelhaltige Verbindungen wie Thiole und Sulfide werden dabei zu Sulfoxiden umgesetzt, während aus Aminen *N*-Oxide und Hydroxylamine entstehen. So wird das intensiv nach Fisch riechende Trimethylamin durch

die Flavin-abhängige Monooxygenase FMO3 zu dem geruchslosen Trimethylaminoxid metabolisiert. Trimethylamin ist ein Metabolit des Cholins [72].

Für die präparative Chemie ist besonders die stereo- und enantioselektive Oxidation sulfidischer Verbindungen von Bedeutung. Hierzu eignen sich neben Monooxygenasen auch Peroxidasen.

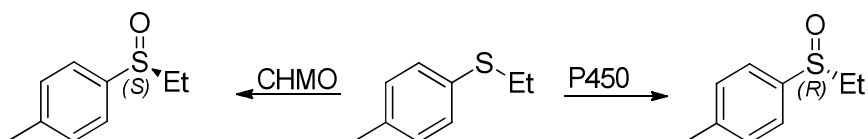


Fig. 1-10 Enantioselektive Biotransformation von *p*-Ethyltolylsulfid [66]

Durch die Wahl entsprechender Biokatalysatoren kann *p*-Ethyltolylsulfid zu beiden enantiomeren Sulfoxiden umgesetzt werden. Während die Oxidation zum (*R*)-Isomer durch eine CYP aus Schweineleber katalysiert wird, entsteht das (*S*)-Sulfoxid durch die Biotransformation mit CHMO. In beiden Fällen beträgt die Enantiomerenreinheit > 90 % [66].

1.2.2 Dioxygenasen

Die zweite große Gruppe der Oxygenasen bilden Dioxygenasen. Im Unterschied zu Monooxygenasen katalysieren sie die Übertragung beider Atome des molekularen Sauerstoffs auf ein Substratmolekül. Die entstehenden Produkte sind hoch reaktive und instabile Hydro- und *endo*-Peroxide, die zu stabilen Produkten metabolisiert werden [53].

In der Regel enthalten DOX in ihrem prosthetischen Zentrum Metallionen wie Eisen oder Kupfer, die als Häm-, Nicht-Häm- oder Eisen-Schwefel-Komplex vorliegen. Zur Klassifizierung der Enzyme wird oftmals die Koordination der Metallionen herangezogen.

1.2.2.1 Eisen-Schwefel-Dioxygenasen

Typische Vertreter der Eisen-Schwefel-DOX sind Enzyme vom Rieske-Typ. In Bakterien enthalten sie in ihrem aktiven Zentrum ein [2Fe-2S]-Cluster, in dem zwei Eisenatome sulfidisch miteinander verknüpft und durch jeweils zwei Histidin- und Cysteinliganden koordiniert vorliegen [73, 74]. In pflanzlichen Enzymen erfüllen vier Cysteinliganden diese Funktion [75].

Rieske-DOX sind Mehrkomponentensysteme, deren Funktionsweise noch nicht vollständig bekannt ist. Die Reaktion erfordert, wie bereits bei den Monooxygenasen beschrieben, die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs. Dazu überträgt NADH Elektronen auf eine Flavin-haltige Reduktase, die diese wiederum einzeln auf das [2Fe-2S]-Rieske-Cluster und ein zusätzliches Eisenzentrum überträgt (Fig. 1-11). Wankett et al. postulieren, dass der Komplex anschließend mit Sauerstoff eine reaktive Eisen-Peroxo-Spezies bildet, die entweder direkt oder über ein Eisen-Oxo-Intermediat das Substrat dioxygeniert [76].

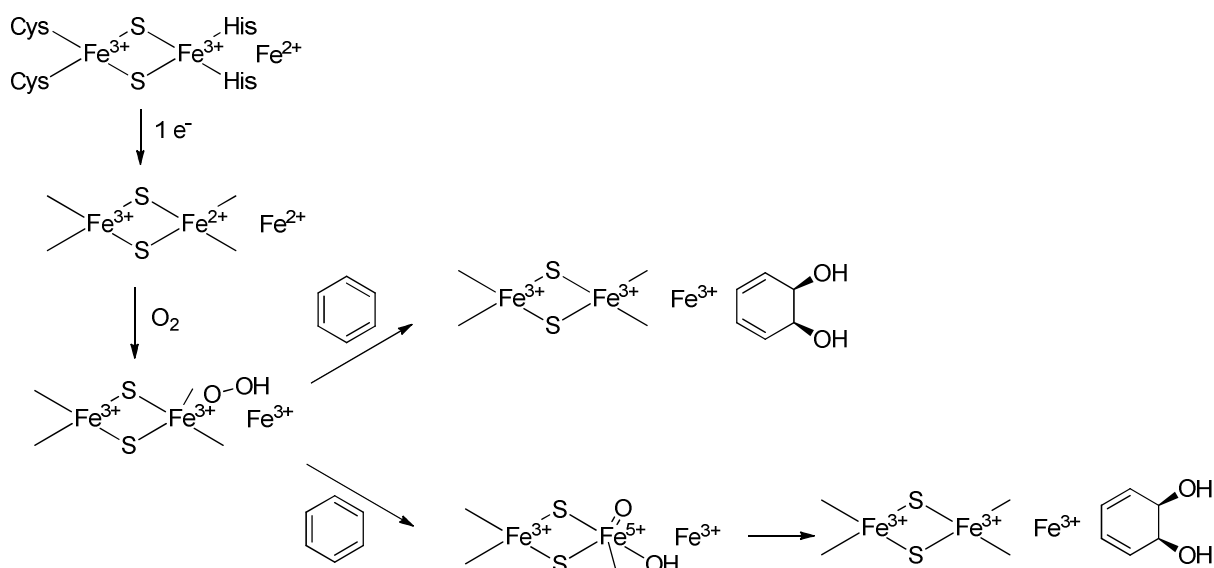


Fig. 1-11 Postulierter Mechanismus der Oxidation aromatischer Substrate durch Rieske-Dioxygenasen [76]

(Auf die Darstellung der koordinierenden Aminosäuren wurde übersichtshalber im weiteren Reaktionsverlauf verzichtet.)

Rieske-DOX übertragen beide Atome des molekularen Sauerstoffs auf benachbarte Kohlenstoffe eines aromatischen Systems. Die dabei entstehenden *cis*-Dirole (*cis*-1,2-Dihydrocatechol) sind sowohl für weiterführende enzymatische als auch chemische Schritte von essentieller Bedeutung. So fungieren sie beim mikrobiellen Abbau toxischer Aromaten als Substrat für ringspaltende DOX [73].

Von besonderem Interesse ist die Reaktion auch für die präparative Chemie. Obgleich Alkene unter Verwendung von Osmiumtetroxid und chiralen Liganden enantioselektiv zu den entsprechenden Diolen umgesetzt werden können, ist dies in aromatischen Systemen nicht möglich [66]. Für eine Vielzahl aromatischer Substanzen bietet sich so die biokatalytische Hydroxylierung an. Eine DOX aus *P. putida* katalysiert die Biotransformation von Benzol,

Toluol und Chlorbenzol zu den entsprechenden *cis*-1,2-Dihydrocatcholderivaten [77]. In der Regel können dabei Produkte mit einer hohen Enantiomerenreinheit gewonnen werden [78]. Am Beispiel der mikrobiellen Oxidation von Styrol und *o*-Chlorstyrol zeigt sich, dass die Regiochemie jedoch durch Substituenten am Ring beeinflusst wird. Während Styrol zu über 95 % im aromatischen System funktionalisiert wird, erfolgt bei *o*-Chlorstyrol die Hydroxylierung zu 65 % in der Seitenkette [79]. Ausgehend von mikrobiell erzeugten *cis*-1,2-Dihydrocatecholen können diverse chirale Verbindungen dargestellt werden. Ein Beispiel dafür stellt die Synthese von L-Ascorbinsäure dar (Fig. 1-12) [80].

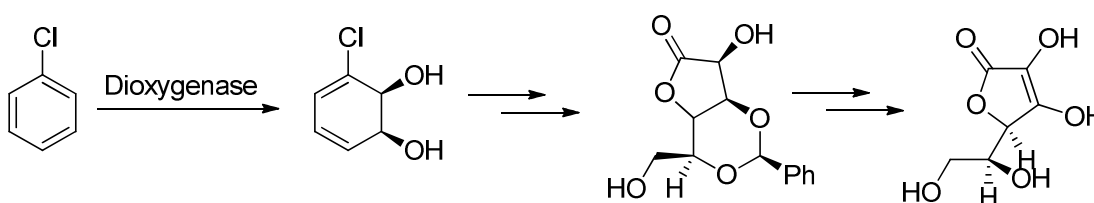


Fig. 1-12 Mikrobielle *cis*-Hydroxylierung bei der Darstellung von L-Ascorbinsäure [81]

Darüber hinaus eignen sich entsprechende Enzyme auch zur biokatalytischen Produktion furanoider Aromastoffe. So gelang es Newman et al. eine DOX aus *P. putida* durch gerichtete Evolution so zu modifizieren, dass sie *p*-Xylol über entsprechende *cis*-Diole zu dem als Erdbeerfuranon bekannten 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-on umsetzt [81].

1.2.2.2 Sonstige Nicht-Häm-Dioxygenasen

Zu den Prototypen der Nicht-Häm-DOX, die nicht dem Rieske-Typ zuzuordnen sind, gehören Catechol-DOX. Sie katalysieren die Spaltung von Catecholen. Erfolgt die Spaltung zwischen den beiden Hydroxyfunktionen, werden sie als Intradiol-DOX bezeichnet, wohingegen Extradiol-DOX eine benachbarte C-C-Bindung angreifen. Die jeweiligen Spaltprodukte sind *cis,cis*-Muconsäure und 2-Hydroxymuconaldehydsäure.

Für den Reaktionsmechanismus werden verschiedene Wege diskutiert. So wird zum einen postuliert, dass die Eisen-Peroxy-Spezies des Enzyms mit dem Substrat intermediär ein Dioxetan bildet, andererseits ist aber auch eine Criegee-Umlagerung vorstellbar [82]. Intradiol-DOX enthalten in ihrem aktiven Zentrum Eisen(III), das von je zwei Histidinen und Tyrosinen komplexiert wird. Im Unterschied dazu koordinieren in Extradiol-spaltenden Enzymen zwei Histidine und ein Glutaminsäureligand ein Eisen(II). Aufgrund der

unterschiedlichen Koordinationssphären ist davon auszugehen, dass das Substrat in den beiden Fällen unterschiedliche Positionen zum aktiven Zentrum einnimmt [83].

Eine besondere Gruppe der Nicht-Häm-DOX stellen LOX dar. Auf sie soll im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk gerichtet werden (Abschnitt 1.3).

1.2.2.3 Häm-Dioxygenasen

Zwei bedeutende Vertreter der Häm-DOX sind Tryptophan- und Indolamin-Dioxygenasen (TDO und IDO). Im Kynurenin-Metabolismus katalysieren sie den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der L-Tryptophan zu *N*-Formylkynurenin umsetzt (Fig. 1-13). In Analogie zu P450-Monooxygenasen wird das Zentralatom der Enzyme äquatorial durch einen Porphyrinring und axial durch ein bis zwei Aminosäureliganden koordiniert [84]. Den Initialschritt der Reaktion stellt die Anbindung des Substrats an das enzymatische Eisen(II) dar. Unter Ausbildung eines ternären Komplexes wird anschließend molekularer Sauerstoff gebunden und aktiviert. Die intermediär entstehenden Hydroperoxide lagern über Criegee- oder Dioxetan-Intermediate zu *N*-Formylkynurenin um [85].

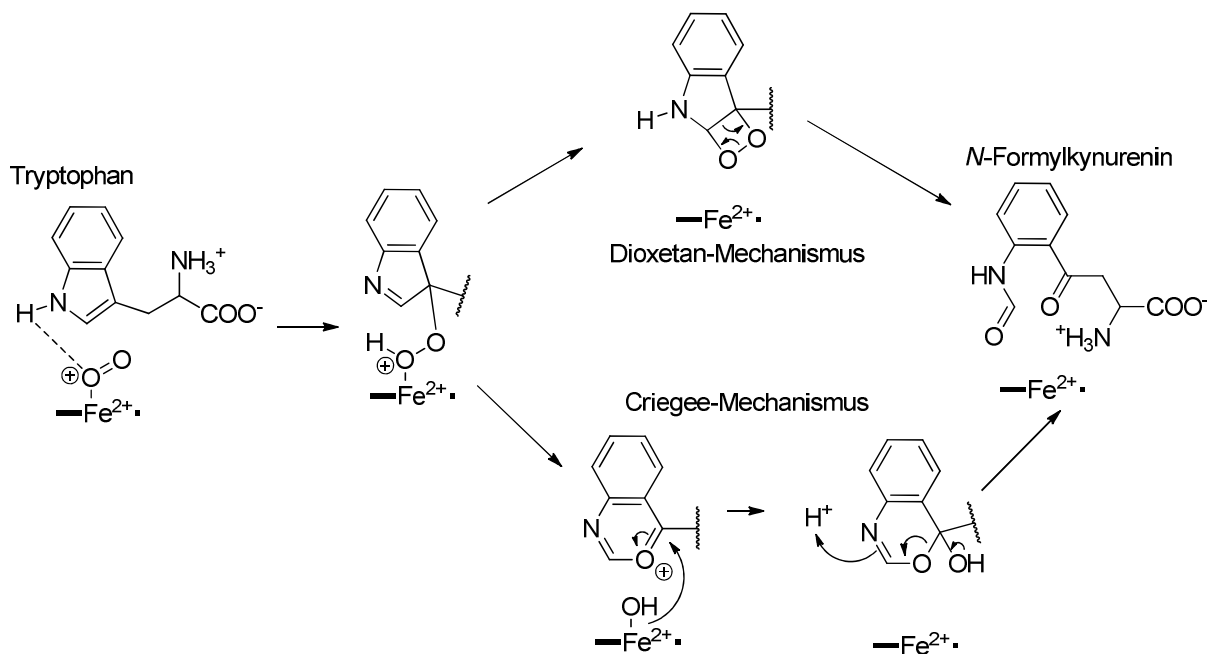


Fig. 1-13 Postulierter TDO- und IDO-katalysierter Biosynthesewege zum Abbau von Tryptophan [86]

Eine besondere Gruppe Häm-haltiger DOX sind Cyclooxygenasen. Gemeinsam mit einem Peroxidase-aktiven Zentrum bilden sie die sogenannten Prostaglandinsynthasen. Im Rahmen

der Prostaglandinsynthese katalysiert die DOX-Aktivität des Enzyms die Übertragung von molekularem Sauerstoff auf Arachidonsäure. Im Unterschied zu LOX (1.3) katalysieren sie dabei die Bildung von Endoperoxiden [86].

1.3 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOX) bilden eine Familie von Nicht-Häm-Eisen-haltigen DOX und gehören somit zu der Klasse der Oxidoreduktasen. Nach der internationalen EC-Nummerierung sind sie der Subunterklasse EC 1.13.11.x zuzuordnen. Sie katalysieren die stereo- und regioselektive Insertion von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA), die über mindestens ein 1Z,4Z-Pentadiensystem verfügen. Die resultierenden Fettsäurehydroperoxide besitzen eine konjugierte *E,Z*-Dien-Struktur und absorbieren so im UV-Bereich (234 nm) [87]. Im Allgemeinen lassen sich LOX in zwei Typen unterteilen. Typ-1-LOX setzen nur freie Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxiden um, während Typ-2-LOX auch mit veresterten Substraten, wie Acylglycerolen reagieren.

In der Natur sind LOX ubiquitär verbreitet und umfassen zahlreiche Spezies, die an diversen Stoffwechselprozessen beteiligt sind (1.3.5). Erstmals wurden LOX in den 1930er Jahren in Sojabohnen (*Glycine max*) beschrieben [88] und etwa 15 Jahre später kristallisiert [89]. Insbesondere für pflanzliche LOX dient Soja-LOX-1 seitdem als Referenzenzym. Nachdem lange Zeit vermutet worden war, dass LOX nur in Pflanzen vorkämen, wurde 1974 die erste tierische LOX in humanen Thrombozyten entdeckt [90]. Seitdem wurden sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten zahlreiche weitere LOX beschrieben [91] und zunehmend auch molekularbiologisch charakterisiert.

1.3.1 Struktureller Aufbau von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen besitzen eine monomere Primärstruktur, deren Polypeptidkette in zwei Domänen unterteilt ist. Das katalytisch aktive Zentrum ist in der C-terminalen Domäne lokalisiert. Sie besteht vorwiegend aus α -helikalen Elementen und enthält in der Regel ein Nicht-Häm-Eisen pro Proteinmolekül als Zentralatom [92]. Eine Ausnahme stellt die fungale LOX aus *Gaeumannomyces graminis* dar. Ihr katalytisches Zentrum enthält Mangan [93].

Tierische und pflanzliche LOX unterscheiden sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenzen zum Teil stark voneinander. Ihr Größenunterschied kann bis zu 30 kDa betragen, wobei pflanzliche LOX im Allgemeinen größer sind. Dennoch ähneln sich ihre Tertiärstrukturen teilweise erheblich [92]. Vor allem die katalytische C-terminale Domäne enthält hoch konservierte Aminosäuren, die für die Koordination des Zentralatoms sowie die Substratbindungstasche verantwortlich sind [91]. Fünf Aminosäuren sowie ein Hydroxidion bzw. Wassermolekül bilden als Liganden eine oktaedrische Koordinationssphäre um das prosthetische Eisen. In pflanzlichen LOX setzen sie sich aus drei Histidinen, einem Asparagin und der Carboxylgruppe des C-terminalen Isoleucins zusammen. In tierischen LOX ist das Asparagin durch ein weiteres Histidin substituiert [94].

Mittels kristallographischer Untersuchungen beschrieben Boyington et al. 1993 erstmals zwei Hohlräume in der C-terminalen Domäne von Soja-LOX-1. Ein 40 Å langer, gewinkelter Kanal, der überwiegend von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten gebildet wird, wurde als Substratbindungstasche identifiziert. Er grenzt an die katalytisch aktive Region an und erstreckt sich bis zur Proteinoberfläche. Der zweite Kanal besitzt eine trichterförmige Struktur und ist ebenfalls von der Oberfläche des Enzyms zugänglich. Ihm wird eine Funktion als Sauerstoffkanal zugeschrieben [95]. Da der zweite Hohlraum jedoch wenig später durch Experimente mit höherer Auflösung nicht bestätigt werden konnte [96], wurde die Existenz von Sauerstoffkanälen lange Zeit ambivalent diskutiert. Inzwischen deuten allerdings mehrere Studien daraufhin, dass in pflanzlichen und tierischen LOX Sauerstoff tatsächlich durch spezifische Kanäle zum aktiven Zentrum gelangt [97, 98].

Die deutlich kleinere N-terminale Domäne setzt sich aus antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die eine β -barrel-Struktur ausbilden. Wie auch viele C2-Domänen in tierischen Lipasen enthalten die meisten N-terminalen Regionen in LOX eine sogenannte PLAT-Domäne (benannt nach ihrem Vorkommen in Polycystin-1, Lipoxygenase und α -Toxin) [99]. Dieser hoch konservierte Bereich wird mit Protein-Protein- und Protein-Biomembraninteraktionen in Zusammenhang gebracht [100-102]. Eine calciumabhängige PLAT-Domäne in humaner 5-LOX beeinflusst beispielsweise die Fähigkeit des Enzyms an Membranen zu binden und ist somit essentiell für die Aktivität [103, 104]. In manchen Fällen ist diese Hypothese jedoch fraglich. So hat das Entfernen des N-terminalen Bereichs in einigen tierischen LOX keinen Einfluss auf die Aktivität und wirkt in Soja-LOX-1 sogar aktivierend [104, 105]. Auch enthält

die kürzlich beschriebene PoLOX1 aus dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* untypischerweise keine PLAT-Domäne [106]. Die N-terminale Region muss in diesen Enzymen folglich andere Funktionen erfüllen. Welche das sind, ist bislang unbekannt. Möglicherweise ist sie für regulatorische Vorgänge bei der Substratumsetzung von Bedeutung [104].

1.3.2 Mechanismus Lipoygenase-katalysierter Reaktionen

Die LOX-katalysierte Oxygenierung von PUFAs setzt sich aus fünf Teilschritten zusammen (Fig. 1-14). Den Initialschritt stellt dabei die autokatalytische Aktivierung des prosthetischen Eisens dar (1). Während einer kurzen katalytischen *Lag*-Phase oxidieren dazu bereits vorhandene Fettsäurehydroperoxide das Fe(II) des inaktiven Enzyms zu Fe(III) [107]. Die nachfolgende *steady-state*-Katalyse beginnt mit der Abstraktion eines Protons aus bisallylischer Position durch den Hydroxidliganden des Eisenions. Gleichzeitig wird ein Elektron frei, das Fe(III) zu Fe(II) reduziert. Die Regio- und Stereospezifität wird dabei durch die Lage des Substrats in der Bindungstasche bestimmt (1.3.3, 1.3.4). Dieser Schritt ist für die gesamte Reaktion geschwindigkeitsbestimmend [108]. In Folge der homolytischen C-H-Spaltung kommt es zur Bildung eines Mesomerie stabilisierten Pentadienylradikals (2). Unter Ausbildung eines konjugierten *Z,E*-Diensystems verschiebt sich das radikalische Elektron entweder um [+2] Positionen in Richtung des Methylendes oder um [-2] zur Carboxylgruppe (3). Im vierten Schritt inseriert molekularer Sauerstoff antarafacial zur Wasserstoffabstraktion und bildet so stereospezifisch ein Peroxyradikal (4). Unter Rückgewinnung des aktiven Enzyms (LOX-Fe(III)) wird dieses zunächst zum korrespondierenden Anion reduziert und abschließend zum Fettsäurehydroperoxid protoniert (5) [109].

LOX-katalysierte Reaktionen unterliegen dem regulatorischen Mechanismus der sogenannten suizidalen Inaktivierung [110, 111]. Die Funktionsweise dieser irreversiblen Inhibierung ist noch nicht abschließend geklärt. Möglicherweise werden Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms durch Reaktionsprodukte oxidiert. Auch kovalente Wechselwirkungen reaktiver Reaktionsintermediate mit Peptiden der Substratbindungstasche sind vorstellbar [112].

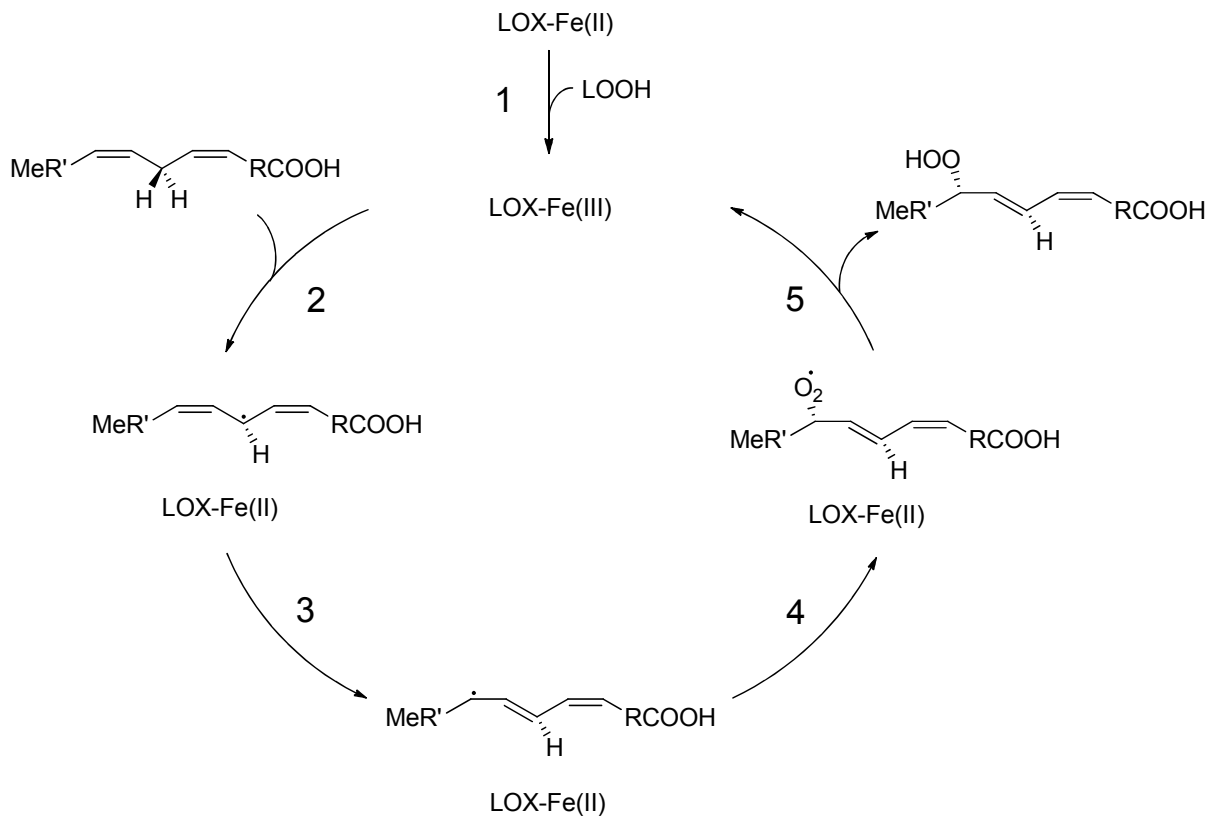


Fig. 1-14 Schematische Darstellung der Lipoxygenase-Reaktion [109]

(1) Aktivierung, (2) Wasserstoffabstraktion, (3) Radikalumlagerung, (4) Sauerstoffinsertion, (5) Radikalreduktion

1.3.3 Regiospezifität Lipoxygenase-katalysierter Reaktionen

Die Nomenklatur von LOX beruht häufig auf ihrer Regiospezifität. Pflanzliche LOX, die ausgehend von Linolsäure bevorzugt 9- oder 13-Hydroperoxide bilden, werden dementsprechend als 9- bzw. 13-LOX bezeichnet. Basierend auf der Umsetzung von Arachidonsäure sind in tierischen Organismen überwiegend 5-, 8-, 12- und 15-LOX zu finden.

Bis heute gibt es keine Röntgenstrukturdaten von LOX mit gebundenen Fettsäuren im aktiven Zentrum. Erklärungen zur Regiochemie der Reaktion stützen sich deswegen weitgehend auf Modellvorstellungen, wie das volumen- oder orientierungsabhängige Konzept [113].

Die volumenabhängige Hypothese basiert auf der Annahme, dass die Invasion von Fettsäuren aufgrund der Hydrophobizität der Substratbindungstasche (1.3.1) in *tail-first*-Orientierung erfolgt. Das Carboxylende wird dabei durch ein Arginin auf der Proteinoberfläche koordiniert [114]. Je nach Eindringtiefe erfolgt die Sauerstoffinsertion in [+2]- bzw. [-2]-Position. In zahlreichen pflanzlichen 13-LOX füllen sterisch anspruchsvolle

Seitenketten von Histidin oder Phenylalanin den Boden der Substratbindungstasche aus und behindern so die Fettsäureinvasion. Die Oxygenierung erfolgt aus [+2]-Richtung. LOX, die an entsprechenden Positionen das deutlich kleinere Valin tragen, bilden hingegen unter [-2]-Oxygenierung bevorzugt 9-Fettsäurehydroperoxide [94, 115].

Nach der orientierungsabhängigen Hypothese schirmen große Substituenten wie Phenyl- oder Imidazolseitenketten von Phenylalanin bzw. Histidin die positive Ladung der Guanidinseitenkette eines Arginin am Boden der Substratbindungstasche ab. Bei kleineren Substituenten ist diese jedoch zugänglich und kann unter inverser Invasion der Fettsäure (*head-first*) eine ionische Bindung mit der Carboxylgruppe ausbilden. Diverse Mutageneseexperimente konnten diese Hypothese in tierischen und pflanzlichen LOX belegen [115, 116].

Dennoch lässt sich die Position der Sauerstoffinsertion nicht aus der Aminosäuresequenz ableiten. Eine LOX aus *Momordica charantia* enthält beispielsweise statt Phenylalanin, Histidin oder Valin an entsprechender Position Glutamin. Bei pH-Werten < 7.5 fungiert sie als 9-LOX, oberhalb hingegen als 13-LOX [117]. Eine Beeinflussung durch die Sauerstoffkonzentration zeigt sich am Beispiel der Soja-LOX-1. Bei O₂-Konzentrationen < 5 µM sinkt ihre Regiospezifität von 95:5 13:9-Linolsäurehydroperoxiden auf 50:50 [118]. Des Weiteren wird postuliert, dass der Zugang des Sauerstoffs über spezielle Sauerstoffkanäle die Regiochemie der Oxygenierung bestimmen [96, 119].

1.3.4 Stereospezifität Lipoxygenase-katalysierter Reaktionen

Im Unterschied zur Regiospezifität lässt sich die Stereospezifität von LOX in vielen Fällen aus ihrer Aminosäuresequenz ableiten. Wird Linolsäure zu den entsprechenden Hydroperoxiden umgesetzt, können 9*S*-, 9*R*-, 13*S*- sowie 13*R*-Isomere entstehen. Coffa und Brash identifizierten anhand multipler Sequenzalignments eine einzelne hoch konservierte Aminosäure, die für *S*- bzw. *R*-LOX charakteristisch ist. In *S*-LOX wird diese sogenannte *Coffa-site* durch Alanin bestimmt; *R*-LOX enthalten an entsprechender Position Glycin. Mutageneseexperimente mit 8*R*-LOX aus Korallen und humaner 12*R*-LOX konnten belegen, dass die Substitution von Glycin durch Alanin zu der Entstehung von *S*-Hydroperoxiden führt. Gleichzeitig erfolgt eine Änderung der Regiospezifität von 8*R* zu 12*S* bzw. 12*R* zu 8*S* [113].

Die Stereospezifität ist wie auch die Regiochemie von der Orientierung der Fettsäure in der Substratbindungstasche sowie sterischen Effekten abhängig. Unter der Annahme, dass die Wasserstoffabstraktion in allen LOX von der gleichen Seite erfolgt und somit auch die Richtung der Sauerstoffinsertion festgelegt ist, wird die Stereochemie durch die Position der Oxygenierung bestimmt. Ist die entscheidende Position im aktiven Zentrum durch Glycin besetzt, inseriert Sauerstoff im vorderen Teil der Substratbindungstasche. Im Fall des größeren Alanins wird dies jedoch durch sterische Wechselwirkungen verhindert. Die Oxygenierung findet im Inneren der Tasche statt [92].

Jüngere Studien stellen die Allgemeingültigkeit der Alanin-Glycin-Regel allerdings in Frage. So besetzt beispielsweise in einer 12S-LOX aus Mäusen Serin statt des postulierten Alanins die entsprechenden Position im aktiven Zentrum [113]. Eine LOX aus *Nostoc sp.* PCC 7120 wurde experimentell als 9R-LOX identifiziert, obgleich die Aminosäuresequenz auf S-Spezifität hindeutet [120]. Auch entsprechende Mutageneseexperimente (Alanin → Glycin) zeigen keine Auswirkung auf die Stereospezifität. Wird Alanin jedoch durch sterisch anspruchsvollere Aminosäuren wie Valin oder Isoleucin substituiert, katalysiert das Enzym 13S-spezifisch. Andreou et al. schlussfolgern, dass die Stereochemie von LOX nicht ausschließlich durch Alanin und Glycin bestimmt wird. Stattdessen bedarf ihre Beurteilung einer differenzierten Betrachtung der im aktiven Zentrum vorliegenden Größenverhältnisse [120].

1.3.5 Biologische und industrielle Bedeutung von Lipoxygenasen

Oxidierete Fettsäurederivate – sogenannte Oxylipine – sind in Pflanzen, Tieren, Pilzen sowie manchen Mikroorganismen an diversen stoffwechselphysiologischen Prozessen beteiligt. Häufig basiert ihre Biosynthese auf LOX-katalysierten Oxygenierungsreaktionen, aus denen hochreaktive Ausgangsverbindungen für weitere Transformationen hervorgehen.

In tierischen Organismen spielen Leukotriene und Lipoxine bei der Regulation entzündlicher und allergischer Reaktionen sowie der Entstehung von Krankheiten wie Krebs oder Atherosklerose eine wichtige Rolle. Leukotriene und Lipoxine leiten sich von Arachidonsäure ab und gehören somit zu den Eicosanoiden. Im Rahmen der Arachidonsäurekaskade wird sie durch Phospholipasen aus Zellmembranen freigesetzt. 5-LOX, die zunächst durch FLAP (*5-lipoxygenase activating protein*) aktiviert werden müssen, katalysieren über entsprechende

Hydroperoxidintermediate die Bildung instabiler Epoxide (LTA₄). Hydrolasen, Glutathion-S-Transferasen sowie Peptidasen metabolisieren LTA₄ anschließend zu diversen weiteren Leukotrienen (LT). Wird Arachidonsäure zusätzlich durch 12- oder 15-LOX oxidiert, entstehen Lipoxine [121].

Eng verwandt mit dem Lipoxygenaseweg ist die Biosynthese der immunregulatorisch bedeutenden Prostaglandine, Thromboxane und Prostacyclin über den Cyclooxygenaseweg. In diesem Fall wird Arachidonsäure zunächst durch Cyclooxygenasen zu Prostaglandinendoperoxiden umgesetzt. Die instabilen Intermediate reagieren anschließend Isomerase- sowie Synthase-katalysiert zu den entsprechenden Produkten [122].

Im Unterschied zu tierischen Zellen enthalten die Zellmembranen von Pflanzen und Pilzen überwiegend Linol- und α -Linolensäure. Entsprechende Hydroperoxide werden vor allem durch Lyasen, Isomerasen, Allenoxidsynthasen (AOS) und Allenoxidcyclasen (AOC) metabolisiert. Zu den typischen Reaktionsprodukten zählen beispielsweise Jasmonsäure und die sich ableitenden Jasmonate. Als Phytohormone sind sie an der Steuerung von Wachstumsprozessen sowie der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress beteiligt. Ausgehend von 13-Linolensäurehydroperoxiden erfolgt ihre Biosynthese über instabile Allenoxid-Intermediate. AOC-katalysiert werden sie zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) cyclisiert, deren Reduktion und β -Oxidation letztlich zu 7-*iso*-Jasmonsäure führt [123].

Lebensmittelchemisch ist besonders die radikalische und enzymatische Spaltung von Fettsäurehydroperoxiden zu flüchtigen Produkten von Interesse. Je nach Precursor entstehen dabei neben zahlreichen nichtflüchtigen Komponenten überwiegend C6- und C9-Aldehyde und Alkohole [49, 124]. Ihre grasig-grünen Geruchseindrücke leisten häufig einen wesentlichen Beitrag zu dem charakteristischen Aroma eines Lebensmittels. So stellen (*E/Z*)-2,6-Nonadienal, (*Z*)-2-Nonenal und (*E*)-2-Nonenal in Gurken sowie (*Z*)-3-Hexenal und (*E*)-2-Hexenal in Cantaloupe-Melonen die Schlüsselaromastoffe dar [125]. Bei der Verarbeitung von Sojabohnen tritt infolge LOX-induzierter Hexanal-Bildung oft ein unerwünschtes bohngrünes Fehlaroma auf. Zur Geschmacksverbesserung werden verschiedene Methoden der Enzyminhibition eingesetzt. Neben thermischen Verfahren wird traditionell die Fermentation mit Milchsäurebakterien angewendet [126, 127]. *Lactobacillus casei* produziert beispielsweise Benzoesäure, die auf LOX inhibierend wirkt [128].

Häufig wird in Pilzen auch die Bildung der charakteristischen C8-Aromstoffe 1-Octen-3-ol und 1-Octen-3-on aus 10-Linolsäurehydroperoxiden auf LOX-Aktivität zurückgeführt [129]. Neueren Studien zufolge basiert die Biosynthese dieser Substanzen jedoch auf die Aktivität sogenannter Psi-Faktor (*precocious sexual inducer*) produzierender Oxygenasen (Ppo). Sie setzen sich aus einem Peroxidase-ähnlichen N-Terminus und einer C-terminalen P450-Domäne zusammen und gehören nicht zur Klasse der LOX [130].

Industriell kommen LOX vor allem in der Backwarenproduktion zum Einsatz. Durch die Supplementierung des Teigs mit Soja-LOX wird sowohl eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften, als auch eine Entfärbung erzielt. Letzteres ist vor allem bei der Herstellung von Weißbrot erwünscht. Als besonders geeignet haben sich dafür LOX vom Typ 2 erwiesen. Reaktive Peroxyradikale, die durch die Oxidation von Linolsäure in Acylglycerolen entstehen, sind in der Lage weitere Inhaltsstoffe zu cooxidieren und so Carotinoide zu bleichen [49, 131]. Der Effekt auf die Knettoleranz und Viskoelastizität konnte noch nicht abschließend erklärt werden. Wahrscheinlich kommt es infolge der Cooxidation von Proteinen des Glutens zur Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken, die zu einer Verfestigung des Teigs führen [91].

1.4 Zielsetzung

Die wachsende Nachfrage der Verbraucher nach neuartigen Geschmackseindrücken gemeinsam mit dem Wunsch nach gesunden, natürlichen Lebensmitteln gewinnen in der modernen Aromaforschung zunehmend an Bedeutung. Eine reiche Quelle exotischer und neuartiger Aromen bietet die Frucht- und Pflanzenwelt Südamerikas. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die flüchtigen, aromaaktiven Komponenten der brasilianischen Jaboticaba-Frucht (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg) isoliert und mittels gaschromatographischer Verfahren analysiert werden. Des Weiteren galt es, die Schlüsselaromastoffe zu ermitteln.

Um dem Wunsch nach natürlichen Aromen trotz knapper Ressourcen gerecht zu werden, hat zudem das Interesse an biotechnologischen Produktionswegen in den letzten Jahren stark zugenommen. Insbesondere die Oxyfunktionalisierung kaum geruchsaktiver terpenoider Kohlenwasserstoffe, die zum Teil in großen Mengen als industrielle Nebenströme anfallen, stellt dabei einen zukunftsfähigen Lösungsansatz dar.

Biotechnologisch gelingt dies durch den Einsatz von Oxidoreduktasen. In vergangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Pleurotus sapidus* diverse terpenoide Verbindungen DOX-katalysiert oxyfunktionalisiert und so wertvolle Aromastoffe wie (+)-Nootkaton gewonnen werden können (1.1.3). Da in ersten Isolierungsversuchen nur ein Fragment des tatsächlich im Genom codierten Proteins isoliert werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit eine neue Reinigungsstrategie entwickelt werden. Das isolierte Enzym sollte sequenziell sowie biochemisch charakterisiert und mit dem heterolog in *E. coli* exprimierten Analogon verglichen werden.

2 Volatile constituents of Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg)

Reprinted from *Journal of Essential Oil Research*, 2012, 24(1), 45-51 with kind permission from Taylor & Francis.

2.1 Abstract

Volatile flavor compounds of Jaboticaba fruits (*Myrciaria jaboticaba*) were isolated using continuous liquid-liquid extraction and analyzed by gas chromatographic techniques (GC-FID, GC-O, GC-FPD, GC-MS). Preparative gas chromatography was used to concentrate a fraction rich in potent flavor compounds. A total of 45 compounds were identified for the first time with 23 components imparting a sensory impression. Among the identified compounds, terpenes, organic acids and alcohols were found to be the major volatile components. Particularly terpenes contributed to the flavor of Jaboticaba fruits. Application of aroma extract dilution analysis showed that β -pinene (woody-green), δ -cadinene (medicine), 2-phenylethanol (honey, flowery) and linalool (flowery) were the most potent odorants of Jaboticaba fruits.

Keywords: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), flavor, AEDA, phytol, hexadecanoic acid

2.2 Introduction

Native to South America, the fruits of the Jaboticaba tree enjoy in Brazil popularity comparable to that of grapes in the U.S. or Europe. The grape-like fruits are three to four cm in diameter with one to four seeds and a sweet, white, gelatinous flesh covered by a thick, purple skin. They are borne directly on the main trunks and branches of the trees (cauliflory, as indicated by the Latin name of the related species *Myrciaria cauliflora*) [132]. Jaboticaba fruits are consumed raw or are processed to wine, jam, liquor, and vinegar. They are also popular in folk medicine to treat hemotypsis, asthma, diarrhea, or chronic tonsillitis [133].

Due to the increasing demand for so-called functional food many studies investigated polyphenolics of fruits and vegetables. Polyphenolics exhibit anti-allergenic, antiviral, anti-inflammatory, and vasodilating activities [134], cytotoxicity against cancer cells [132] and inhibit oxidative and inflammatory enzymes [135]. As deeply colored fruits were found to be

a potentially rich source of anthocyanins, phenolic acids, flavonoids and depsides, Jabuticaba fruits received increasing attention [136, 137]. However, the average consumer is not so much attracted to a certain food by vague health promises, but rather by its pleasant aroma. The taste of the Jabuticaba pulp was described as subacid to sweet, similar to grapes [133]. There are no detailed investigations on the composition of its volatile flavor compounds. However, these data are needed to ensure processing procedures resulting in a high quality of aroma in the final products. Simultaneous distillation-extraction [138], headspace analysis [139] and solid-phase extraction [140] have been shown to be capable of isolating volatile compounds from fruit or vegetable matrices. One of the most prevalent and reliable methods for the isolation of volatiles from fruits is the exhaustive continuous liquid-liquid extraction (CLLE). The objective of the present study was to isolate and identify the volatile compounds of frozen Jabuticaba fruits and to evaluate the key odorants by aroma extract dilution analysis (AEDA).

2.3 Experimental

2.3.1 Plant material

Fresh Jabuticaba fruits (*Myrciaria jaboticaba*, (Vell) O. Berg) were from a local farm on the countryside of São Paulo state, and consigned on thermal packs to the laboratory.

2.3.2 Chemicals

Anhydrous sodium sulfate was purchased from Fluka, Germany; sodium chloride was from Roth, Germany. Azeotropic pentane/diethylether (1:1.12, v/v) and methanol were freshly rectified using a one meter silver plated column prior to use.

2.3.3 Extraction of volatile compounds

The defrosted Jabuticaba fruits were pitted manually. Pulp (250 g) was homogenized in a blender with 400 mL methanol and centrifuged at 4 °C for 20 min at 4000 rpm. Adding sodium chloride solution (5 %) the supernatant was brought up to a volume of 1 L and the mixture was submitted to continuous liquid-liquid extraction, using pentane/diethyl ether as extraction solvent [141]. The CLLE apparatus consisted of a distillation flask (500 mL)

containing 250 mL pentane/diethyl ether, an extraction column (1 L) in which an central pipe with a sintered-glass frit was placed, and a condenser. The extraction flask was heated in a water bath (42 °C), evaporated solvent was condensed and redirected into the ascending pipe to bubble through the bottom end and from there through the aqueous Jaboticaba extract. The flavor enriched upper phase rinsed back into the distillation flask, where the solvent was steadily evaporated again and re-circulated. The flavor compounds accumulated in the excess solvent. After 48 h the pentane/diethyl ether phase was washed with water, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to approximately 1 mL at atmospheric pressure and 40 °C bath temperature using a *Vigreux* column.

2.3.4 Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) and Flame Ionization Detection (GC-FID)

Of each sample, 1.0 µL of the concentrated extract was injected on-column into a Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a cool on-column injection port and a 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm CP-Wax 52 CB column (Varian, Darmstadt, Germany). The oven temperature was held at 40 °C for 3 min, raised by 3 °C min⁻¹ to 230 °C and held for 10 min. Hydrogen was used as carrier gas at a flow of 2 mL min⁻¹. The end of the analytical column was split 1:1, and volatiles were detected either using flame ionization detection (FID, at 250 °C), or an odor detection port (ODP, at 220 °C, equipped with air moistening, voice recording and recognition software, Gerstel, Mülheim, Germany). Sensory analyses were performed by three panelists.

2.3.5 Aroma extract dilution analysis (AEDA)

To determine the key odorants an aroma extract a two-step dilution analysis was carried out. The aroma extracts were diluted 1:25 and 1:50 with *n*-pentane/diethylether (1:1.12). Each dilution was analyzed by GC-O using the parameters described. Sensory analyses were performed by three panelists.

2.3.6 Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)

Volatiles were separated on a polar and a non-polar phase column by means of GC-MS. A GC 8000 coupled to a mass selective detector MD 800 (Fisons, Mainz-Kastel, Germany), equipped with a cool on-column injection port and a 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm CP-Wax 52 CB column (Varian, Darmstadt, Germany) was used. The samples (1.0 µL) were injected

cool on-column using the same oven program as for GC-O/FID, but helium at a flow of 1.2 mL min^{-1} was the carrier gas. Detection occurred in the electron impact mode (EI) at 70 eV and a continuous scanning from m/z 33 to 500. Additionally, a CP-3800 GC coupled to a mass spectrometer 1200 (Varian, Darmstadt, Germany), equipped with a split/splitless injection port and a $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}, 0.25 \mu\text{m}$ HP-5MS column (Agilent, Waldbronn, Germany) was used. The samples ($0.5 \mu\text{L}$) were injected splitless ($250 \text{ }^\circ\text{C}$, for 1 min) with subsequent purging at a split ratio of 1:10 for another four minutes using the same oven program as for GC-O/FID. Helium was used as carrier gas at a constant column flow rate of 1.2 mL min^{-1} , and the same MS detection parameters were used.

2.3.7 Gas Chromatography Flame Photometric Detection (GC-FPD)

Sulfur-containing volatiles were analyzed using GC-FPD. The instrument and the parameters used were the same as for GC-FID/-O. The end of the analytical column was split (1:1); one part was led to a FID ($250 \text{ }^\circ\text{C}$), the other one to a flame photometric detector (FPD) ($220 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.3.8 Preparative Gas Chromatography (prep-GC)

In order to enrich odorants present at levels below the detection limit of the GC-FID or GC-MS, but still perceivable at the sniffing port of the GC-O by the human nose, a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a multidimensional switching system (MCS) and a KAS 3 injector (Gerstel, Mülheim, Germany) was used. The samples were injected splitless (2 min). Volatiles were separated on two 5 m and $25 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm i.d.} \times 2.0 \mu\text{m}$ Optima-Wax columns connected in series and detected using flame ionization detection (FID, at 325°C). The oven temperature was held at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 min, raised by $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $230 \text{ }^\circ\text{C}$ and held for 35 min. 200 injections of $2.0 \mu\text{L}$ were performed. Based on sniffing investigations, one fraction between a retention index of 1580 and the end of the chromatogram obtained on the GC-FID was collected in a trap cooled to $-10 \text{ }^\circ\text{C}$. The concentrated extract was re-diluted into $50 \mu\text{L}$ *n*-pentane/diethylether (1:1.12) and analyzed by GC-MS.

2.3.9 Identification

The volatile compounds were identified by comparing the linear retention indices (RI) on a polar and a non-polar column, the mass spectra and the odor quality. Linear retention

indices were calculated according to *n*-alkanes as external references [142]. Mass spectral identification was achieved by comparison of spectra with commercial mass spectral data bases (Wiley Registry 8th editon/ NIST 2008).

2.4 Results and Discussion

The volatile compounds of the Jaboticaba aroma extract obtained by liquid-liquid extraction were identified by GC-MS, linear retention indices, and odor qualities, whereas normalized peak area percentage of GC-FID chromatograms was calculated to estimate the relative concentration of the volatile components. A total of 45 volatiles were positively identified by MS and retention indices, and three compounds were tentatively identified by MS (Tab. 2-1).

Tab. 2-1 Volatile compounds of Jaboticaba fruits

Volatile compound ^e [CAS Number]	CP-Wax		HP-5		Area (%)	Odor description
	RI ^a	RI ^b (Lit.)	RI ^a	RI ^b (Lit.)		
α -Pinene [80-56-8]	<1000	1032	933	939	n.q.	Resin
β -Pinene [127-91-3]	<1100	1116	975	981	1.83	Sweet, green
Limonene [7705-14-8]	1186	1201	1028	1030	5.34	Minty, fresh, campher
1,8-Cineole [470-82-6]	1192	1214	1030	1033	1.43	
3-Methyl-1-butanol [123-51-3]	1204	1206	n.d.	735	1.03	n.p.
(<i>E</i>)- β -Ocimene [3779-61-1]	1244	1234	1049	1043	1.58	n.p.
Hexanol [111-27-3]	1352	1351	n.d.	884	0.27	Green
(<i>E</i>)-3-Hexen-1-ol [928-97-2]	1377	1356	n.d.	847	0.42	Green
Acetic acid [64-19-7]	1422	1434	n.d.	600	5.06	Sour
Unknown ^d	1452		n.d.		14.23	n.p.
α -Copaene [3856-25-5]	1472	1488	1369	1376	n.q.	Musty, dusty
Linalool [78-70-6]	1544	1551	n.d.	1098	0.15	Flowery, sweet
Methyl 2-furoate [611-13-2]	1554	1569	n.d.	983	0.19	n.p.
β -Caryophyllene [87-44-5]	1570	1594	1410	1418	6.63	Green, musty
β -Elemene [33880-83-0]	n.d.	1595	1384	1393	n.q.	n.p.
Aromadendrene [72747-25-2]	1614	1600	1451	1456	0.33	Dusty, honey
Unknown, sulfur-containing	1620		n.d.		n.q.	n.p.
α -Caryophyllene [6753-98-6]	1637	1680	1447	1444	0.76	n.p.
Germacrene D [37839-63-7]	1676	1705	n.d.	1487	0.15	Corn
α -Selinene [473-13-2]	1686	1711	1487	1485	1.02	n.p.

α -Muurolene [31983-22-9]	1698	1714	n.d.	1506	0.10	n.p.
δ -Cadinene [483-76-1]	1729	1749	1511	1519	2.21	Medicine
2-Phenylpropan-2-ol [617-94-7]	1739	1759	1084	1095	tr	n.p.
Methyl dodecanoate [111-82-0]	1785	1813	n.d.	1525	tr	Sweet
α -Calacorene [21391-99-1]	1878	1906	n.d.	1548	tr	Pine, resin
2-Phenylethanol [60-12-8]	1882	1931	n.d.	1122	0.47	Sweet, flowery
Palustrol [5986-49-2]	1889	1931	n.d.	1557	tr	n.p.
<i>Unknown, sulfur-containing</i>	1903		n.d.		n.q.	n.p.
Benzothiazole ^c [95-16-9]	1926	1951	n.d.	1240	n.q.	n.p.
Caryophyllene oxide [1139-30-6]	1938	1999	1571	1581	1.75	Rose
Dodecanol [112-53-8]	1963	1970	n.d.	1468	0.43	n.p.
(<i>E</i>)-Methyl cinnamate [103-26-4]	2052	2048	1378	1379	0.20	n.p.
Ledol [577-27-5]	2035	2028	1583	1565	1.95	Sweet, anise
10-epi-Eudesmol [15051-81-7]	2084	2119	1616	1619	tr	Pine
Spathulenol [6750-60-3]	2092	2129	1567	1575	0.50	n.p.
Nonanoic acid [112-05-0]	2157	2202	n.d.	1280	0.48	Spicy, green
τ -Cadinol [5937-11-1]	2149	2165	1631	1640	tr	n.p.
τ -Muurolol [19912-62-0]	2166	2178	1638	1641	tr	Spicy
α -Bisabolol [72691-24-8]	2174	2235	n.d.	1662	tr	Sweet, flowery
α -Cadinol [481-34-5]	2202	2211	1635	1652	0.73	Resin
α -Selin-11-en-4-ol [16641-47-7]	2226	2241	1647	1642	1.27	n.p.
Decanoic acid [334-48-5]	2263	2296	n.d.	1380	0.34	n.p.
Hexadecanol [36653-82-4]	2373	2385	n.d.	1882	0.15	n.p.
Benzophenone [119-61-9]	2419	2410	n.d.	1604	0.53	n.p.
Dodecanoic acid [143-07-7]	2476	2517	n.d.	1571	0.66	n.p.
Phytol [7541-49-3]	>2500	2611	>2000	2128	13.13	n.p.
Tetradecanoic acid [544-63-8]	>2500	2724	n.d.	1780	0,57	n.p.
Cinnamic acid [621-82-9]	>2500	2852	1435	1438	7.09	n.p.
Hexadecanoic acid [57-10-3]	>2500	2860	1969	1984	27.00	n.p.

^a Retention index, experimental; ^b Retention index from database [143-145]; ^c Duarte et al. [146]; ^d Co-elution of at least two or three peaks; ^e Elution order as determined on CP-Wax column; tr: Trace; n.q.: not quantified; n.p.: not perceived; n.d.: not detected; n.a.: not available

Furthermore, three sulfur compounds were detected using a sulfur specific GC-detector (FPD) which is at least three orders of magnitude more sensitive towards sulfur containing hydrocarbons than the FID or a quadrupole mass analyzer in the scanning mode. However, because of the presence of these sulfur compounds below the detection limit of the GC-MS,

the structure of these volatiles could not be elucidated. Duarte et al. [146] found two sulfur-containing components in a wine made from pulp of Jaboticaba fruits (3-(methylthio)-1-propanol and benzothiazole). Comparing the mass spectrum and the retention indices it is most likely that the peak at 1926 resulted from benzothiazole. Major components in the Jaboticaba aroma extracts were terpenes (27 compounds accounting for 40.86 % of peak area), acids (7 accounting for 41.20 %) and alcohols (7 accounting for 2.77 %). The predominant peak was hexadecanoic acid followed by phytol and an unidentified odorless compound (Fig. 2-1).

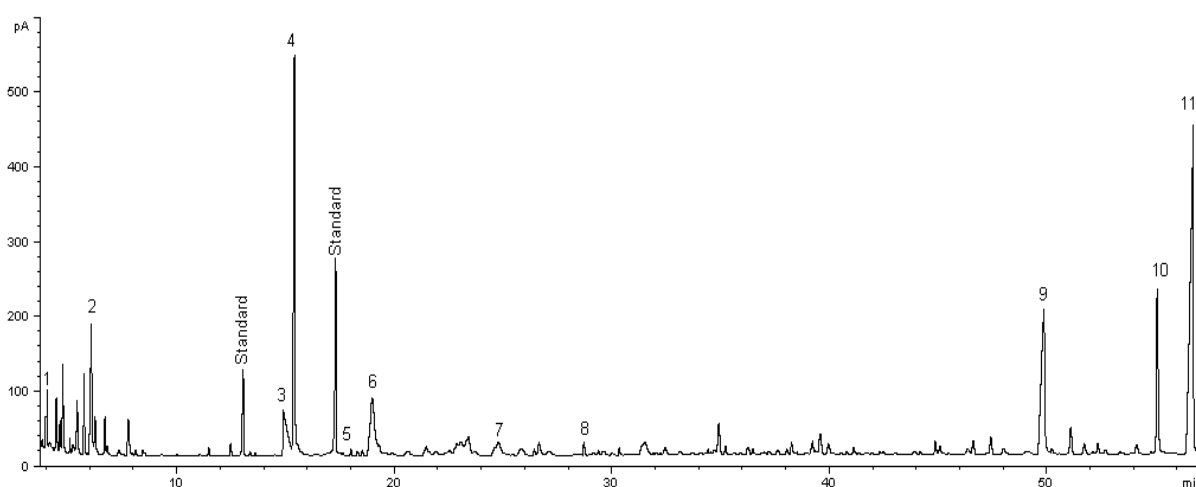


Fig. 2-1 Chromatogramm of the extract of Jaboticaba fruits (CP-Wax column)

The predominant peaks and the most impactful aroma components are numbered as follows: β -pinene (1), limonene (2), acetic acid (3), unknown compound (4), linalool (5), β -caryophyllene (6), δ -cadinene (7), 2-phenylethanol (8), phytol (9), cinnamic acid (10), and hexadecanoic acid (11).

To examine the sensorial significance of the volatile components, olfactometric analysis of the Jaboticaba extract was carried out by means of GC-O. Of all separated volatiles 23 imparted a sensory impression at the sniff port of the GC-O. The predominant odor qualities in the aroma extract were described as green and flowery with resinous notes. To estimate the sensory contribution of individual odorants to the overall aroma of Jaboticaba fruits, flavor dilution (FD) factors were determined by means of aroma extract dilution analysis. As shown in Tab. 2-2, δ -cadinene, 2-phenylethanol and linalool were still recognized at the sniff port of the GC-O at a dilution of 1:25; β -pinene was even perceivable at a dilution of 1:50 and thus identified as the most potent odorant of Jaboticaba fruits. Morton described the flavor of Jaboticaba fruits as grape-like, sweet, subacid and slightly resinous [133].

Tab. 2-2 Character impact compounds of Jaboticaba fruits

Volatile compound	RI ^a	FD ^b	Odour quality
α -Pinene	<1000	1	Resin
β -Pinene	<1100	1:50	Woody, green
Limonene	1186	1	Minty, fresh, campher
1,8-Cineole	1192		
Hexanol	1352	1	Green
(<i>E</i>)-3-Hexen-1-ol	1377	1	Green
Acetic acid	1422	1	Sour
α -Copaene	1472	1	Musty, dusty
Linalool	1544	1:25	Flowery
β -Caryophyllene	1570	1	Green, musty
Aromadendrene	1614	1	Dusty, honey
Germacrene D	1676	1	Corn
δ -Cadinene	1729	1:25	Medicine
Methyldodecanoate	1785	1	Sweet
α -Calacorene	1878	1	Pine, resin
2-Phenylethanol	1882	1:25	Honey, flowery
Caryophyllene oxide	1938	1	Rose
Ledol	2035	1	Sweet, anise
10-epi-Eudesmol	2084	1	Pine
Nonanoic acid	2157	1	Spicy, green
τ -Muurolol	2166	1	Spicy
α -Bisabolol	2174	1	Sweet, flowery
α -Cadinol	2202	1	Resin

^a Retention index, experimental; ^b Flavor dilution factor

The aroma extract contained some of the aroma components at levels not detectable by GC-FID or GC-MS, but still perceivable at the sniff port of the GC-O by the human nose. To elucidate these important aroma compounds, the extracts obtained by liquid-liquid extraction and concentrated to approximately 1 mL were further concentrated using preparative gas chromatography and analyzed by GC-MS. Most of the odorants were identified as terpenes, of which β -caryophyllene and limonene were the most abundant components (Fig. 2-1). Corresponding to the results of GC-MS and GC-FID terpenes were found as important contributors of the flavor of Jaboticaba fruits. The typical sweet taste of

the fruits is due to the high sugar content. Similar to raisins or dried figs the sugar content of the pulp of ripe Jaboticaba fruits may reach 60 % [147].

Characterizing wine produced from pulp of Jaboticaba fruits, Duarte et al. found 67 volatile components (C6 compounds, alcohols, monoterpenes, ethyl esters, acetates, volatile phenols, acids, carbonyl compounds and sulfur compounds) [146]. Ten of these volatiles were also detected in this study (1-hexanol, 3-hexen-1-ol, linalool, α -terpineol, nonanoic acid, decanoic acid, hexadecanoic acid, 3-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol). However, the majority of terpenoid compounds identified in fresh Jaboticaba fruits was not found in the wine produced from pulp. Whether these components are mainly contained in the skin or degraded by the fermentation process is not known. The most prevalent group of aroma compounds in the Jaboticaba wine were ethyl esters, like they are also found in other wines. Ten of the volatile compounds identified in the present study have also been found in essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves (α -pinene, β -pinene, limonene, 1,8-cineole, α -copaene, β -elemene, β -caryophyllene, germacrene D, α -muurolene, δ -cadinene,). Among the volatiles identified sesquiterpene hydrocarbons predominate, of which germacrene D and β -eudesmol had the highest shares [148].

In conclusion, the composition of volatiles of Jaboticaba fruits was explored for the first time. A total of 45 volatile compounds were identified, of which 23 imparted a sensory impression at the sniff-port of the GC-O. Based on AEDA β -pinene, δ -cadinene, 2-phenylethanol and linalool were the most impactful aroma compounds. Terpenes, organic acids and alcohols were the most abundant volatiles of the fruits. Together with the high sugar content, terpenes were considered to contribute much to the typical sweet, subacid and slight resinous flavor of the Jaboticaba fruits.

3 LOX_{psa1}, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus

Reprinted from *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**, 87, 99-104 with kind permission from Elsevier.

3.1 Abstract

A dioxygenase from the edible basidiomycete *Pleurotus sapidus*, originally researched because of its distinct ability to convert the sesquiterpene (+)-valencene to the valuable grapefruit aroma (+)-nootkatone, was identified as a potent lipoxygenase (LOX_{psa1}). Kinetic parameters, pH and temperature optima of the pure recombinant enzyme were determined using linoleic acid as the substrate. K_m , v_{max} , and k_{cat} were 40.3 μM , 130.3 U mg^{-1} , and 157 s^{-1} , respectively. The maximal enzymatic activity was found at pH 7.0 and 35 °C. Showing high specificity towards free linoleic acid, the enzyme was classified as lipoxygenase type 1. Conversion of linoleic acid yielded mainly (*S*)-13-hydroperoxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid (94 % ee), as was confirmed by chiral HPLC analysis of the hydroperoxides. The amino acid sequence showed homology to lipoxygenases catalyzing *S* stereospecific oxygenation, and thus the enzyme was characterized as a 13*S*-lipoxygenase. This is the first lipoxygenase described to accept terpene hydrocarbons as substrates.

Keywords: basidiomycete, lipoxygenase, promiscuity, recombinant, terpene

3.2 Introduction

Lipoxygenases (LOX) constitute a family of non-heme iron containing dioxygenases which catalyze the regio- and stereospecific insertion of molecular oxygen in polyunsaturated fatty acids (PUFA) with at least one (1*Z*,4*Z*)-pentadiene unit [94]. Forming highly reactive conjugated fatty acid hydroperoxides this reaction plays an important role as initial step in biosynthesis of a large variety of different products. LOX-derived metabolites, the so-called oxylipins, occur ubiquitous in plants [149], mammals [150], fish [151], microorganisms [152] and fungi [93, 153], performing a wide range of biological functions. In plants, they are involved in the regulation of development processes and defense against herbivore or

microbial pathogen attack [130], whereas mammalian oxylipins, such as leukotrienes and lipoxins, regulate immune responses [154].

Owed to the formation of highly reactive compounds, LOXs are also of interest to the food industry. A number of flavor components including the green notes of fruits and vegetables can be formed along the enzymatic cleavage of fatty acid hydroperoxides into short chain aldehyds and alcohols [155]. Some types of LOX, such as LOX-1 from soybean, were found to catalyze co-oxidative reactions in the presence of PUFAs [156]. They are applied in bread-making for the bleaching of carotenoids [131] and the improvement of dough rheology [157].

Although the occurrence of LOX activity in fungi and the associated biosynthetic pathway leading to the characteristic flavor compounds 1-octen-3-ol and 1-octen-3-one was suggested years ago, there are virtually no reports that C8 compounds originate from the activity of a fungal LOX [130, 153]. Recent studies confirmed LOX activity in extracts of several fungal species, such as *Geotrichum candidum* [158], *Mortierella sp.* [159], *Penicillium camemberti* [160], *Penicillium roqueforti* [160] and *Morchella esculenta* [161]. In addition, LOXs of *Saprolegnia parasitica* [162], *Gaeumannomyces graminis* [93, 163], *Pleurotus ostreatus* [153], *Tefezia claveryi* [164, 165] and *Thermomyces lanuginosus* [97] were purified and partially characterized. Among them the ascomycete *Gaeumannomyces graminis* ('take all' plant disease) excreted the most unusual fungal LOX – a so-called manganese LOX (Mn-LOX). Containing catalytic manganese instead of iron, this LOX showed remarkable differences in reaction mechanism and products compared to classical LOXs [166]. Mn-LOX is the only fungal LOX so far, which has been cloned and expressed in *Pichia pastoris* recombinantly [163, 167].

From basidiomycota, a LOX from *Pleurotus ostreatus* has been isolated and biochemically characterized [153]. However, the sequence of this enzyme is still unknown, although the database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) includes an mRNA-sequence of a LOX from *Pleurotus ostreatus* (GenBank: AB472334.1). Fraatz et al. [168] described the bioconversion of the sesquiterpene (+)-valencene to (+)-nootkatone by an oxygenase, provisorily termed valencene oxygenase (ValOx), from *Pleurotus sapidus*. According to the products obtained and homology data from partial sequences a lipoxygenase-like type of enzyme was postulated [33]. Recently, this valencene dioxygenase

from *P. sapidus* was functionally expressed in *E. coli* [169]. The aim of this study was to verify and characterize the recombinant enzyme.

3.3 Material and methods

3.3.1 Chemicals

The purified recombinant enzyme was obtained as described by Zelena et al. [169]. Tris-HCl (> 99 %), citric acid monohydrate (> 99 %), formic acid (> 98 %), anhydrous sodium sulfate (> 99 %) and disodium phosphate (> 99 %) were purchased from Roth (Karlsruhe, Germany); linoleic acid (> 99 %, hydroperoxide-free) and sodium borohydride (> 99 %) were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Steinheim, Germany); boric acid (> 98.5 %), iron(II) chloride tetrahydrate (> 98 %) and LOX-1 from soybean were provided from Fluka (Seelze, Germany). All other chemicals used were analytical grade.

3.3.2 Protein concentration

The protein concentration was determined by the method of Lowry [170] using DC-Protein-Assay (Bio-Rad, Munich, Germany) and bovine serum albumin as a standard. In the concentration range used (0.2 mg mL⁻¹ - 1.2 mg mL⁻¹) the calibration curve was linear with a coefficient of determination of $R^2 = 0.992$.

3.3.3 SDS-PAGE and Western Blotting

The protein samples were diluted 1:2 with SDS loading buffer and denatured for 10 min at 95 °C. SDS-PAGE was performed according to [171] using 12 % (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were stained with 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Germany). Unstained standard proteins (Bio-Rad, Munich, Germany) were used for the preparation of a calibration curve for the determination of molecular masses.

For Western blot analysis the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The recombinant dioxygenase was detected using a Penta-His HRP conjugated Kit (5 PRIME, Hamburg, Germany). Staining was carried out using 4-chloro-1-naphthol and H₂O₂ according to the manual instructions.

3.3.4 Peptidolytic cleavage of the His-tag

To eliminate the His-Tag epitope from the recombinant LOX_{Psa1}, 50 µg of the purified protein preparation were mixed with 1 µg Factor Xa Protease (NEB, Frankfurt am Main, Germany) in Factor Xa-Buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0) and incubated for 6 h at 23 °C. A specific inactivation of the peptidase after the cleavage was omitted.

3.3.5 Enzyme activity

Enzyme activity was determined spectrophotometrically by monitoring the increase in the absorbance at 234 nm due to the transformation of linoleic acid to the respective conjugated hydroperoxydienes [87]. The assay was carried out in an UV-transparent 96-well microtiter plate containing 5 µL enzyme solution (0.1 ng purified enzyme µL⁻¹ per well) and 175 µL citrate-phosphate buffer (pH 7; except determination of pH optima). The reaction was initiated by adding 40 µL of a freshly prepared 2 mM substrate solution, which was made of 20 µL (18 mg) linoleic acid, 30 µL (33 mg) Tween 20, and 60 µL 1 M NaOH in a 2 mL volumetric flask and filled up with distilled water. This mixture was diluted with distilled water to the appropriate final concentration of 2 mM linoleic acid (except kinetic studies). Absorbance at 234 nm was recorded every 30 sec and monitored at least for 20 min using a microplate reader (Synergy 2, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany), which was tempered to 22 °C (except determination of temperature optimum).

Enzyme activity was calculated on the basis of the molar extinction coefficient of the conjugated diene hydroperoxides at 234 nm ($\epsilon = 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Blanks were carried out using 5 µL buffer instead of enzyme solution. All experiments were performed in triplicate.

3.3.5.1 Effect of pH and temperature on enzyme activity

The pH optimum was determined at 22 °C using McIlvaine citrate-phosphate buffer (0.1 M citric acid and 0.2 M Na₂HPO₄) for pH 4.0-8.0 and 100 mM borate buffer for pH 8.0-9.5. Determination of the optimal temperature was performed in the range of 22-50 °C using 182.4 mM citrate-phosphate buffer (pH 7). The addition of the substrate solution was not carried out until the enzyme-buffer mixture was tempered at the appropriate temperature for 5 minutes.

3.3.5.2 Study of kinetic parameters

Estimation of the Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum activity rate (v_{max}) was based on the method of Lineweaver and Burk [172] using various substrate concentrations (0.1-1 mM). Each experiment was carried out with enzyme solutions of three different concentrations (0.075 ng μL^{-1} , 0.1 ng μL^{-1} , 0.15 ng μL^{-1}).

3.3.6 Chemical characterization of reaction products

To characterize reaction products arising from bioconversion of linoleic acid, 500 μL Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7) and 500 μL 2 mM linoleic acid solution were incubated with 2 μL enzyme solution (22 μg purified enzyme) for 30 min at 22 °C on an orbital shaker. Reaction products were compared to those obtained with LOX-1 from soybean using the same conditions at pH 10 (borate buffer, 100 mM).

3.3.7 Substrate specificity

Activity of the recombinant enzyme towards trilinolein and methyl linoleate was analyzed by the photometrical assay described above or LC-MS methods, respectively. The substrate solution was prepared as described, without addition of NaOH.

3.3.8 Preparation of racemic hydroperoxy linoleic acid

Fenton's reaction was performed to obtain racemic hydroperoxides of linoleic acid as reference compounds. Aqueous solutions of hydrogen peroxide (9.88 M), FeCl_2 (25 mM) and linoleic acid (25 mM with 8 mM Tween 20) were mixed in a 5 mL volumetric flask and filled up with distilled water to reach final concentrations of 100 mM, 0.1 mM and 8.25 mM, respectively. The mixture was incubated for 20 h at 22 °C in the dark.

3.3.9 Synthesis of hydroxy linoleic acid

The oxidation products obtained enzymatically or by Fenton's reaction were acidified by addition of 1% formic acid and extracted using 3 x 1.5 mL and 3 x 5 mL *n*-hexane, respectively. Combined extracts were washed with sodium chloride solution and dried over Na_2SO_4 . Solvent was evaporated under a nitrogen stream and residue was resolved in 100 μL or 2 mL methanol, respectively. To reduce the hydroperoxides, NaBH_4 was added and samples were incubated for 30 min at 0 °C. Subsequently, the mixture was acidified with 1%

formic acid and extracted with 3 x 1 mL and 3 x 5 mL *n*-hexane, respectively. After evaporation of the solvent, enzymatic samples were re-dissolved in 250 μ L acetonitrile, while products obtained by Fenton's reaction were solubilized in 1 mL acetonitrile.

3.3.10 Purification of hydroxy linoleic acid

Semi-preparative isolation of pure regioisomeric hydroxy linoleic acid (HODE) was carried out on a Nucleodur C18 Pyramid column (250 x 4 mm, 5 μ m; Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using the following gradient system with 0.1 % formic acid (A) and acetonitrile containing 0.1 % formic acid (B): 0-3 min 80-45 % A, 3-20 min 45-31.4 % A, 20-23 min 31.4-0 % A, 23-28 min 0 % A, 28-32 min 0-80 % A and 32-36 min 80 % A. Two LC-10ADVp micro-plunger pumps (Shimadzu, Duisburg, Germany), connected with a DGU-14A four-line membrane degasser (Shimadzu, Duisburg, Germany) and coupled to a SPD-10Avp UV/Vis detector (Shimadzu, Duisburg, Germany), were used for reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The effluent was monitored at 234 nm.

3.3.11 Chiral HPLC

Fractions containing main products of enzymatic conversion were dried under N₂ stream and resolved in *n*-hexane. In case of products obtained by Fenton's reaction, the fraction containing 13-HODE was used. Enantiomeric pairs of HODE were separated by means of a chiral Nucleocel Delta S (250 x 4.6 mm, 5 μ m; Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using an isocratic eluent system of *n*-hexane and isopropanol containing 0.1 % formic acid (95:5). Instrumentation was the same as for RP-HPLC.

3.3.12 Liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Regiospecific analysis of linoleic hydroperoxides was carried out according to [173] using a Nucleodur C18 Pyramid column (250 x 4 mm, 5 μ m; Macherey-Nagel, Düren, Germany). Eluent A consisted of (v/v) THF/MeOH/water/acetic acid (25:30:44.9:0.1) and B was MeOH/water (9:1). Both solvents contained 5 mM NH₄OAc. Elution was performed at 400 μ L min⁻¹ using the following gradient system: 0-5 min 90 % A, 5-35 min 90-10 % A, 35-45 min 10 % A and 45-48 min 10-90 % A. Two high pressure gradient Varian 212-LC chromatography pumps (Palo Alto, CA, USA) connected with a Varian 4 channel vacuum degasser (Palo Alto, CA, USA) and coupled to a Varian Pro Star UV/Vis detector (Palo Alto,

CA, USA) and a 320-Triple Quad LC-MS² (Palo Alto, CA, USA) were used for LC-MS/MS. Detection of linoleic acid hydroperoxides was achieved spectrophotometrically at 234 nm and subsequently in ESI-positive mode: capillary, 10 V, needle voltage, 5000 V; nebulizer gas pressure, 379 Pa; API housing; 60 °C, drying gas, 138 kPa at 200 °C and argon as collision gas (CID) at 200 Pa.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Effect of the His-tag on the activity of the recombinant LOX_{psa1}

The LOX_{psa1} expressed using the pCold vector contained an N-terminal His-tag epitope for detection and purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Heterologous expression of different lipoxygenase genes fused to an oligo-His-peptide is common [113, 174, 175]. However, it could be not excluded that additional histidine residues influence the folding and the enzyme activity of the expression product, if the active center or the binding domain was affected. The pCold I vector contained a cleavage site for the Factor Xa peptidase after the His-tag epitope. This 15 aa oligopeptide had a molecular mass of 1.9 kDa. To control the possible effect of the additional amino acids on the LOX_{psa1} activity, the purified recombinant protein was digested with the Factor Xa peptidase. The efficiency of the peptidolytic cleavage was confirmed by SDS-PAGE and Western blot (Fig. 3-1).

The elimination of the His-tag was complete, and no non-specific cleavage products were detected. As described

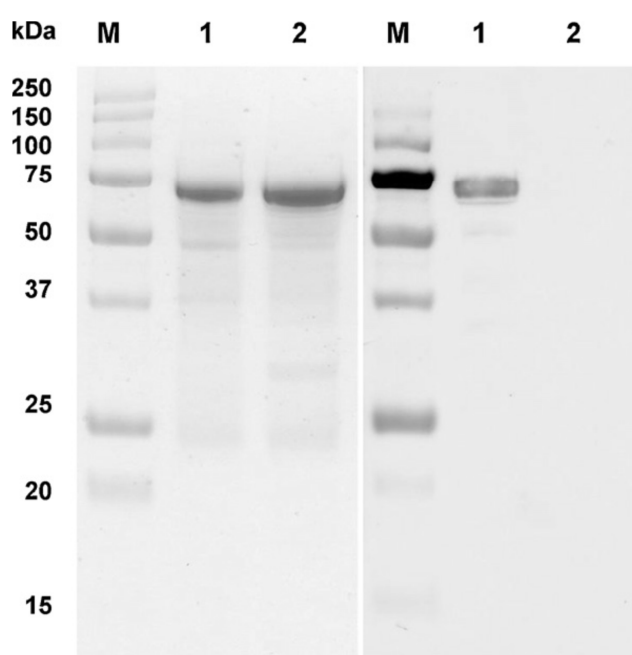


Fig. 3-1 Peptidolytic cleavage of the His-tag from the recombinant LOX_{psa1} using Factor Xa Protease

SDS-PAGE and Western-blot of the purified LOX_{psa1} preparation. M: Precision Plus Protein™ Standards All Blue; 1: LOX_{psa1}, undigested; 2: LOX_{psa1}, digested with the Factor Xa Protease

by Zelena et al. [169] the LOX_{Psa1} preparation after Factor Xa digestion was applied to the transformation of (+)-valencene forming the valuable grapefruit aroma (+)-nootkatone.

The elimination of the His-tag showed no adverse effect on the (+)-valencene oxidation activity of the recombinant enzyme. As the His-tag oligopeptide was located on the non-catalytic N-terminal domain distant from the active C-terminus the same behavior is expected for the LOX activity. The analogous observation was reported after the total elimination of the N-terminal domain of the LOX-1 from *G. max* which did not result in an alteration of activity [176].

3.4.2 Catalytic and kinetic properties of the recombinant LOX_{Psa1}

The dependence of the activity of the recombinant LOX_{Psa1} on pH and temperature was determined spectrophotometrically using linoleic acid as substrate. The pH optimum of the enzyme was found at 7.0 with a noticeably broad activity maximum with about 80 % of

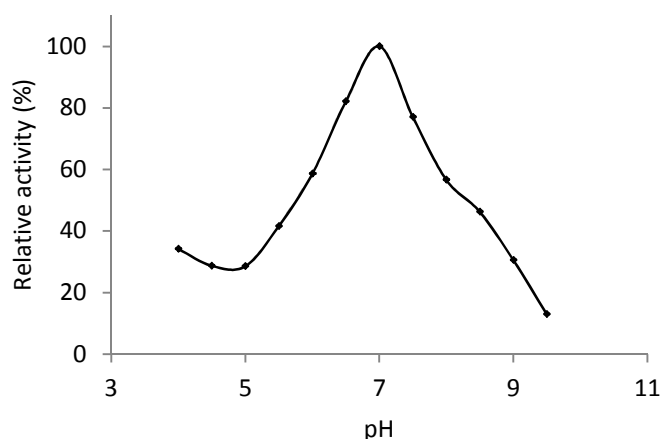


Fig. 3-2 Effect of pH on activity of the recombinant LOX_{Psa1}

(all values mean of triplicates)

maximal activity over a pH range of 6.5-7.5 (Fig. 3-2). This is in accordance with pH optima reported for wild-type LOXs from other fungi such as *Gaeumannomyces graminis* and *Pleurotus ostreatus*, which were 7.0 [93] and 8.0 [153], respectively. The recombinant LOX_{Psa1} showed a broad temperature optimum at 35 °C,

with about 90 % of maximum activity in the range of 25-35 °C (Fig. 3-3). The same temperature optima were reported for LOX from *Pleurotus ostreatus* (25 °C) [153] and *Botryodiplodia theobromae* (Ascomycota) (30 °C) [177].

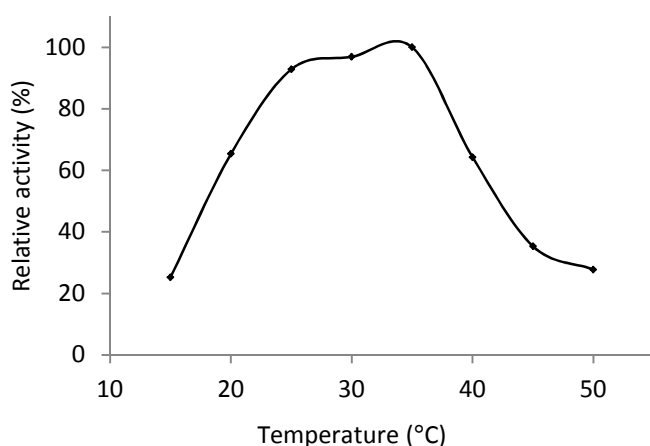


Fig. 3-3 Effect of temperature on activity of the recombinant LOX_{psa1} (all values mean of triplicates)

The kinetic parameters v_{\max} and K_m were derived from the Lineweaver-Burk-transformation of the Michaelis-Menten kinetics obtained using linoleic acid as substrate. The recombinant LOX_{psa1} exhibited a K_m of 40.3 μM which was in the range reported for other fungal LOX (Tab. 3-1), whereas the v_{\max} of 130.3 U mg^{-1} was approximately tenfold higher. Based on the

molecular mass of the enzyme (72.3 kDa) [169], a catalytic efficiency (k_{cat}) of 157 s^{-1} and a k_{cat}/K_m value of 3.9 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ were calculated, which was comparable to the Mn-LOX from *Gaeumannomyces graminis* (4.2 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Compared to soybean LOX-1, the recombinant enzyme exhibited significantly higher activity towards linoleic acid.

Tab. 3-1 Kinetic parameters of the recombinant LOX_{psa1} compared to other LOX

LOX source	K_m , μM	v_{\max} , U mg^{-1}	k_{cat} , s^{-1}	k_{cat}/K_m , $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	Reference
<i>Pleurotus sapidus</i>	40.3	130.3	157	3.9	Present work
<i>Pleurotus ostreatus</i>	130	23.4	25.7	0.20	[153]
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	4.4	8.2	18.33	4.17	[93]
Soybean	150	13.5	25.9	0.17	[178]

Activity of the recombinant enzyme towards the triacylglycerol trilinolein was not detectable, whereas oxygenation of methyl linoleate was comparable (product spectrum and reaction rate) to linoleic acid indicating that the formerly called ValOx from *P. sapidus* [169] is actually a type 1 lipoxygenase, such as LOX-1 from soybean.

3.4.3 Analysis of reaction products

Regiospecificity of the recombinant enzyme was determined by RP-HPLC separation and tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis of the products. Containing only one pentadienyl system, linoleic acid could be oxidized either in position 9 or 13. The chromatogram of products generated by the LOX_{Psa1} showed one predominant peak at 37.32 min (1) and two minor peaks at 38.16 min (2) and 38.16 min (3) (Fig. 3-4).

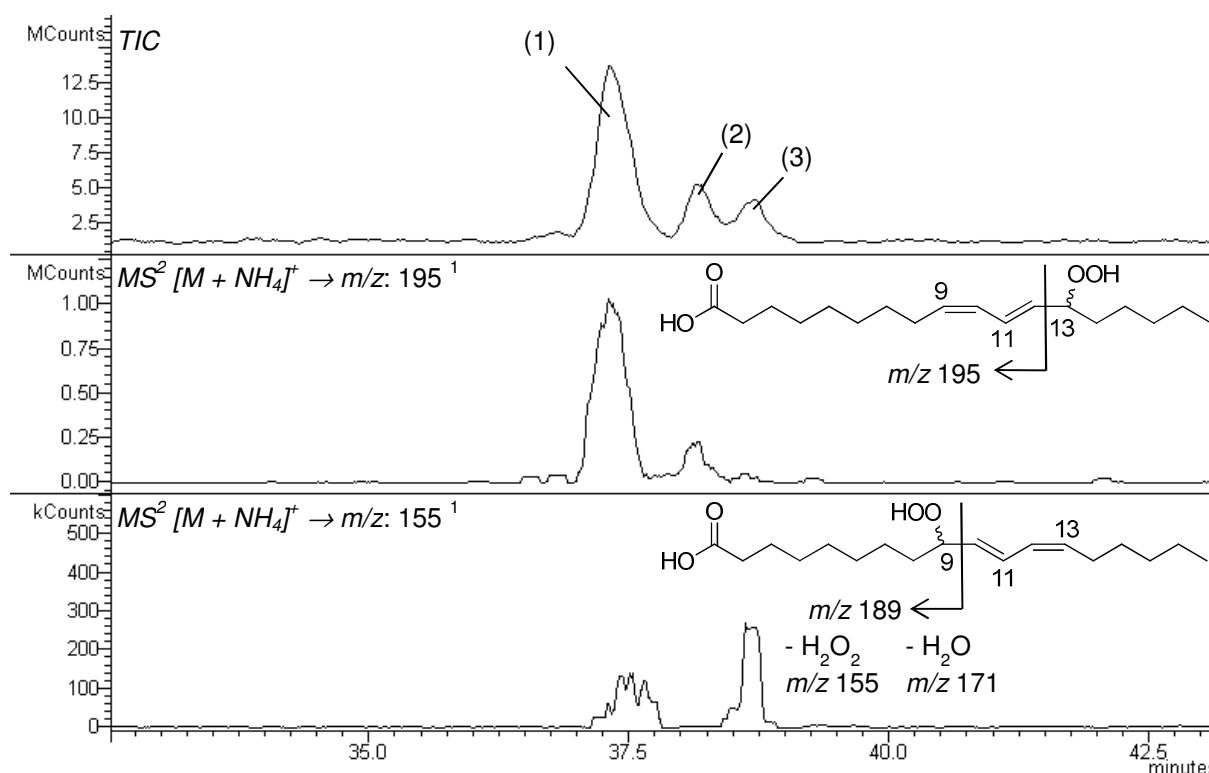


Fig. 3-4 LC-MS/MS chromatogram of linoleic acid oxidized by recombinant LOX_{Psa1}

Total ion chromatogram (TIC) and product ions of m/z 330 (ESI positive mode; -7.0 eV; 200 Pa argon as collision gas (CID)). (1) 13-*Z,E*-HOPD and 9-*E,Z*-HPOD; (2) 13-*E,E*-HPOD.

¹ *E,E*-Isomers are cleaved at the same position.

According to Schneider et al. [173] adduct ions $[M + NH_4]^+$ of linoleic acid hydroperoxides were monitored, and 9- and 13-regioisomers were identified by their characteristic mass spectra. The incidence of ion m/z 195 formed by fission of C₁₂-C₁₃ bond was described to be characteristic for 13-regioisomers, whereas m/z 155 and m/z 171, caused by cleavage of the corresponding C₉-C₁₀ bond and subsequent elimination of water or H₂O₂, were attributed to allocate 9-regioisomers. By means of appropriate single ion chromatograms (m/z 195, m/z 155), 13-hydroperoxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid (13-*Z,E*-HPOD) and 9-hydroperoxy-

10*E*,12*Z*-octadecadienoic acid (9-*E,Z*-HPOD) were obtained in peak (1). Peak (2) and (3) were identified as 13-hydroperoxy-9*E*,11*E*-octadecadienoic acid (13-*E,E*-HPOD) and 9-hydroperoxy-10*E*,12*E*-linoleic acid (9-*E,E*-HPOD) by means of LC-MS/MS, respectively, and enantiomers in order of elution described by Dufour et al. [179] and Schneider et al. [173]. The transformation rate of linoleic acid was 65 % (photometric assay); side products were not detectable under conditions (LC-MS), and the ratio of 13- to 9-regioisomers was 80:20 at pH 7. To investigate the stereospecificity of the recombinant enzyme, linoleic acid derived hydroperoxides were reduced to their corresponding alcohols and separated by chiral phase HPLC (CP-HPLC).

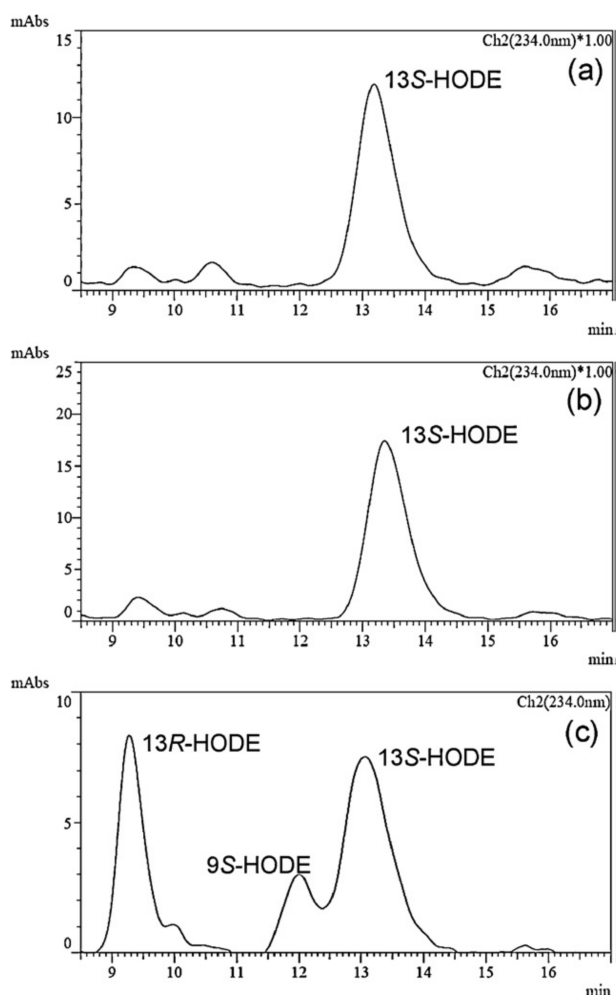


Fig. 3-5 Separation by CP-HPLC-UV/Vis of stereoisomers of hydroxy linoleic acid (HODE)

HODE resulted from reduction of HPODs (main products, prior isolated by means of semi-preparative RP-HPLC) formed by LOX_{Psa1} (a), LOX-1 from soybean (b) or Fenton's reaction (c). Order of elution was allocated to published data [180].

Fig. 3-5 shows chromatograms of 13-HODE obtained from recombinant LOX_{Psa1} (a) compared to standards produced by LOX-1 from soybean (b) and Fenton's reaction (c). Fenton's reaction forms a racemic mixture of the two possible enantiomers, whereas LOX-1 from soybean produced mainly the (*S*)-enantiomer (93 % ee). This indicates that the (*R*)-enantiomer eluted first. The 13-hydroxy linoleic acid of recombinant LOX_{Psa1} exhibited the

same retention time as products of LOX-1 from soybean; thus the fungal enzyme was identified as a 13S-lipoxygenase (94 % ee). Most of plant and mammalian LOXs described in the literature form stereochemically pure hydroperoxides with *S* configuration, whereas some marine invertebrates contain *R*-LOX, oxygenating arachidonic acid at C₅, C₈, C₁₁ or C₁₂. However, Mn-LOX from *Gaeumannomyces graminis* was found to be the first *R*-LOX, which oxygenated linoleic acid at C₁₃ [93].

Stereospecificity of enzymes is attributed to substrate orientation in the active site, and Coffa et al. [113] succeeded in identifying a single amino acid residue in the catalytic center of lipoxygenases responsible for the spatial orientation of the substrate during oxygenation. Alanine was found to promote *S* orientation, whereas a glycine at the same position caused *R* oxygenation. In accordance with the results obtained by CP-HPLC analysis, the amino acid sequence of LOX_{Psa}1 contained alanine inside the catalytic center at the position crucial for 13S-lipoxygenases (Tab. 3-2) [169].

Tab. 3-2 Alignment of LOX_{Psa}1 and LOX-1 from soybean

Potential stereo-determinant amino acid residues; highlighted: conserved Ala residue in *S*-lipoxygenases

	Sequence	Name	GenBank Accession	Reference
563	L N A L A R S V L I	LOX _{Psa} 1		[169]
538	I N A L A R Q S L I	Soybean LOX-1	S25064	[113]

Looking at the long-proven formation of C6- and C9-volatiles by plant lipoxygenases, fungal lipoxygenases were proposed to analogously initiate formation of the characteristic fungal flavor compounds 1-octen-3-ol and 1-octen-3-one. Wurzenberger et al. [129] claimed that 1-octen-3-ol was derived from 10-hydroperoxides formed by LOX catalyzed oxidation of linoleic acid, and subsequent cleavage of the intermediate by a hydroperoxide lyase. However, the high regioselectivity of the present 13S-LOX_{Psa}1 excludes a contribution to the generation of the characteristic mushroom flavors. Recently, the formation of 1-octen-3-ol was attributed to bifunctional precocious sexual inducer (Psi) factor-producing oxygenase enzymes (Ppo). In fungi, PpoC converted linoleic acid to 10*R*-HPOD, which was either reduced to keto-derivatives or cleaved to 10-oxo-8-dienoic acid and 1-octen-3-ol [130].

3.5 Conclusion

LOX_{Psa}1 is the first lipoxygenase from a basidiomycete fungus expressed and heterologously produced in *E. coli* [169]. The recombinant enzyme showed a high catalytic activity on free linoleic acid, formed mainly 13S-hydroperoxide, and was thus confirmed as a lipoxygenase. Optima of pH and temperature were comparable to values described for other fungal LOX, whereas the kinetic parameters measured using linoleic acid indicated a much higher activity. In contradiction to the classical definition of a LOX both the wild-type and the recombinant LOX_{Psa}1 oxidized other lipophilic substrates, such as terpene hydrocarbons, in good yields. (+)-Valencene, a sesquiterpene from orange oil, was converted to (+)-nootkatone and nootkatols [33]. Lyophilisates of *Pleurotus sapidus* catalyzed the oxyfunctionalization of R-(+)-limonene to carvon [36], of α -pinene to verbenone/ol [5] and of (+)-car-3-en to car-3-ones/ols [34] as well as the transformation of various cycloalkenes to the corresponding enones [181]. This promiscuity calls for a biotechnological application to produce other bioactive or fragrant terpenoids. Fungi may possess other dioxygenases with previously unknown substrate and reaction specificities worth to be explored.

4 Isolation and characterization of wild-type LOX_{Psa}1 from *Pleurotus sapidus*

Accepted in *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2014. Reprinted with kind permission from Verlag der Zeitschrift für Naturforschung.

4.1 Abstract

The lipoxygenase LOX_{Psa}1 of *Pleurotus sapidus*, originally investigated because of its ability to oxidize (+)-valencene to the valuable grapefruit aroma (+)-nootkatone, was isolated from the peptidase-rich lyophilisate using a three-step purification scheme including preparative isoelectric focusing and chromatographic techniques. Nano-liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (nLC-ESI-MS/MS) of the purified enzyme and peptide mass fingerprint analysis gave 38 peptides of the lipoxygenase from *P. sapidus*. Nearly 50 % of the 643 amino acids long sequence encoded by the cDNA was covered. Both terminal peptides of the native LOX_{Psa}1 were identified by *de novo* sequencing, and the postulated molecular mass of 72.5 kDa was confirmed. With linoleic acid as the substrate, the LOX_{Psa}1 showed a specific activity of 113 U mg⁻¹ and maximal activity at pH 7.0 and 30 °C, respectively.

Keywords: basidiomycete, lipoxygenase, *Pleurotus sapidus*

4.2 Introduction

The edible fungus *Pleurotus sapidus* is a member of the phylum Basidiomycota, which encloses about 30,000 species [182]. Around 1,000 thereof are appreciated as a delicious and nutritious food. Owing to the increasing demand for renewable natural sources of bioactive components and enzymes suitable for biotechnological and food applications, many recent studies have focused on basidiomycota [183, 184]. According to their capability to degrade lignified biopolymers effectively, basidiomycota produce a unique set of enzymes comprising oxidoreductases, such as laccases, lignin peroxidases, manganese peroxidases, as well as peptidases, glycoside hydrolases, esterases, and other hydrolases [185, 186]. However, work on enzymes from basidiomycota is often complicated by interfering activities, such as laccases which catalyze the polymerization of phenols and were found to interfere with the standard assay of fungal ferulic acid esterases [187]. As these organisms

are a rich source of peptidases [188], the rapid peptidolytic degradation of proteins of interest is another fundamental obstacle.

P. sapidus catalyzes the allylic oxidation of terpenoid compounds, such as (+)-valencene to (+)-nootkatone [168], *R*-(+)-limonene to *R*-(-)-carvone [189], α -pinene to verbenone [5], and (+)-car-3-en to car-3-ones/ols [34] in high yields. Guided by the valencene oxidizing activity, an enzyme called ValOx was purified and characterized as a lipoxygenase (LOX) by reaction mechanism and sequence homology. According to the peptide sequences obtained by mass spectrometry, a cDNA sequence encoding a polypeptide of 396 amino acids was initially postulated [168].

However, a homology comparison with the meanwhile available genome of the closely related *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) appeared to indicate that 247 additional N-terminal amino acids were missing. Recently, the full sequence was functionally expressed in *Escherichia coli* [190] and the protein biochemically characterized [191]. Although the recombinant enzyme LOX_{psa1} showed good LOX activity, the yields of conversion of valencene were significantly lower compared to those obtained with the native enzyme [80 vs. 280 mg (+)-nootkatone L⁻¹] [33, 190]. Thus, it was decided to isolate enough LOX_{psa1} from the lyophilisate of *P. sapidus* to fully characterize the native enzyme. After numerous failures, a purification scheme coping with the abundant peptidolytic activities of lyophilisates of basidiomycetes was eventually developed.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Fungus

Pleurotus sapidus (DSMZ 8266) was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany. For maintenance on agar slants and submerged culture, the fungus was grown on glucose/L-asparagine/yeast extract medium as described elsewhere [36]. Production of biomass and subsequent lyophilization were performed as described by Krings *et al.* [5]. Briefly, *P. sapidus* was cultivated in shaking flasks and biomass (25 g dry matter L⁻¹) was harvested 5 d after inoculation.

4.3.2 Purification of active enzyme

Ten g of lyophilized biomass were re-suspended in 100 mL Tris-HCl (20 mM, pH 7.5) supplemented with Protease Inhibitor Mix FY (Serva, Heidelberg, Germany) and extracted for 1 h at 4 °C by agitation in horizontal position in an orbital shaker. Subsequently, insoluble components were removed by means of centrifugation (20 min, 6,000 x g, 4 °C), and the supernatant was subjected to preparative isoelectric focusing.

4.3.3 Preparative isoelectric focusing (pIEF)

The supernatant was mixed with 2 % Servalyt (pH 3-6; Serva) and transferred to the focusing chamber of a Rotofor cell (Bio-Rad, Munich, Germany). The chamber was cooled to 2 °C. Focusing was carried out at constant power of 12 W using 0.5 M ethanolamine and 0.5 M acetic acid as anode and cathode buffers, respectively. After 5 h, 20 fractions were harvested. Of each fraction, the pH value was measured, and LOX activity was determined spectrophotometrically by monitoring the increase in the absorbance at 234 nm during the transformation of linoleic acid [191]. Fractions with LOX activity were pooled, diluted with distilled water to a final volume of 200 mL, and subjected to anion exchange chromatography.

4.3.4 Ion exchange chromatography (IEX)

Anion exchange chromatography was performed on a HiTrap Q-XL column (1 mL; GE Healthcare, Freiburg, Germany) using potassium phosphate (10 mM, pH 6.5) as a start buffer (buffer A). Proteins were eluted with a step gradient of potassium phosphate containing 1 M sodium chloride (buffer B) over four steps: 10 column volumes (CV) 100 % buffer A, 10 CV 90 % buffer A, 10 CV 80 % buffer A, 10 CV 0 % buffer A. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹ and the fraction size was 2 mL. Fractions with LOX activity were pooled, concentrated to 250 µL by ultrafiltration, and subjected to size exclusion chromatography.

4.3.5 Size exclusion chromatography (SEC)

For SEC, a Superdex 75 10/300 GL column (24 mL; GE Healthcare) with an optimum separation range of 3-70 kDa was employed. Tris-HCl (20 mM, pH 7.5) served as elution buffer. The flow rate was adjusted to 0.3 mL min⁻¹, and the fraction size was 1 mL.

4.3.6 Gel electrophoresis

Purity of protein samples was monitored using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 12 % (w/v) polyacrylamide gels [171]. Proteins were stained with 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva). To determine molecular masses, unstained standard proteins (Precision Plus Protein; Bio-Rad) were used.

4.3.7 Enzyme activity

To determine LOX activity, the increase in the absorbance at 234 nm caused by LOX-induced transformation of linoleic acid to the corresponding conjugated diene hydroperoxides was measured spectrophotometrically. The assay was performed as described elsewhere [191].

4.3.8 Determination of pH and temperature optima

The temperature optimum was determined in the range of 20-50 °C using sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7). The enzyme-buffer mixture was tempered at the appropriate temperature for 5 min prior to the addition of the substrate. Determination of the pH optimum was carried out at 30 °C using Britton-Robinson buffer [192] in the range of pH 4-9.5.

4.3.9 LOX identification

Assigned LOX bands were excised from SDS polyacrylamide gels, dried, consecutively incubated with dithiothreitol and iodine acetamide, and finally digested with trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI, USA). The resulting peptides were extracted and purified according to standard protocols. Peptides, re-dissolved in 20 µL H₂O, 2 % (v/v) acetonitrile, and 0.1 % (v/v) formic acid were analysed using the nano-liquid chromatography (LC) system EASY-nLC II (Bruker Daltronik, Bremen, Germany) equipped with a 20-mm pre-column (C18-A1 3PCS; ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) and a capillary column (0.1 mm x 150 mm) packed with Magic C18 AQ (3 µm particles, 200 Å pore; Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA, USA) eluted by a linear gradient (300 nL min⁻¹) of water and acetonitrile [each with 0.1 % formic acid (v/v)] from 95 % water to 95 % acetonitrile within 25 min and hold for 15 min. The nano-LC system was connected to a maXis impact QTOF mass spectrometer (Bruker Daltronik) equipped with a captive nano-spray ion source for electrospray ionization in the positive mode. For collision-induced

dissociation experiments, multiple-charged parent ions were automatically transmitted from the quadrupole mass analyzer into the collision cell (21-50 eV). The resulting daughter ions were separated by an orthogonal time-of-flight mass analyzer operating with lock mass calibration (1,221.9906) and mass resolution > 30,000. Peptide mass fingerprint analysis was done with ProteinScape 3.0 (Bruker Daltronik) and applied for cross-species protein identification (NCBIInr, current in-house releases) using the Mascot software server (Mascot 2.4.0 search engine; Matrix Science, London, UK). Parameters were set as follows: Enzyme, trypsin/P; global modification, carbamidomethylation (variable); oxidation (M, variable), up to 1 missing cleavage allowed; precursor ion mass tolerance, 10 ppm; fragment ion mass tolerance, 0.05 Da; peptide charge, 1+, 2+, 3+; instrument, ESI QUAD TOF (Bruker Daltronik); minimum peptide length, 4; Mascot score, > 30.

4.4 Results and discussion

In order to isolate the native LOX completely and in active form from lyophilized mycelia of *P. sapidus*, in spite of the presence of a multitude of concomitant enzymes partly known to exhibit peptidolytic activities, a three-step purification scheme was developed (Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Summary of the purification of LOX_{psa1} from *Pleurotus sapidus*

Purification step	Protein [mg]	Specific activity [U mg ⁻¹]	Recovery (%)	Purification (x-fold)
Crude extract	436.9	0.403	100.0	1.0
pIEF	169.9	0.471	45.5	1.2
IEX	6.9	9.91	38.8	24.6
SEC	0.1	113.05	6.4	280.3

After the rehydration of the lyophilisate, the water-soluble components were separated according to their isoelectric points (pI) using pIEF. In agreement with the pI reported for a purified LOX from *Pleurotus ostreatus* [153], the present study determined a pI of 4.5-5 by measuring the pH value of each fraction (Fig. 4-1).

Fractions 10 to 15 were pooled and subjected to IEX on a strong anion exchanger. The main LOX activity was found in fractions 13 to 18 eluted with 0.2 M sodium chloride. Subsequently, the active fractions were pooled again and separated by SEC, which yielded one LOX-active fraction. Analyzing the purified enzyme by means of

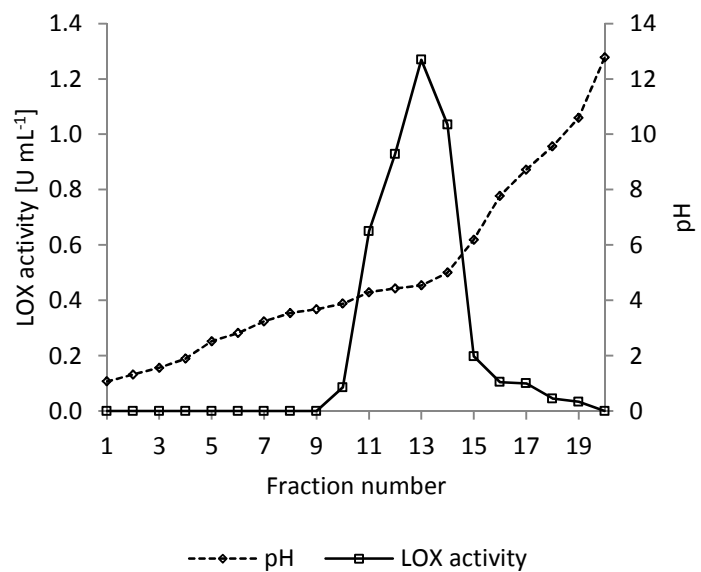
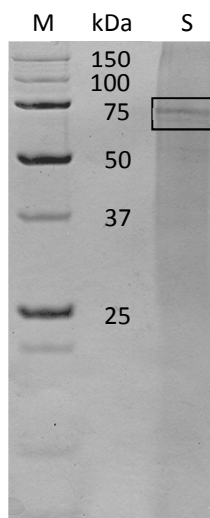


Fig. 4-1 Preparative isoelectric focusing of a crude extract from *P. sapidus*

SDS-PAGE, a single band corresponding to a molecular mass of approximately 75 kDa was obtained (Fig. 4-2).

The Coomassie-stained band was carefully excised from the gel and submitted to tryptic digestion with subsequent identification of peptides by nano-liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (nLC-QTOF-MS/MS). A total of 38 peptides of the lipoxygenase of *P. sapidus* (gi/466860334) were identified which resulted in a Mascot score of 2,700. The sequence coverage was 48.5 % (Fig. 4-3). Unambiguous identification of two peptides “VHNISLSSR” (missing only the N-terminal amino acid) and „LAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLANAIVI” (including the typical isoleucine C-terminus)



confirmed a molecular mass of 72,506 Da of the native LOX (amino acids). Hence, the formerly annotated valencene oxygenase from *P. sapidus* (ValOx) [168] is not a related dioxygenase or an isoenzyme, but rather a smaller fragment of the LOX formed by peptidolysis during the LOX purification procedure. Although a peptidase inhibitor mix was added in all steps of the present work, the SDS-PAGE gel still showed

Fig. 4-2 SDS-PAGE of the purified LOX from *Pleurotus sapidus* after three-step purification

Lane M, Precision Plus Protein™ Standard All Blue; lane S, SEC fraction, showing LOX activity

two additional weak bands with smaller molecular masses. The tryptic peptide sequences found for these gel bands fitted without any exception to the sequence of the LOX.

MVHNISLSSRKALHNVHLPYMVQLPKPTGYNVALKNAAEGYDKARRMVAWLYDIADYESSIPQTFTL
QQKTDKYTWELSDNFPPHLAVVPPDQSVSAPSIFSPVRLAQTLLIMSSLWYDDHTDLAPGPEQNTMQKL
TQWNQERHKDQGWLIKDMFNAPNIGLRNDWYTDEVFAQQFFTGPNSTTITLASDVWLTAFITSEAKAQ
GKDKVIALFESAPPNSFYVQDFSDFRRRMGAKPDEELFNDSDGAMRYGCAAVALFYLTAMGKHLPLAI
IPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWRYAKTCVLSSDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVA
AQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNALARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESFTNFDWKSLYVPADLE
SRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCDEMRS
MGAGMTNFPESITTVDDLVNMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVPNKPSALFSPLPTSIAQLQKYT
ESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAV
FLVNSAQLDDQNTPYDVLLAPEQLANAIVI

Fig. 4-3 Sequence coverage of native LOX

Amino acids present in the sequenced 38 tryptic peptides are underlined.

The LOX-catalyzed transformation of linoleic acid to the respective conjugated diene hydroperoxide as a function of pH value and temperature was determined spectrophotometrically using the purified enzyme. In accordance with the recombinant LOX_{psa1}, the specific activity of the native enzyme was 113 U mg⁻¹. The optima were found at 30 °C and pH 7 (Fig. 4-4), respectively. Both results agree with the optima determined for the recombinant LOX_{psa1}, which were 25-35 °C and pH 7, respectively [191].

Similar ranges of maximal activity have been reported for other fungal LOXs. pH optima of LOXs produced by the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* or the ascomycetes *Thermomyces lanuginosus* and *Gaeumannomyces graminii*, which excrete a manganese lipoxygenase, were in the range of pH 6-8 [93, 97, 153]. The temperature optima of

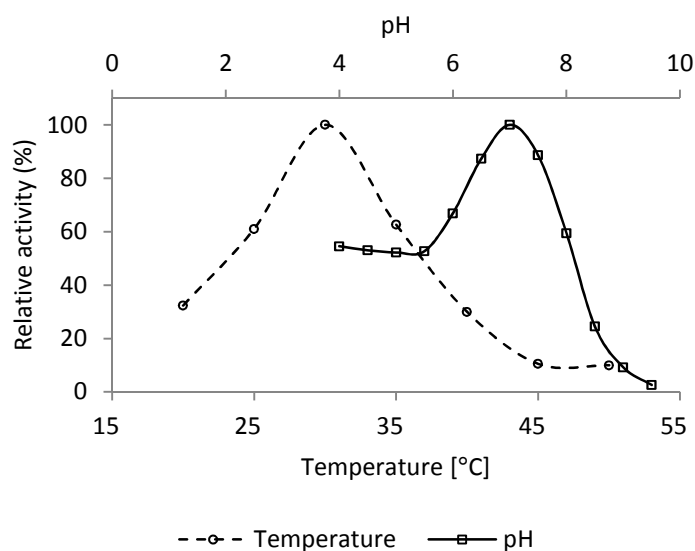


Fig. 4-4 Effect of temperature and pH value on activity of the purified LOX

LOXs from *P. ostreatus* and the ascomycete *Botryodiplodia theobromae* were found at 25 °C and 30 °C, respectively [153, 177].

There are only very few studies on purified lipoxygenases from basidiomycota. Kuribayashi *et al.* [153] isolated and characterized a LOX from *P. ostreatus*. Although the amino acid sequence of the enzyme showed high similarities to LOX_{Psa1}, the optima of the purified native enzyme were pH 8 and 25 °C, respectively, and the enzymatic activity was significantly lower (23.4 U mg⁻¹) [106].

Application of purification scheme involving rigorous peptidase inhibition enabled the identification of the entire amino acid sequence. Although the wild-type enzyme had previously been assumed to comprise 369 amino acids only [168], a sequence coding for 643 amino acids was postulated at the genetic level. The present work confirmed the accuracy of the recombinant LOX_{Psa1} by identifying 38 peptides resulting in a sequence coverage of nearly 50 %. Accordingly, the wild-type LOX_{Psa1} purified from the lyophilisate of *P. sapidus* on the hand, and the enzyme produced heterologously in *E. coli* on the other hand, shared identical biochemical parameters [190, 191]. Obviously, the lower valencene oxidizing activity of the recombinant protein, generated from the respective cDNA of *P. sapidus*, cannot be explained by a difference in the amino acid sequence. As the ESI-QTOF results did not suggest any particular post-translational modification of the native enzyme, a stimulating effect of unknown constituents of the lyophilisate is currently the best explanation of the observed differences in activity.

5 Ausblick

Oxyfunktionalisierte Kohlenwasserstoffe erfüllen sowohl in der Natur als auch in der präparativen Synthesechemie vielfältige Funktionen. So wurde im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der Jaboticaba-Frucht die Bedeutung entsprechender Terpenderivate als Duft- und Aromastoffe gezeigt. Aber auch bei der Produktion verschiedenster Fein- und Grundchemikalien spielt die Oxyfunktionalisierung eine entscheidende Rolle. Auf der Suche nach wirtschaftlichen und umweltschonenden Lösungen haben in den letzten Jahren biotechnologische Wege stark an Bedeutung gewonnen. Die in dieser Arbeit beschriebene LOX_{Psa}1 besitzt die Fähigkeit freie Linolsäure zu dem entsprechenden 13S-Hydroperoxid umzusetzen. Basierend auf der Homologie der Reaktionsprodukte zu den von Soja-LOX-1 gebildeten Hydroperoxiden bietet es sich an, LOX_{Psa}1 für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie zu testen. Die Entfärbung sowie die Verbesserung rheologischer Eigenschaften sind dabei für die Backwarenproduktion von besonderem Interesse.

Aufgrund der Fähigkeit neben Linolsäure auch Terpene wie Valencen in allylischer Position zu oxidieren, ist LOX_{Psa}1 auch für die Produktion von Aromastoffen von Bedeutung. Entsprechende Substrate fallen häufig in großen Mengen als industrielle Nebenströme an, so dass die enzymatische Oxidation zu geruchsaktiven Terpenoiden eine gute Möglichkeit der Wertschöpfung darstellt. Zukünftige Studien sollten deswegen verschiedene Terpene als Substrate untersuchen. Zudem könnten Transformationen entsprechender nicht-terpenoider Verbindungen, die beispielsweise für den Einsatz in der präparativen Chemie von Bedeutung sind, getestet werden. Anhand struktureller Homologien der Substrate kann so möglicherweise auch der Erfolg potentieller weiterer Biotransformationsreaktionen mit LOX_{Psa}1 abgeschätzt werden.

Bei der Umsetzung von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton mit LOX_{Psa}1 wurden unter Zusatz von inaktiviertem Lyophilisat des Myzels deutlich höhere Produktkonzentrationen beobachtet als mit dem reinen Enzym. Da der Grund hierfür bislang nicht aufgeklärt werden konnte, ist es erforderlich in weiterführenden Studien das Myzel auf die aktivierenden Komponenten zu untersuchen.

Um kostengünstig große Mengen des reinen Enzyms zu gewinnen, hat sich in der Biotechnologie die heterologe Expression von Enzymen etabliert. Für die Produktion der in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten LOX_{Psa1} wurde *E. coli* als Expressionssystem verwendet. In zukünftigen Arbeiten könnte die Verwendung von *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae* getestet werden. Da sie wie *Pleurotus sapidus* zum Reich der Pilze gehören, sind sie möglicherweise für die Expression fungaler Proteine besonders geeignet. Zusätzlich könnte das Enzym durch gerichtete Mutation modifiziert und optimiert werden. Auf diese Art lässt sich möglicherweise auch die Aktivität gegenüber Terpenen verbessern.

6 Literatur

- [1] Süskind, P. (1994): *Das Parfum: Diogenes*.
- [2] Ohloff, G. (1994): *Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives*. Berlin: Springer.
- [3] Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (1990): *Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses* (2. rev. ed). Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- [4] Deutscher Verband der Aromenindustrie e.V. (2008): *Aromenverzehr in Deutschland*. http://www.aromenhaus.de/fakten/aromaverzehr_in_deutschland/, Stand: 06.04.2013.
- [5] Krings, U., et al. (2009): Autoxidation versus biotransformation of α -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective hydroperoxidation of α -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 9944-9950.
- [6] Bohlmann, J., Steele, C. L., Croteau, R. (1997): Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21784-21792.
- [7] Nieuwenhuizen, N. J., Green, S., Atkinson, R. G. (2010): Floral sesquiterpenes and their synthesis in dioecious kiwifruit. *Plant Signaling & Behavior*, 5(1), 61-63.
- [8] Ruzicka, L. (1953): The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9(10), 357-67.
- [9] Breitmaier, E. (1999): *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. Stuttgart, Leipzig: Teuber.
- [10] Ruecker, G. (1973): Sesquiterpenes. *Angewandte Chemie*, 85(20), 895-907.

-
- [11] McNaught, A. D., Wilkinson, A. (1997): IUPAC. Compendium of chemical terminology (2nd). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [12] Lynen, F. (1967): Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure and Applied Chemistry*, 14(1), 137-167.
- [13] Strømgaard, K., Nakanishi, K. (2004): Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(13), 1640-1658.
- [14] Rohmer, M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports*, 16(5), 565-574.
- [15] Phillips, M. A., Croteau, R. B. (1999): Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5), 184-190.
- [16] Chen, X.-Y., et al. (1995): Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324(2), 255-266.
- [17] Kawano, Y., Yanagihara, K. H., Bevenue, A. (1974): Analytical studies of pyrethrin formulations by gas chromatography: III. Analytical results on insecticidally active components of pyrethrins from various world sources. *Journal of Chromatography A*, 90(1), 119-128.
- [18] Wani, M. C., et al. (1971): Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325-2327.
- [19] Klayman, D. L., et al. (1984): Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *Journal of Natural Products*, 47(4), 715-717.
- [20] Schrader, J. (2007): Microbial flavour production. in: Berger, R. G. (Ed.), *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin, Heidelberg: Springer.

-
- [21] van Beilen, J. B., et al. (2005): Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium sp.* cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1737-1744.
- [22] Haudenschild, C., et al. (2000): Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha spp.*) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(1), 127-136.
- [23] Tan, Q., Day, D. F., Cadwallader, K. R. (1998): Bioconversion of (*R*)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*, 33(1), 29-37.
- [24] Bell, S. G., et al. (2002): Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450_{cam}. *Journal of the American Chemical Society*, 125(3), 705-714.
- [25] Schewe, H., Kaup, B.-A., Schrader, J. (2008): Improvement of P450_{BM-3} whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 55-65.
- [26] Hunter, G. L. K., Brogden, W. B., Jr. (1965): Conversion of valencene to nootkatone. *Journal of Food Science*, 30(5), 876-878.
- [27] Shaffer, G. W., et al. (1975): Oxidations of valencene. *Journal of Organic Chemistry*, 40(15), 2181-2185.
- [28] Schulte-Elte, K. H., Fracheboud, M. G., Ohloff, G. (1971): Nootkatone. DE2035901A.
- [29] Wilson, C. W., Shaw, P. E. (1978): Synthesis of nootkatone from valencene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(6), 1430-1432.
- [30] Salvador, J. A. R., Clark, J. H. (2002): The allylic oxidation of unsaturated steroids by tert-butyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts. *Green Chemistry*, 4(4), 352-356.

-
- [31] Sowden, R. J., et al. (2005): Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{cam} and P450_{BM-3}. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(1), 57-64.
- [32] Girhard, M., et al. (2009): Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microbial Cell Factories*, 8, 36.
- [33] Krügener, S., et al. (2009): A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresource Technology*, 101(2), 457-462.
- [34] Lehnert, N., et al. (2012): Bioconversion of car-3-ene by a dioxygenase of *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 159(4), 329-335.
- [35] Lehnert, N., Krings, U., Berger, R. G. (2011): Analysis of car-3-en-5-hydroperoxide. *Natural Product Communication*, 6(9), 1217-1220.
- [36] Onken, J., Berger, R. G. (1999): Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69(2-3), 163-168.
- [37] Krügener, S., et al. (2009): *Pleurotus* species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides. *Bioresource Technology*, 100(11), 2855-2860.
- [38] Simkin, A. J., et al. (2004): The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, 40(6), 882-892.
- [39] Gao, H., et al. (2008): Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 991-996.

-
- [40] Ilg, A., Beyer, P., Al-Babili, S. (2009): Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis. *FEBS Journal*, 276(3), 736-747.
- [41] Speckmann, E.-J., Hescheler, J., Köhling, R. (2008): *Physiologie*. München: Elsevier.
- [42] Buck, L., Axel, R. (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-187.
- [43] Ohloff, G. (2004): *Düfte: Signale der Gefühlswelt*. Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta.
- [44] Buck, L. B. (2000): The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, 100(6), 611-618.
- [45] Fischer, E. (1894): Influence of configuration on the action of enzymes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27, 2985-2993.
- [46] Amoore, J. E. (1967): Specific anosmia: A clue to the olfactory code. *Nature*, 214(5093), 1095-1098.
- [47] Pauling, L. (1946): Molecular architecture and biological reactions. *Chemical & Engineering News Archive*, 24(10), 1375-1377.
- [48] Bentley, R. (2006): The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. *Chemical Reviews*, 106(9), 4099-4112.
- [49] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (5th). Berlin: Springer-Verlag.
- [50] Ohloff, G., et al. (1980): Stereochemistry-odor relationships in enantiomeric ambergris fragrances. *Helvetica Chimica Acta*, 63(7), 1932-1946.
- [51] Burton, S. G. (2003): Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 543-549.

-
- [52] Torres Pazmiño, D. E., et al. (2010): Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 146(1-2), 9-24.
- [53] Faber, K. (2011): Biotransformations in organic synthesis (6th). Heidelberg: Springer.
- [54] Meunier, B., de Visser, S. P., Shaik, S. (2004): Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 104(9), 3947-3980.
- [55] Holland, H. L., Weber, H. K. (2000): Enzymatic hydroxylation reactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(6), 547-553.
- [56] Dekant, W., Vamvakas, S. (2005): Toxikologie: Eine Einführung für Chemiker, Biologen und Pharmazeuten (2nd). München: Spektrum Akademischer Verlag.
- [57] Lister, D. L., et al. (1999): Transformations of codeine to important semisynthetic opiate derivatives by *Pseudomonas putida* m10. *FEMS Microbiology Letters*, 181(1), 137-144.
- [58] Zehentgruber, D., et al. (2010): Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. *ChemBioChem*, 11(5), 713-721.
- [59] Faramarzi, M. A., et al. (2003): Microbial hydroxylation of progesterone with *Acremonium strictum*. *FEMS Microbiology Letters*, 222(2), 183-186.
- [60] El-Kadi, I. A., Eman Mostafa, M. (2004): Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. *Folia Microbiologica*, 49(3), 285-290.
- [61] Guroff, G., et al. (1967): Hydroxylation-induced migration: The NIH shift. *Science*, 157(3796), 1527-1530.
- [62] de Visser, S. P., Shaik, S. (2003): A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(24), 7413-7424.

-
- [63] Holderbaum, D. F., et al. (2010): Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development. *HortScience*, 45(8), 1150-1154.
- [64] Katsuki, T., Sharpless, K. B. (1980): The first practical method for asymmetric epoxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 102(18), 5974-5976.
- [65] Jacobsen, E. N., et al. (1991): Highly enantioselective epoxidation catalysts derived from 1,2-diaminocyclohexane. *Journal of the American Chemical Society*, 113(18), 7063-7064.
- [66] Fang, J.-M., et al. (1995): Enzymes in organic synthesis: oxidoreductions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(8), 967-978.
- [67] Panke, S., et al. (1999): Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5619-5623.
- [68] Roberts, S. M., Wan, P. W. H. (1998): Enzyme-catalysed Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4(3), 111-136.
- [69] Taschner, M. J., Black, D. J., Chen, Q.-Z. (1993): The enzymatic Baeyer-Villiger oxidation: A study of 4-substituted cyclohexanones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 4(6), 1387-1390.
- [70] Königsberger, K., Griengl, H. (1994): Microbial Baeyer-Villiger reaction of bicyclo[3.2.0]heptan-6-ones - a novel approach to sarkomycin A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2(7), 595-604.
- [71] Beneventi, E., et al. (2009): Enzymatic Baeyer-Villiger oxidation of steroids with cyclopentadecanone monooxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 164-168.
- [72] Hernandez, D., et al. (2003): Trimethylaminuria and a human FMO3 mutation database. *Human Mutation*, 22(3), 209-213.

-
- [73] Gibson, D. T., Parales, R. E. (2000): Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 236-243.
- [74] Cosper, N. J., et al. (2002): Redox-dependent structural changes in archaeal and bacterial Rieske-type [2Fe-2S] clusters. *Protein Science*, 11(12), 2969-2973.
- [75] Beinert, H., Holm, R. H., Münck, E. (1997): Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science*, 277(5326), 653-659.
- [76] Wackett, L. P. (2002): Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(5), 577-587.
- [77] Spain, J. C., Gibson, D. T. (1988): Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1399-1404.
- [78] Boyd, D. R., Sheldrake, G. N. (1998): The dioxygenase-catalysed formation of vicinal *cis*-diols. *Natural Product Reports*, 15(3), 309-324.
- [79] Hudlicky, T., Boros, E. E., Boros, C. H. (1992): Microbial oxidation of *o*-chlorostyrene: Determination of absolute stereochemistry of the *cis*-diol metabolite by a convergent synthesis utilizing an intramolecular Diels-Alder reaction. *Synlett*(5), 391-393.
- [80] Banwell, M. G., et al. (1999): *cis*-1,2-Dihydrocatechols in chemical synthesis: First synthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) from a non-carbohydrate source. *Australian Journal of Chemistry*, 52(2), 137-142.
- [81] Newman, L. M., et al. (2004): Directed evolution of the dioxygenase complex for the synthesis of furanone flavor compounds. *Tetrahedron*, 60(3), 729-734.
- [82] Bugg, T. D. H., Sanvoisin, J., Spence, E. L. (1997): Exploring the catalytic mechanism of the extradiol catechol dioxygenases. *Biochemical Society Transactions*, 25(1), 81-85.
- [83] Siegbahn, P. E. M., Haeffner, F. (2004): Mechanism for catechol ring-cleavage by non-heme iron extradiol dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 8919-8932.

-
- [84] Bikiel, D. E., et al. (2006): Modeling heme proteins using atomistic simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(48), 5611-5628.
- [85] Thackray, S. J., Mowat, C. G., Chapman, S. K. (2008): Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1120-1123.
- [86] Kulmacz, R. J. (2005): Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 25-33.
- [87] Gökmen, V., Bahçeciavas, S., Acar, J. (2002): Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Technology*, 215(1), 42-45.
- [88] Andre, E., Hou, K. (1932): The presence of a lipid oxidase in soy bean, *Glycine soja*, Lieb. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 194, 645-647.
- [89] Theorell, H., Holman, R. T., Akeson, A. (1947): Crystalline lipoxidase. *Acta Chemica Scandinavica*, 1, 571-576.
- [90] Hamberg, M., Samuelsson, B. (1974): Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), 3400-3404.
- [91] Casey, R., Hughes, R. K. (2005): Recombinant lipoxygenases and oxylipin metabolism in relation to food quality. *Food Biotechnology*, 18(2), 135-170.
- [92] Coffa, G., Schneider, C., Brash, A. R. (2005): A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 87-92.
- [93] Su, C., Oliw, E. H. (1998): Manganese lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13072-13079.
- [94] Andreou, A., Feussner, I. (2009): Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1504-1510.

-
- [95] Boyington, J. C., Gaffney, B. J., Amzel, L. M. (1993): The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260(5113), 1482-1486.
- [96] Minor, W., et al. (1996): Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å Resolution. *Biochemistry*, 35(33), 10687-10701.
- [97] Knapp, M. J., Seebeck, F. P., Klinman, J. P. (2001): Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1. *Journal of the American Chemical Society*, 123(12), 2931-2932.
- [98] Saam, J., et al. (2007): Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(33), 13319-13324.
- [99] Bateman, A., Sandford, R. (1999): The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Current Biology*, 9(16), R588-R590.
- [100] Naylor, C. E., et al. (1999): Characterisation of the calcium-binding C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Journal of Molecular Biology*, 294(3), 757-770.
- [101] Perisic, O., et al. (1999): Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 Domain from cytosolic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 14979-14987.
- [102] Chahinian, H., Sias, B., Carriere, F. (2000): The C-terminal domain of pancreatic lipase: Functional and structural analogies with C2 domains. *Current Protein & Peptide Science*, 1(1), 91-103.
- [103] Hammarberg, T., et al. (2000): The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38787-38793.
- [104] Walther, M., et al. (2011): The N-terminal β -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity

and membrane binding but exhibits regulatory functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516(1), 1-9.

- [105] Maccarrone, M., et al. (2001): Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry*, 40(23), 6819-6827.
- [106] Tasaki, Y., et al. (2013): Molecular characterization of a lipoxygenase from the basidiomycete mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(1), 38-45.
- [107] Oliw, E. H. (2002): Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 313-323.
- [108] Rickert, K. W., Klinman, J. P. (1999): Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: Separation of primary and secondary isotope effects. *Biochemistry*, 38(38), 12218-12228.
- [109] Ivanov, I., et al. (2010): Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503(2), 161-174.
- [110] Kim, M. R., Kim, S. H., Sok, D.-E. (1989): Inactivation of potato lipoxygenase by hydroperoxy acids as suicide substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(3), 1384-1390.
- [111] Härtel, B., et al. (1982): Self-Inactivation by 13-hydroperoxylinoleic acid and lipohydroperoxidase activity of the reticulocyte lipoxygenase. *European Journal of Biochemistry*, 126(2), 353-357.
- [112] Wiesner, R., et al. (2003): Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15S-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(3), 304-315.
- [113] Coffa, G., Brash, A. R. (2004): A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of

- oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15579-15584.
- [114] Ruddat, V. C., et al. (2004): Tryptophan 500 and arginine 707 define product and substrate active site binding in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, 43(41), 13063-13071.
- [115] Hornung, E., et al. (1999): Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 4192-4197.
- [116] Jisaka, M., et al. (2000): Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1287-1293.
- [117] Hornung, E., et al. (2008): Identification of an amino acid determinant of pH regioselectivity in a seed lipoxygenase from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, 69(16), 2774-2780.
- [118] Berry, H., Débat, H., Garde, V. L. (1998): Oxygen concentration determines regioselectivity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2769-2776.
- [119] Lang, I., et al. (2008): A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochemical Journal*, 410(2), 347-357.
- [120] Andreou, A.-Z., et al. (2008): Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. *Phytochemistry*, 69(9), 1832-1837.
- [121] Brink, C., et al. (2003): International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 195-227.
- [122] Salmon, J. A., Higgs, G. A. (1987): Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *British Medical Bulletin*, 43(2), 285-296.

-
- [123] Pi, Y., et al. (2008): Molecular cloning, characterization and expression of a jasmonate biosynthetic pathway gene encoding allene oxide cyclase from *Camptotheca acuminata*. *Bioscience Reports*, 28(6), 349-355.
- [124] Hatanaka, A. (1993): The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34(5), 1201-1218.
- [125] Schieberle, P., Ofner, S., Grosch, W. (1990): Evaluation of potent odorants in cucumbers (*Cucumis sativus*) and muskmelons (*Cucumis melo*) by aroma extract dilution analysis. *Journal of Food Science*, 55(1), 193-195.
- [126] Blagden, T. D., Gilliland, S. E. (2005): Reduction of levels of volatile components associated with the "beany" flavor in soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. *Journal of Food Science*, 70(3), M186-M189.
- [127] Zhang, Y., et al. (2012): Off-flavor related volatiles in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7457-7462.
- [128] Sekhar Rao, K. C., et al. (2002): Lipoxygenase inhibitor from *Lactobacillus casei*. *Biotechnology Letters*, 24(7), 511-513.
- [129] Wurzenberger, M., Grosch, W. (1984): The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 794(1), 25-30.
- [130] Brodhun, F., Feussner, I. (2011): Oxylipins in fungi. *FEBS Journal*, 278(7), 1047-1063.
- [131] Wu, Z., et al. (1999): Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4899-4906.
- [132] Reynertson, K. A., et al. (2006): Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69(8), 1228-1230.

-
- [133] Morton, J. F. (1987): Jaboticaba. in: Morton, J. F. (Ed.), *Fruits of warm climates*. Winterville, NC.
- [134] Pietta, P. G. (2000): Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
- [135] Middleton Jr, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- [136] Hoffmann-Ribani, R., Huber, L. S., Rodriguez-Amaya, D. B. (2009): Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 263-268.
- [137] Santos, D. T., Veggi, P. C., Meireles, M. A. A. (2010): Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 23-31.
- [138] Pino, J. A., Almora, K., Marbot, R. (2003): Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 492-496.
- [139] Franco, M. R. B., Shibamoto, T. (2000): Volatile composition of some brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araca-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1263-1265.
- [140] Du, X., Finn, C. E., Qian, M. C. (2010): Volatile composition and odour-activity value of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, 119(3), 1127-1134.
- [141] Wu, S., et al. (2007): Volatiles from submerged and surface-cultured beefsteak fungus, *Fistulina hepatica*. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(1), 53-60.

-
- [142] van Den Dool, H., Kratz, P. D. (1963): A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11(C), 463-471.
- [143] El-Sayed, A. M.: The Pherobase: Database of insect pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com/>, Stand: Dezember 2010.
- [144] Acree, T., Arn, H.: Flavornet. <http://www.flavornet.org/>, Stand: Dezember 2010.
- [145] Adams, R. P. (1995): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (1st). Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- [146] Duarte, W. F., et al. (2010): Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1564-1572.
- [147] Barros, R. S., Finger, F. L., Magalhães, M. M. (1996): Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Scientia Horticulturae*, 66(3-4), 209-215.
- [148] Duarte, A. R., et al. (2010): Environmental influence on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(9), 1672-1680.
- [149] Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1), 15-21.
- [150] Shozo, Y. (1992): Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1128(2-3), 117-131.
- [151] German, J. B., Creveling, R. K. (1990): Identification and characterization of a 15-lipoxygenase from fish gills. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(12), 2144-2147.

-
- [152] Bisakowski, B., Perraud, X., Kermasha, S. (1997): Characterization of hydroperoxides and carbonyl compounds obtained by lipoxygenase extracts of selected microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1262-1269.
- [153] Kuribayashi, T., et al. (2002): Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1247-1253.
- [154] Shimizu, T. (2009): Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1), 123-150.
- [155] Casey, R., et al. (1999): New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. *Trends in Food Science & Technology*, 10(9), 297-302.
- [156] Aziz, S., Wu, Z., Robinson, D. S. (1999): Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β -carotene. *Food Chemistry*, 64(2), 227-230.
- [157] Frazier, P. J., et al. (1973): The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour doughs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(4), 421-436.
- [158] Perraud, X., Kermasha, S., Bisakowski, B. (1999): Characterization of a lipoxygenase extract from *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 34(8), 819-827.
- [159] Filippovich, S. Y., et al. (2001): Characterization of lipoxygenase from fungi of the genus *Mortierella*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(5), 473-479.
- [160] Perraud, X., Kermasha, S. (2000): Characterization of lipoxygenase extracts from *Penicillium sp.* *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4), 335-342.
- [161] Bisakowski, B., Atwal, A. S., Kermasha, S. (2000): Characterization of lipoxygenase activity from a partially purified enzymic extract from *Morchella esculenta*. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 1-7.

-
- [162] Herman, R. P., Hamberg, M. (1987): Properties of the soluble arachidonic acid 15-lipoxygenase and 15-hydroperoxide isomerase from the oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Prostaglandins*, 34(1), 129-139.
- [163] Hörnsten, L., et al. (2002): Cloning of the manganese lipoxygenase gene reveals homology with the lipoxygenase gene family. *European Journal of Biochemistry*, 269(11), 2690-2697.
- [164] Pérez-Gilabert, M., et al. (2005): Kinetic properties of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps: effect of inhibitors and activators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 6140-6145.
- [165] Pérez-Gilabert, M., Sánchez-Felipe, I., García-Carmona, F. (2005): Purification and partial characterization of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3666-3671.
- [166] Oliw, E. H. (2002): Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69(0), 313-323.
- [167] Cristea, M., et al. (2005): Expression of manganese lipoxygenase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of putative metal ligands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1), 201-211.
- [168] Fraatz, M. A., et al. (2009): A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3-4), 202-207.
- [169] Zelena, K., Krings, U., Berger, R. G. (2012): Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresource Technology*, 108(0), 231-239.
- [170] Lowry, O. H., et al. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-75.

-
- [171] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- [172] Lineweaver, H., Burk, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- [173] Schneider, C., Schreier, P., Herderich, M. (1997): Analysis of lipoxygenase-derived fatty acid hydroperoxides by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids*, 32(3), 331-336.
- [174] Chen, X.-S., Brash, A. R., Funk, C. D. (1993): Purification and characterization of recombinant histidine-tagged human platelet 12-lipoxygenase expressed in a baculovirus/insect cell system. *European Journal of Biochemistry*, 214(3), 845-852.
- [175] Boeglin, W., et al. (2008): Investigation of substrate binding and product stereochemistry issues in two linoleate 9-lipoxygenases. *Lipids*, 43(11), 979-987.
- [176] Ramachandran, S., et al. (1992): Limited proteolysis and active-site labeling studies of soybean lipoxygenase 1. *Biochemistry*, 31(33), 7700-6.
- [177] Gonzalez, M., et al. (2003): Studies on the presence and partial characterization of the enzyme lipoxygenase from the fungus *Botryodiplodia theobromae*. *Rev. ICIDCA Deriv. Cana Azucar*, 37(1), 11-14.
- [178] Pinto, M. d. C., García-Barrado, J. A., Macías, P. (2003): Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1653-1657.
- [179] Dufour, C., Loonis, M. I. (2005): Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids*, 138(1&2), 60-68.
- [180] Martini, D., Iacazio, G. (1997): Enantiomeric separation of various lipoxygenase derived monohydroxy polyunsaturated fatty acid methyl esters by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 790(1-2), 235-241.

-
- [181] Rickert, A., et al. (2012): Enzymatic allylic oxidations with a lyophilisate of the edible fungus *Pleurotus sapidus*. *Green Chemistry*, 14(3), 639-644.
- [182] Kirk, P. M., et al. (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (10th). Wallingford, UK: CAB International.
- [183] Alarcon, J., et al. (2006): Biotransformation of tryptophan by liquid medium culture of *Psilocybe coprophila* (Basidiomycetes). *Zeitschrift für Naturforschung*, 61c(11/12), 806-808.
- [184] Gruhn, N., et al. (2007): Biologically active metabolites from the basidiomycete *Limacella illinita* (Fr.) Murr. *Zeitschrift für Naturforschung*, 62c(11/12), 808-812.
- [185] Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H. (2008): Fungal secretomes — nature's toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(3), 381-388.
- [186] Zorn, H., et al. (2005): The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics*, 5(18), 4832-4838.
- [187] Haase-Aschoff, P., Linke, D., Berger, R. G. (2013): Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource Technology*, 130, 231-238.
- [188] Linke, D., et al. (2008): Production of gluten-specific peptidases from basidiomycetes and their use in hydrolysis of proteins for food industry applications. EP 1985698A1.
- [189] Kaspera, R., et al. (2005): Regio- and stereoselective fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60c(5/6), 459-466.
- [190] Zelena, K., Krings, U., Berger, R. G. (2012): Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresource Technology*, 108, 231-239.
- [191] Plagemann, I., et al. (2013): LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 99-104.

- [192] Britton, H. T. S., Robinson, R. A. (1931): Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society*, 1456-1462.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ina Plagemann
Geburtsdatum, -ort: 14.11.1983, Hannover
Familienstand: ledig

Schule

1996 - 2003
Gymnasium Leibnizschule, Hannover
Abschluss: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

08/2003 - 07/2004
DRK-Alten- und Pflegeheim „Grenzmark“, Hildesheim

Studium und Promotion

10/2004 - 02/2010
Studium der Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Diplomarbeit: „Migration flüchtiger Stoffe aus dem Futter in den Dotter des Hühnereies.“
Abschluss: Diplom-Chemikerin

04/2010 - 12/2013
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Lebensmittelchemie bei Prof. Dr. Dr. Berger, Leibniz Universität
Hannover