

Präkursoren, Induktoren, Elicitoren und das Volatilom von Basidiomyceten

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Birgit Annemarie Johanna Fuchs

geboren am 23.03.1985 in Würzburg

2016

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf Günter Berger

Korreferent: Prof. Dr. oec. troph. Andreas Hahn

Tag der Promotion: 18.10.2016

Zusammenfassung

Natürliche Aromastoffe sind für die Industrie ebenso wie für den Verbraucher von enormem Interesse. Biotechnologische Prozesse bieten dabei eine Alternative zur kostenintensiven Pflanzenextraktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung natürlicher Aromastoffe mittels Basidiomyceten untersucht. Aromastoffe wurden mit Hilfe von Präkursoren, Elicitoren oder Induktoren angereichert und bei deren Bildung beteiligte Enzyme ermittelt.

Zunächst wurden Effekte verschiedener Nährmedien auf die Aromaprofile von *Auriporia aurulenta*, *Hericiium erinaceus*, *Postia floriformis* und *Wolfiporia cocos* in Emers- und Submerskulturen bestimmt. Im Aromaextrakt von *A. aurulenta* wurden verschiedene Zimtsäurederivate als Abbauprodukte von L-Phenylalanin identifiziert. Außerdem wurde in Abhängigkeit des verwendeten Hefeextrakts die Aromaproduktion von *A. aurulenta* verändert. In Kulturen von *W. cocos* wurde 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (Furaneol®) identifiziert sowie eine Korrelation des Anteils an Hefeextrakt mit der Furaneol®-Konzentration festgestellt. Durch Supplementierungsversuche wurden sowohl L-(+)-Rhamnose als auch D-Fruktose-1,6-bisphosphat als mögliche Vorstufen ausgeschlossen. Ebenfalls wurde mittels Methyljasmonat keine Elicitierung der Furaneol®-Bildung in *W. cocos*-Kulturen bewirkt. Eine Kultivierung von *W. cocos* mit raffiniertem Rapsöl oder Rapspresskuchen führte dagegen zu einer Veränderung des Aromaprofils in Abhängigkeit der weiteren Mediumzusammensetzung. So wurden in Aromaextrakten von *W. cocos* in Minimalmedium mit Rapsöl β -Ionon und β -Caryophyllen identifiziert.

Ferner setzten in einem Stammscreening nach Substratinduktion zwei von 18 Basidiomyceten sowohl *trans*-Anethol zu *para*-Anisaldehyd als auch Piperin zu Piperonal um. Für *Pleurotus sapidus* wurden zwei intrazelluläre Enzyme mit einer solchen alkenspaltenden Aktivität identifiziert. Eine Lipoxygenase katalysierte die oben genannte Umsetzung in Anwesenheit von Linolsäure. Außerdem führte die Anwendung von verschiedenen chromatografischen Methoden zur Teilreinigung eines weiteren alkenspaltenden Enzyms. Mittels spezifischer Aktivitätstests und Proteinsequenzierung wurde eine Peroxidase für diese alkenspaltende Aktivität verantwortlich gemacht.

Des Weiteren wurden für die Aufklärung der Biogenese von (5 *E*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on (Decatrienon) in *Piptoporus betulinus* verschiedene Bildungswege sowie Präkursoren evaluiert. Der Einsatz von Glucosinolaten, Linol- und Linolensäure, Lichtinduktion sowie möglicher Polyketidsynthese-Starter (Malonat, Pyruvat oder Acetat) führte zu keiner Anreicherung von Decatrienon. Mittels GC-MS wurden jedoch vier *E/Z*-Isomere als potenzielle Präkursoren identifiziert, die mit Decatrienon nahezu identische Massenspektren aufwiesen. Die möglichen Präkursoren waren silylierbar und sauer hydrolysierbar. Eine Kultivierung mit einem Ethylacetat-Extrakt des Weißkohls führte schließlich zu einer Erhöhung sowohl der Präkursor- als auch der Decatrienonkonzentration.

Insgesamt wurden mit der vorliegenden Arbeit mehrere Wege zur natürlichen Herstellung von Aromastoffen aufgezeigt sowie einige Präkursoren für Aromastoffe identifiziert. Die erzielten Ergebnisse können somit als Grundlage für Applikationen im Bereich der Aromaindustrie dienen.

Schlagwörter:

Basidiomyceten, Aromastoffe, Alkenspaltung

Abstract

Natural flavour compounds are important for both food industry and consumers. Microbial methods for their production represent an alternative to plant-based processes. In this work the generation of natural flavour compounds via basidiomycetes was investigated. Flavours were enriched by means of precursors, elicitors or inductors and enzymes involved in their formation were determined.

Initially, effects of different media on the aroma profiles of *Auriporia aurulenta*, *Hericium erinaceus*, *Postia floriformis* and *Wolfiporia cocos* in emerge or submerge cultures were studied. Various cinnamic acid derivatives were identified in the flavour extract of *A. aurulenta* as metabolites of L-phenylalanine. In addition, the flavour production of *A. aurulenta* changed depending on the used yeast extract. In cultures of *W. cocos* 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (furaneol[®]) was detected and a correlation between the share of yeast extract and the furaneol[®] concentration was established. Supplementation with L-(+)-rhamnose or D-fructose 1,6-bisphosphate as possible precursors did not increase the furaneol[®] concentration. Furthermore, methyl jasmonate did not elicit the formation of furaneol in cultures of *W. cocos*. Contrarily, the cultivation of *W. cocos* with refined rape seed oil or rape seed oil cake caused a change of the flavour profile depending on the composition of the media. Thus, β -ionone and β -caryophyllene were identified in flavour extracts of cultures of *W. cocos* in minimal medium supplemented with rape seed oil.

Moreover, after substrate induction, two of 18 basidiomycetes were able to convert *trans*-anethole to *para*-anisaldehyde as well as piperine to piperonal. Two intracellular enzymes possessing such an alkene cleavage activity were identified in *Pleurotus sapidus*. In presence of linoleic acid a lipoxygenase catalysed the transformation. Besides, the use of different chromatographic methods led to a partial purification of another alkene cleavage enzyme. Via specific activity assays and protein sequencing a peroxidase was shown to be responsible for the alkene cleavage activity.

Additionally, different precursors and pathways for the biogenesis of (5 *E*, 7 *E/Z*)-deca-5,7,9-trien-2-one (decatrienone) in *Piptoporus betulinus* were evaluated. Apart from cabbage, the concentration of decatrienone was not increased by glucosinolates, linoleic or linolenic acid, light induction or possible starter units of the polyketide synthesis (malonate, pyruvate or acetate). Via gas chromatography coupled to mass spectrometric detection four *E/Z* isomers were postulated to be precursors. Their mass spectra were almost identical to the one of decatrienone. The possible precursors were silylated and hydrolysed in acid solutions. A cultivation with an ethyl acetate extract of white cabbage led to an increase of both the precursor and the decatrienone concentration.

Altogether this work shows several methods for the natural production of flavour compounds as well as precursors of flavour compounds. The results provide a reliable basis for applications of these processes in the area of flavour industries.

Keywords:

Basidiomycetes, flavour compounds, alkene cleavage

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde von Januar 2013 bis August 2016 im Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen, und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut. Sein Wissen, seine Erfahrung und seine Ratschläge haben wesentlich zu meiner wissenschaftlichen und persönlichen Entwicklung beigetragen.

Mein weiterer Dank gilt insbesondere Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie Frau Dr. Diana Linke für die Unterstützung bei Arbeiten im Bereich der Enzymtechnologie. Die wissenschaftlichen Gespräche mit ihnen und ihre Anregungen sowie motivierenden Worte haben das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst.

Herrn Professor Dr. Hahn danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und Frau Professor Dr. Rinas für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Herrn Dr. Thomas Reinard (Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Pflanzenbiotechnologie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die zur Verfügungstellung der Inkubationskammern. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Yvonne Koleczek für die praktische Hilfe vor Ort.

Des Weiteren bedanke ich mich bei B. Sc. Lukas Kahlert für die Arbeiten zur Alkenspaltung mittels Lipoxygenase.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken. Meinen Labor- und Bürokollegen danke ich ausdrücklich für die gegenseitige Unterstützung und anregenden Diskussionen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung bei meiner bisherigen Ausbildung, sowie meinen Freunden für den moralischen und emotionalen Beistand während dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Produktion natürlicher Aromastoffe | 1 |
| 1.2 Alkenspaltung zur Bildung von Aromastoffen..... | 3 |
| 1.2.1 Chemische Methoden zur Alkenspaltung | 4 |
| 1.2.2 Enzymatische Methoden zur Alkenspaltung | 5 |
| 1.2.2.1 Alkenspaltung durch Oxygenasen..... | 5 |
| 1.2.2.2 Alkenspaltung durch Peroxidasen..... | 8 |
| 1.2.2.3 Alkenspaltung mittels einer Peptidase aus <i>Trametes hirsuta</i> | 9 |
| 1.3 Präkursoren, Induktoren und Elicitoren zur Anreicherung von Aromastoffen | 10 |
| 1.4 Motivation und Zielsetzung..... | 11 |
| 2 Material und Methoden..... | 12 |
| 2.1 Geräte und Chemikalien..... | 12 |
| 2.1.1 Allgemeine Geräte | 12 |
| 2.1.2 Chemikalien | 13 |
| 2.1.3 Lösungsmittel..... | 14 |
| 2.1.4 Kulturmedien..... | 14 |
| 2.1.5 Basidiomycetenstämme..... | 16 |
| 2.3 Allgemeine Methoden..... | 17 |
| 2.3.1 Kultivierung | 17 |
| 2.3.1.1 Sterilisation | 17 |
| 2.3.1.2 Stammkulturen auf SNL-Agarplatten..... | 17 |
| 2.3.1.3 Kulturführung | 17 |
| 2.3.2 Proteinchemische Assays..... | 17 |
| 2.3.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry | 17 |
| 2.3.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976)..... | 17 |
| 2.3.2.3 <i>Trans</i> -Anethol-Assay | 18 |
| 2.3.2.4 Linolsäure-Assay | 18 |
| 2.3.2.5 Glyceroloxidase-Assay | 18 |
| 2.3.2.6 Laccase-/Peroxidase-Assay | 18 |
| 2.3.2.7 Azocasein-Assay | 19 |
| 2.4 Gaschromatografie..... | 19 |
| 2.4.1 Aufarbeitung für die Gaschromatografie | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4.1.1 | Flüssig-Flüssig-Extraktion von Kulturüberständen | 19 |
| 2.4.1.2 | Flüssig-Flüssig-Extraktion von enzymatischen Umsetzungen | 19 |
| 2.4.1.3 | Tegosoft-Extraktion von lipidhaltigen Kulturüberständen | 19 |
| 2.4.2 | Durchführung der Gaschromatografie (GC) | 20 |
| 2.4.2.1 | GC mit Flammenionisationsdetektor gekoppelt mit olfaktometrischem Detektor (GC-FID/O) | 20 |
| 2.4.2.2 | GC-FID mit Autosampler: | 20 |
| 2.4.2.3 | GC mit massenselektivem Detektor (GC-MS)..... | 21 |
| 2.4.2.4 | GC-FID mit thermal desorption system (TDS-GC-FID)..... | 21 |
| 2.4.2.5 | TDS-GC mit massenselektivem Detektor (TDS-GC-MS)..... | 22 |
| 2.4.2.6 | Präparative Gaschromatografie..... | 23 |
| 2.5 | Vergleich von Nährmedien..... | 23 |
| 2.5.1 | Weiterführende Versuche mit <i>Auriporia aurulenta</i> (Aau) | 23 |
| 2.5.1.1 | Supplementierung mit L-Phenylalanin | 23 |
| 2.5.1.2 | Kultivierung von Aau in weiteren Kulturmedien..... | 24 |
| 2.5.2 | Weiterführende Versuche mit <i>Wolfiporia cocos</i> (Wco)..... | 24 |
| 2.5.2.1 | Kultivierung von Wco mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen | 24 |
| 2.5.2.2 | Kultivierung von Wco mit möglichen Furaneo®-Präkursoren..... | 24 |
| 2.5.2.3 | Elicitierung von Wco mit Methyljasmonat:..... | 24 |
| 2.5.2.4 | Kultivierung von Wco auf lipidreichen Nebenströmen..... | 24 |
| 2.6 | Versuche zu alkenspaltenden Enzymaktivitäten | 25 |
| 2.6.1 | Screening nach alkenspaltenden Aktivitäten | 25 |
| 2.6.2 | Reinigung von alkenspaltenden Aktivitäten aus <i>Pleurotus sapidus</i> | 25 |
| 2.6.2.1 | Reinigung des alkenspaltenden Enzyms mittels Fast Protein Liquid Chromatography..... | 25 |
| 2.6.2.2 | Peptidaseinhibitortest | 26 |
| 2.6.2.3 | Analytische und präparative Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 26 |
| 2.6.2.4 | Test der Lipoxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i> (<i>Echerichia coli</i>) auf alkenspaltende Enzymaktivität..... | 27 |
| 2.6.2.5 | Umsetzung von trans-Anethol mit HIC-Fraktionen in Anwesenheit von Cofaktoren. 27 | |
| 2.6.2.6 | Umsetzung von trans-Anethol mit IEX-Fraktionen in Anwesenheit von Cofaktoren . 28 | |
| 2.6.2.7 | Umsetzung von trans-Anethol mit IEX-Fraktionen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid..... | 28 |
| 2.6.2.8 | Umsetzung von trans-Anethol mit IEX-Fraktionen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und ABTS | 28 |
| 2.6.2.9 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 28 |
| 2.6.2.10 | Proteinidentifikation mittels ESI-MS/MS..... | 28 |
| 2.7 | Versuche zur Bildung von Decatrienon mittels <i>Piptoporus betulinus</i>..... | 29 |
| 2.7.1 | Kultivierung mit Glucosinolaten..... | 29 |
| 2.7.2 | Kultivierung von Pbe mit Fettsäuren | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.7.2.1 | Zugabe von Linolsäure/Linolensäure | 29 |
| 2.7.2.2 | Getrennte Zugabe von α - beziehungsweise γ -Linolensäure | 29 |
| 2.7.2.3 | Test auf Hydroperoxide nach Huber und Fröhle (1972) | 30 |
| 2.7.2.4 | Induktion mit Linolensäure/Wasserstoffperoxid | 30 |
| 2.7.3 | Lichtinduktion | 30 |
| 2.7.4 | Supplementierung von Polyketidvorstufen | 31 |
| 2.7.4.1 | Supplementierung von Malonat und Pyruvat | 31 |
| 2.7.4.2 | Supplementierung von Acetat | 31 |
| 2.7.4.3 | Supplementierung von Acetat und Induktion mit Linolensäure | 31 |
| 2.7.5 | Analyse des Pentan/Ether-Extrakt des Pbe-Myzels | 31 |
| 2.7.5.1 | Hydrolyseversuche | 32 |
| 2.7.5.2 | Umkristallisieren | 32 |
| 2.7.5.3 | Flüssigchromatografie mit Massenspektrometriekopplung (LC-MS) | 32 |
| 2.7.5.4 | Festphasenextraktion (SPE) | 33 |
| 2.7.5.5 | Präparative GC | 33 |
| 2.7.6 | Kultivierung von Pbe mit Kohleextrakten | 33 |
| 2.7.6.1 | Herstellung der fraktionierten Kohleextrakte | 33 |
| 2.7.6.2 | Kultivierung von Pbe mit fraktionierten Kohleextrakten | 33 |
| 2.7.7 | Kultivierung im Reaktor | 34 |
| 2.8 | Entsorgungshinweise | 34 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion | 35 |
| 3.1 | Effekt verschiedener Medien auf das Aromaprofil von Basidiomyceten | 36 |
| 3.1.1 | Pilz/Medium-Screening | 37 |
| 3.1.1.1 | Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Aromabildung von Aau | 38 |
| 3.1.1.2 | Einfluss von verschiedenen Medien auf das Aromaprofil von <i>Hericium erinaceus</i> ... | 47 |
| 3.1.1.3 | Einfluss von verschiedenen Medien auf das Aromaprofil von <i>Postia floriformis</i> | 50 |
| 3.1.1.4 | Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Aromabildung von <i>Wolfiporia cocos</i> | 52 |
| 3.1.2 | Lipidreiche Nebenströme | 59 |
| 3.2 | Alkenspaltende Enzymaktivitäten in Basidiomyceten | 62 |
| 3.2.1 | Screening nach alkenspaltenden Enzymaktivitäten in Basidiomyceten | 63 |
| 3.2.2 | Sequenzanalyse der Peptidase A aus <i>Trametes hirsuta</i> | 65 |
| 3.2.3 | Reinigung einer alkenspaltenden Enzymaktivität aus <i>P. sapidus</i> | 66 |
| 3.2.3.1 | Dreistufige Reinigung der alkenspaltenden Enzymaktivität | 67 |
| 3.2.3.2 | Isoelektrische Fokussierung als alternative Reinigungsstrategie | 71 |
| 3.2.4 | Biotransformation von <i>trans</i> -Anethol durch eine Lipoxygenase aus <i>P. sapidus</i> | 73 |
| 3.2.5 | Identifizierung einer LOX _{Psa1} -unabhängigen alkenspaltenden Enzymaktivität | 75 |
| 3.2.5.1 | Einfluss von Cofaktoren auf die Anethol-Umsetzung | 75 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.5.2 | Untersuchung der IEX-Fractionen auf Peroxidaseaktivität..... | 77 |
| 3.2.6 | Einordnung des Potenzials der Enzyme mit alkenspaltenden Aktivitäten aus <i>P. sapidus</i> für die industrielle Anwendung | 81 |
| 3.3 | Bildung von (5 E,7 E/Z)-Deca-5,7,9-trien-2-on mittels <i>Piptoporus betulinus</i>..... | 82 |
| 3.3.1 | Anreicherung des Decatrienons..... | 83 |
| 3.3.1.1 | Induktion mit Glucosinolaten | 83 |
| 3.3.1.2 | Supplementierung mit Linol- und Linolensäure | 83 |
| 3.3.1.3 | Supplementierung von α - und γ -Linolensäure..... | 84 |
| 3.3.1.4 | Vergleich der Blindwerte der Linolensäure-Kultivierungen..... | 85 |
| 3.3.1.5 | Lichtinduktion..... | 86 |
| 3.3.2 | Polyketid-Stoffwechsel als möglicher Geneseweg..... | 88 |
| 3.3.2.1 | Supplementierung mit Einheiten des Polyketidsynthesewegs | 89 |
| 3.3.2.2 | Kultivierung mit Acetat und Induktion durch Hydroperoxide..... | 90 |
| 3.3.3 | Identifizierung von Decatrienon-Derivaten | 90 |
| 3.3.3.1 | Hydrolyse der potenziellen Präkursoren..... | 92 |
| 3.3.3.2 | Umkristallisieren des P/E-Extraktes von <i>Pbe</i> -Myzel | 92 |
| 3.3.3.3 | Reinigung der Decatrienon-Derivate | 94 |
| 3.3.3.4 | Kultivierung mit fraktionellen Weißkohl-Extrakten | 95 |
| 3.3.3.5 | GC-Analyse der fraktionellen Kohlextrakte | 97 |
| 3.3.3.6 | Kultivierung mit unterschiedlichen Mengen an EtOAc-Extrakt..... | 99 |
| 3.3.3.7 | Kinetik der Decatrienon-Bildung in Abhängigkeit der möglichen Präkursoren..... | 100 |
| 3.3.4 | Fazit zur Decatrienon-Bildung..... | 101 |
| 4 | Ausblick..... | 103 |
| 5 | Anhang | 105 |
| 5.1 | Ergänzende Daten zur Umsetzung von Piperin mittels Lox_{Psa1} | 105 |
| 5.2 | Ergänzende Daten zur Proteinsequenzierung..... | 106 |
| 5.2.1 | Proteinsequenzierung nach der pIEF | 106 |
| 5.2.2 | Proteinsequenzierung nach der IEX | 107 |
| 5.2.3 | Proteinsequenzierung nach der Peroxidasefärbung | 111 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 114 |
| 7 | Lebenslauf..... | 128 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| Bis-Tris | 2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2"-nitrilotriethanol |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BLOSUM | <i>Blocks Substitution Matrix</i> |
| BSTFA | <i>N,O-Bistrimethylsilyltrifluoracetamid</i> |
| CBS | <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> |
| CEF | <i>Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids</i> |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| dH ₂ O | Destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EG | Europäische Gemeinschaft |
| EFSA | Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>European Food and Safety Authority</i>) |
| EtOH | Ethanol |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FPLC | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> |
| GC | Gaschromatograf |
| HE | Hefeextrakt |
| HIC | Hydrophobe Interaktionschromatografie |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IEX | <i>Ion Exchange Chromatography</i> |
| IfmH | Institut für Molekulare Holzbiotechnologie |
| KAS | Kaltaufgabesystem |

| | |
|-----------------|--|
| KI | Kovats-Index |
| LC | <i>Liquid Chromatography</i> |
| M | Molar (mol L ⁻¹) |
| MeOH | Methanol |
| MM | Minimalmedium |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | <i>Molecular Weight</i> |
| m/z | Masse-Ladungsverhältnis |
| NADH | <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> |
| NADPH | <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| n. d. | Nicht detektiert |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| ODP | <i>Olfactory detection port</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| P/E | Pentan/Diethylether (1:1,12) |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| rel. Intensität | relative Intensität |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | <i>Sodium Dodecylsulfate</i> |
| SEC | <i>Size Exclusion Chromatography</i> |
| SNL | Standardnährlösung |
| TDS | Thermodesorptionseinheit |
| TMCS | Trimethylchlorsilan |
| v/v | <i>Volume by volume</i> (Volumenkonzentration) |
| w/v | <i>Weight by volume</i> (Massenkonzentration) |
| UV | Ultraviolett |

1 Einleitung

Natürliche Aromastoffe rückten in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Öffentlichkeit. Der Rechtsstreit zwischen Stiftung Warentest und Ritter-Sport in den Jahren 2013/2014 offenbarte die Sensibilität der Medien für dieses Thema (Roth, 2015). Dabei ging es um die Behauptung von Stiftung Warentest, den „chemisch hergestellten Aromastoff Piperonal“ in einer Schokolade von Ritter-Sport nachgewiesen zu haben. Das Interesse der Medien spiegelt wider, wie wichtig dem Verbraucher heutzutage der Einsatz natürlicher Rohstoffe und die Transparenz bei Lebensmitteldeklarationen sind.

1.1 Produktion natürlicher Aromastoffe

Ursprünglich wurden Aromen durch Extraktion aus Pflanzen gewonnen. Diese Methode ist allerdings mit Hindernissen wie hohen Kosten und limitierten Ressourcen verbunden. Deshalb ging man in der Vergangenheit dazu über, Schlüsselaromastoffe für bestimmte Geruchseindrücke zu identifizieren und diese auf chemischem Wege zu synthetisieren. Intensive Forschungsbemühungen führten zu rentablen Ausbeuten bei niedrigen Produktionskosten. Jedoch erfordern chemische Synthesen meist harsche Bedingungen wie hohe Drücke und Temperaturen und/oder toxische Katalysatoren. Weiterhin führt eine fehlende Regio- und Enantioselektivität meist zu Produktgemischen.

Der steigende Wettbewerb, Veränderungen in der Lebensmittelkennzeichnung sowie ein gewandeltes Verbraucherverhalten haben in den vergangenen Jahren bei der Industrie ein erhöhtes Interesse an der kostengünstigen Produktion von natürlichen Aromastoffen ausgelöst (siehe Abbildung 1). Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, nutzt die Aromaindustrie vermehrt biotechnologische Prozesse. Diese vereinen die Vorteile der meist hochselektiven enzymatischen Reaktionen (Chemo-, Regio- und Stereoselektivität) mit denen der Verwendung von natürlichen Rohstoffen. Aus der Nutzung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie wie beispielsweise Rapspresskuchen resultieren umweltfreundliche und nachhaltige Prozesse. Im Laufe der Evolution wurden existierende biologische Systeme hinsichtlich der Metabolisierung von organischen Molekülen optimiert. Diese werden in biotechnologischen Prozessen zur effektiven Synthese von Aromastoffen genutzt. In der Regel werden Geruchsintensität und -qualität von der Stereochemie beeinflusst (Nörenberg *et al.*, 2013). Deshalb ist ein durch enzymatische Reaktionen entstehendes isomerenreines Produkt von großer Bedeutung (Bicas *et al.*, 2016).

Die weiße Biotechnologie wird derzeit intensiv beforscht. Die heutige Biotechnologie umfasst Möglichkeiten der molekularen Biologie mit innovativen Technologien wie *functional genomics*, *proteomics* sowie *protein-* und *metabolic engineering*. Durch das Exprimieren von Enzymen in modernen Wirtssystemen können Aromastoffe kostengünstig in großen Maßstäben produziert

werden. Auch in der Bioprozesstechnik werden immer weitere Strategien beispielsweise zur *in-situ*-Produktabtrennung entwickelt, was für einen Fortschritt der biotechnologischen Erzeugung von Aromastoffen von großer Bedeutung sein wird.



Abbildung 1: Treibende Kräfte für den Einsatz von biotechnologischen Methoden nach Schrader (2007).

Natürliche Aromastoffe sind in der Europäischen Union rechtlich geregelt. Nach der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 müssen natürliche Aromastoffe „[...] natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen [...]“ worden sein. Sie müssen „[...] durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen [...]“ worden sein. Die zugelassenen Verfahren sind in Anhang II der Verordnung aufgelistet (siehe Tabelle 1). Da sich darunter auch mikrobiologische Prozesse befinden, bietet sich hier eine Option für eine kostengünstigere, umweltschonendere und nachhaltigere Produktion natürlicher Aromastoffe. Diese können, wie in der vorliegenden Arbeit, mittels Basidiomyceten oder anderen Mikroorganismen aus natürlichen Ausgangsstoffen hergestellt werden.

Derzeit sind 2.544 Aromastoffe in der Positivliste im Anhang I (Stand: Mai 2016) der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 gelistet. Die Risikobewertung der Aromastoffe unterliegt der Zuständigkeit des *Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids* (CEF) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA). Chemisch ähnliche Stoffe werden in Gruppen eingeteilt (*Flavouring Group Evaluations*). Diese werden hinsichtlich der Aufnahmemengen, der Absorption, der Metabolisierung und der Toxizität der einzelnen Stoffe bewertet. Die EFSA beurteilt bei Bedarf auch die Unbedenklichkeit einzelner Aromastoffe, wie es für Campher und Cumarin umgesetzt wurde (EFSA-Meinungen, 2008).

Tabelle 1: Liste herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (Anhang II der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008).

| | |
|--|----------------------------|
| Zerhacken | Überziehen |
| Erhitzen, Kochen, Backen, Braten (bis 240 °C bei atmosphärischem Druck) und Druckkochen (bis 120 °C) | Kühlen |
| Schneiden | Destillation/Rektifikation |
| Trocknen | Emulgieren |
| Verdampfen Extraktion, einschließlich Lösemittelextraktion gemäß der Richtlinie 88/344/EWG | Vergären |
| Filtern | Zermahlen |
| Aufgießen | Mazeration |
| mikrobiologische Prozesse | Mischen |
| Schälen | Perkolation |
| Auspressen | Einkühlen/Einfrieren |
| Rösten/Grillen | Ausdrücken |
| Einweichen | |

Die EFSA bewertet, wie zuvor erläutert, zum einen Aromastoffe, welche sich bereits auf dem Markt befinden. Zum anderen erfolgen Prüfungen von Anträgen auf die Zulassung neuer Aromen durch die EFSA. Welche Daten für eine Unbedenklichkeitsprüfung vorzulegen sind, wurde in Leitlinien festgelegt. Sie umfassen Informationen zur Identität der Ausgangsstoffe, zum Herstellungsverfahren sowie eine Abschätzung der ernährungsbedingten Exposition und toxikologische Daten.

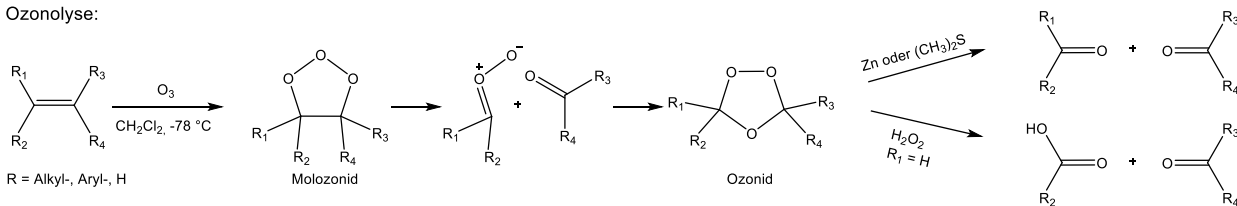
1.2 Alkenspaltung zur Bildung von Aromastoffen

Die Gewinnung von flüchtigen, aromaaktiven Substanzen erfolgt wie beschrieben nicht nur durch die traditionelle Pflanzenextraktion, sondern auch durch chemische Synthesen oder biotechnologische Prozesse. Bei den Aromastoffen handelt es sich meist um Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester oder Aromaten, welche durch verschiedenste Reaktionen generiert werden können. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Alkenspaltung gelegt. Diese oxidative Spaltung von C=C-Doppelbindungen ist eine häufig eingesetzte Methode in der organischen Chemie. Das Besondere dabei ist, dass sowohl die π -Bindung als auch die σ -Bindung gebrochen werden muss. Durch Alkenspaltungen können Oxyfunktionen in Moleküle eingeführt und komplexe Substrate gespalten werden. Ein Überblick über den aktuellen Stand der chemischen und enzymatischen Methoden wird nachfolgend dargestellt.

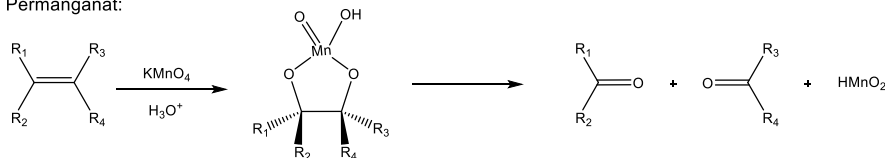
1.2.1 Chemische Methoden zur Alkenspaltung

Zur Herstellung von natürlichen Aromastoffen nach VO (EG) Nr. 1334/2008 kommen chemische Methoden zur Alkenspaltung nicht in Frage. Sie sollen daher an dieser Stelle lediglich kurz beschrieben werden. Für die chemische Alkenspaltung sind zahlreiche Methoden bekannt. Klassischer Weise wird mittels Ozonolyse die C=C-Doppelbindung gespalten, um Aldehyde oder Ketone zu erzielen (Criegee, 1975; Van Ornum *et al.*, 2006). Dabei wird im ersten Schritt Ozon an das Alkan addiert, wodurch das instabile Molozonid entsteht (siehe Abbildung 2, oben). Dieses reagiert sofort zum stabileren Ozonid weiter. Unter reduktiven Bedingungen wie mit Zink oder Dimethylsulfid entstehen Ketone oder Aldehyde. Durch die alternative Spaltung mit Wasserstoffperoxid entstehen dagegen Ketone oder Carbonsäuren, da resultierende Aldehyde sofort zur Carbonsäure weiteroxidiert werden. Dieser Syntheseweg stellt jedoch aufgrund der explosiven Intermediate ein erhöhtes Sicherheitsrisiko dar. Des Weiteren kann eine Alkenspaltung durch Dihydroxylierung und nachfolgender oxidativer Glycolspaltung verwirklicht werden. Dies erfordert allerdings meist entweder umweltschädliche Oxidationsmittel oder toxische Metallkatalysatoren. Mittels Kaliumpermanganat werden Alkene beispielsweise beim Erhitzen oder in saurer Lösung zu den entsprechenden Ketonen und Carbonsäuren gespalten (Lai und Lee, 2001). Hierbei wird ein zyklischer Manganester gebildet, welcher unter diesen Bedingungen instabil ist, weshalb die Spaltung der C-C-Bindung erfolgt (siehe Abbildung 2, Mitte). Alternativ können Alkene mit Hilfe von RuO₂ oder RuCl₃ als Katalysatoren und einem Oxidationsmittel wie Oxon oder NaIO₄ gespalten werden (Okumoto *et al.*, 2007; Yang und Zhang, 2001). Durch *in-situ* generiertes RuCl₄ erfolgt die *cis*-Hydroxylierung der Doppelbindung, wobei nach der Bindungsspaltung eine Oxidation des Aldehyden zur Carbonsäure durch geeignete Reaktionsbedingungen verhindert werden kann. Weitere Alkenspaltungen sind mittels Osmiumtetroxid, Titanzeolith, Palladium oder Gold möglich (Adam *et al.*, 1996; Pappo *et al.*, 1956; Travis *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2006). Mittels Osmiumtetroxid kann die C=C-Doppelbindung dihydroxyliert werden (siehe Abbildung 2, unten). NaIO₄ oxidiert Os(VI) wieder zu Os(VIII) und spaltet das Glycol zu den entsprechenden Aldehyden beziehungsweise Ketonen. Aufgrund zahlreicher Nebenprodukte sind die erzielten Ausbeuten allerdings oftmals nur gering (Yu *et al.*, 2004).

Ozonolyse:



Permanganat:



Osmiumtetroxid:

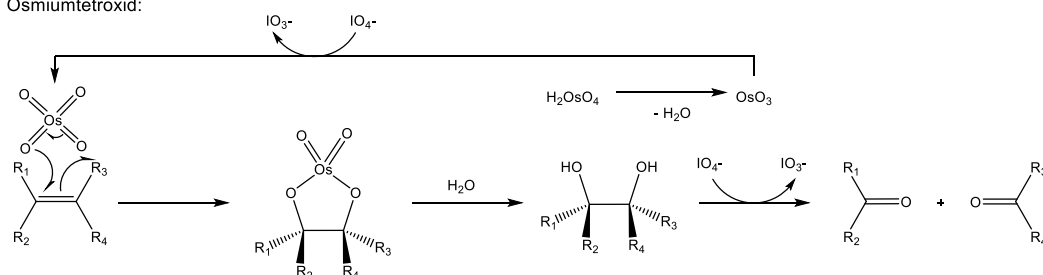


Abbildung 2: Beispiele für chemische Methoden der Alkenspaltung.

1.2.2 Enzymatische Methoden zur Alkenspaltung

Wie im ersten Teil dieses Kapitels dargelegt, gehen mit der chemischen Alkenspaltung Probleme wie die Bildung explosiver Intermediate oder die Verwendung toxischer Katalysatoren einher. Weiterhin führte die steigende Nachfrage nach natürlich synthetisierten Produkten zu einer verstärkten Forschung hinsichtlich enzymatischer Methoden zur Alkenspaltung. Biotechnologische Prozesse haben den Vorteil, dass sie meist unter sicheren und milderen Reaktionsbedingungen ablaufen. Oftmals können komplexe Substrate zur Umsetzung zugänglich gemacht werden. Ferner weisen enzymatische Umsetzungen meist Chemo-, Regio- und Stereospezifität auf. Enzyme besitzen außerdem die Fähigkeit, molekularen Sauerstoff zu aktivieren und die Alkenspaltung bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck in wässrigen Systemen durchzuführen. Dabei wird der Sauerstoff je nach Enzym nach einem unterschiedlichen Mechanismus in das Molekül eingeführt. In der Literatur wurden bisher Oxygenasen, Peroxidasen und eine Peptidase mit alkenspaltenden Aktivitäten beschrieben.

1.2.2.1 Alkenspaltung durch Oxygenasen

Oxygenasen sind eine heterogene Enzymklasse, welche verschiedene Reaktionen katalysieren. Die bisher identifizierten Mono- und Dioxygenasen katalysieren eine Alkenspaltung nur mit schlechten Ausbeuten und weisen eine sehr hohe Substratspezifität auf (Sono *et al.*, 1996). Durch hohe Substratspezifitäten wird das Anwendungsgebiet stark eingeschränkt. Es sind substratspezifische Enzyme wie die Häm-abhängige Tryptophan-2,3-dioxygenase publiziert (Sono

et al., 1996). Sie katalysiert die Spaltung an der C=C-Doppelbindung des Pyrrolrings des L-Tryptophans. Durch Einführung beider Sauerstoffatome des molekularen Sauerstoffs resultiert N-Formyl-L-kynurenin. Ähnlich erfolgt die Katalyse durch die Indolamin-2,3-dioxygenase. Es wurden verschiedene Reaktionsmechanismen postuliert, von denen die zwei plausibelsten in Abbildung 3 aufgezeigt werden. Dabei erfolgt nach dem historischen Mechanismus (oben) eine elektrophile Addition einer aktivierten Eisen(II)-dioxo-Spezies an das C 3 des Indolrings (2), worauf eine Criegee-Umlagerung oder eine intermediäre Bildung von Dioxetan erfolgt (Chauhan *et al.*, 2009). Nach neueren Studien von Lewis-Ballester *et al.* (2009) erfolgt dagegen eine direkte radikalische Addition an C 2 des Indolrings (4), gefolgt von einer homolytischen O-O-Spaltung (unten). Nach Bildung des 2,3-Epoxides (5) und Ringöffnung schließt sich ein erneuter Angriff an C 2 des Indolrings an. Durch intramolekulare Umlagerungen kommt es schließlich zur Spaltung (3).

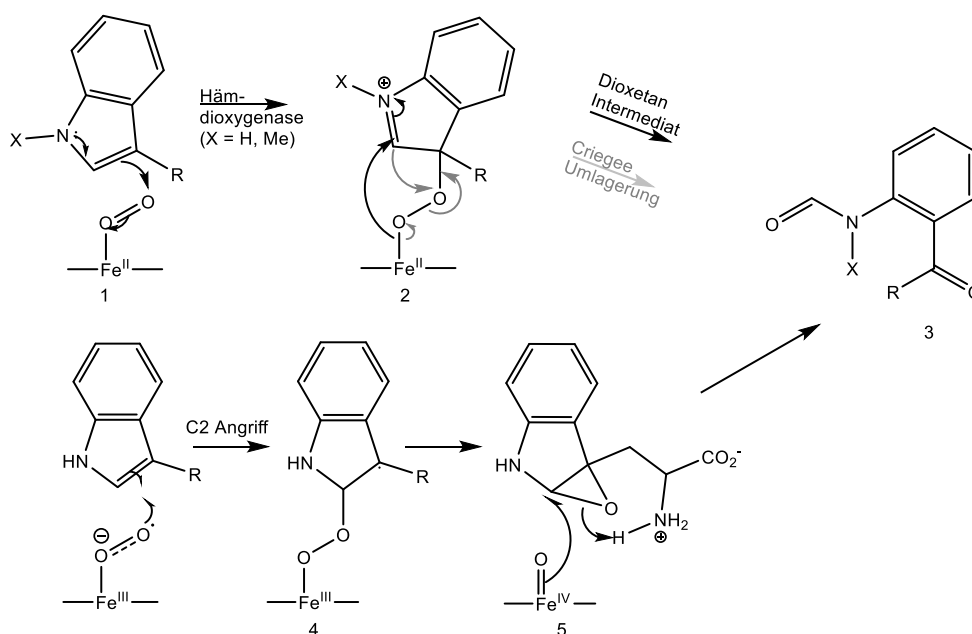


Abbildung 3: Alkenspaltung mittels Tryptophan-2,3-dioxygenase. Oben: Mechanismus nach Chauhan *et al.* (2009), unten: Mechanismus nach Lewis-Ballester *et al.* (2009).

Catecholdioxygenasen katalysieren die oxidative Spaltung von (substituierten) Catecholen, was bei Bakterien eine wichtige Rolle beim Abbau von aromatischen Substanzen spielt (Bugg und Winfield, 1998). Dabei spalten Intradioldioxygenasen die C=C-Doppelbindungen zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen, während Extradioldioxygenasen die C=C-Doppelbindung neben einer phenolischen Hydroxylgruppe spalten. In beiden Fällen resultiert eine Öffnung des aromatischen Rings.

Die weit verbreiteten Carotinoid-spaltenden Oxygenasen katalysieren die Spaltung der C=C-Doppelbindung von Carotinoiden zu Apocarotinoiden (Auldrige *et al.*, 2006; Kloer und Schulz, 2006). Die Spaltung findet entweder an der zentralen C=C-Doppelbindung oder weiter außen statt. Bislang ist nicht eindeutig belegt, ob es sich um Monooxygenasen oder Dioxygenasen

handelt (Harrison und Bugg, 2014; Leuenberger *et al.*, 2001). Leuenberger *et al.* (2001) postulierten für die Spaltung an C 15-C 15' einen Monooxygenase-Mechanismus, bei dem zunächst die zentrale Doppelbindung epoxidiert wird. Eine unspezifische Ringspaltung durch Wasser und anschließende Diolsplaltung resultiert in den entsprechenden Aldehyden (siehe Abbildung 4). Bei der Spaltung von Carotinoiden beziehungsweise Apocarotinoiden entstehen viele für die Aromaindustrie interessante aromaaktive Produkte, weshalb dieses Gebiet intensiv beforscht wird. Bisher wurden allerdings zu geringe Ausbeuten für industrielle Applikationen erzielt.

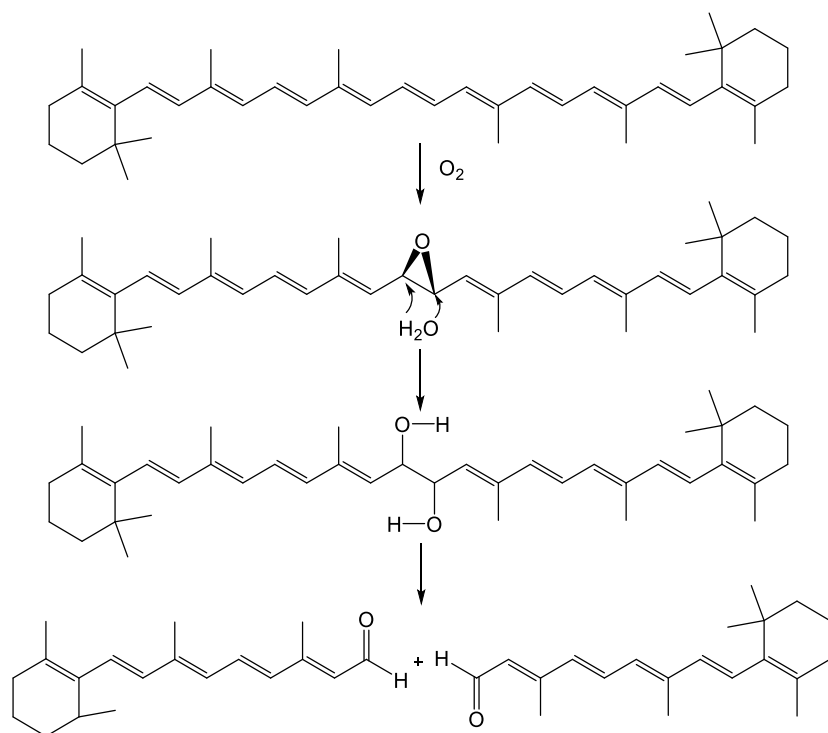


Abbildung 4: Postulierter Mechanismus für die Spaltung von β -Carotin nach Leuenberger *et al.* (2001).

Als weitere alken-spaltende Oxygenasen sind die Stilben- α - β -Oxygenase und die Isoeugenol-Oxygenase bekannt. Die Stilben- α - β -Oxygenase benötigt Substrate in *trans*-Konfiguration und eine Hydroxylgruppe in *para*-Position am aromatischen Ring. Dementsprechend besitzt sie ein enges Substratspektrum. Für die Isoeugenol-Oxygenase wurde ein Monooxygenase-Mechanismus postuliert (Yamada *et al.*, 2007).

Weiterhin ist eine zweistufige Spaltung von ungesättigten Fettsäuren mittels Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase möglich. In einem ersten Schritt wird dabei molekularer Sauerstoff durch eine Lipoxygenase (aus Soja) aktiviert und der Angriff an der Doppelbindung ermöglicht. Anschließend wird das Hydroperoxid-Intermediat durch eine Fettsäurehydroperoxidlyase (aus Paprika) gespalten und es werden die entsprechende Aldehyde freigesetzt (Bourel *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Alkenspaltung durch Peroxidasen

Peroxidasen sind in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren zu finden und besitzen meist ein Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe. Des Weiteren existieren Peroxidasen mit anderen Cofaktoren wie zum Beispiel Selen (Glutathion-Peroxidase (Flohe *et al.*, 1979)) oder Mangan (Manganperoxidase). Allgemein katalysieren Peroxidasen die Oxidation von Substanzen mittels Peroxiden. Dabei sind diverse chemische Reaktionen wie Peroxidase-, Peroxygenase- und Oxidasereaktionen möglich. Weiterhin besitzen Peroxidasen ein breites Substratspektrum (darunter Phenole, aromatische und Alkylamine, NAD(P)H, H₂O₂, Thioether, Aldehyde). Die Alkenspaltung ist jedoch meist nur eine Seitenaktivität (Adam *et al.*, 1999).

Eine Chlorperoxidase (CPO) aus *Caldariomyces fumago* katalysiert die Oxidation von konjugierten Dienestern. Dabei findet die Alkenspaltung als Seitenreaktion in Anwesenheit von *tert*-Butylhydrogenperoxid und Sauerstoff statt. In Abhängigkeit der Stereochemie kann die Alkenspaltung gegenüber der allylischen Oxidation bevorzugt ablaufen. Als Mechanismus (siehe Abbildung 5) wurde die Bildung eines intermediären Radikalkations postuliert (2), welches durch direkten Elektronentransfer von Methyl-(2*Z*,4*Z*)-hexadienoat (1) auf das Häm-Eisen (Eisen-V-Oxoverbindung) der Peroxidase entsteht. Durch Reaktion mit Sauerstoff bildet sich ein Dioxetan (3), woraus sich das Spaltprodukt (4) bildet (Bougioukou und Smonou, 2002; Mutti, 2012).

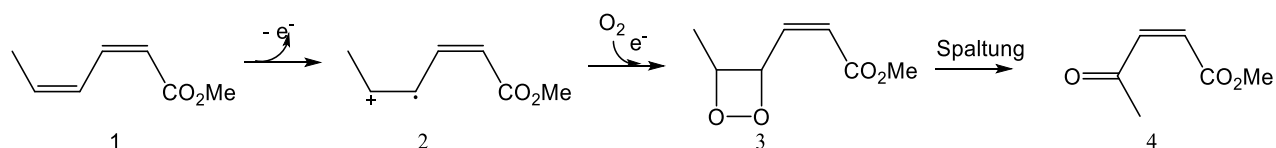


Abbildung 5: Hypothetischer Mechanismus für die aerobe Alkenspaltung durch eine CPO (Bougioukou und Smonou, 2002).

Ling und Sayre (2005) beobachteten die Spaltung von 3-Methylindol und 3-Ethylindol durch die Meerrettichperoxidase (HRP) zu den entsprechenden *ortho*-Acylformaniliden und Oxindolen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Es wurde im ersten Schritt eine Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch die HRP postuliert (siehe Abbildung 6). Auf die Bildung eines Hydroperoxides (9) durch Sauerstoff folgt die Spaltung zu den entsprechenden Carbonylen (10). Die Spaltung von *trans*-Anethol mittels HRP wurde ebenfalls publiziert (Mutti *et al.*, 2010), wobei neben *para*-Anisaldehyd als Seitenprodukt auch das vicinale Diol entstand. Weitere Substrate wurden nur mit geringen Produktausbeuten umgesetzt.

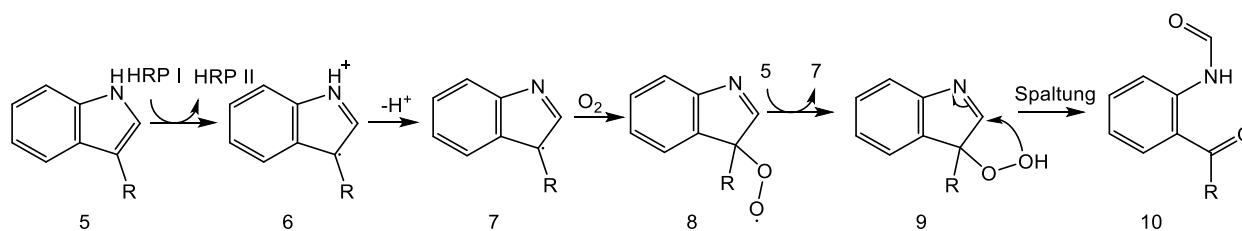


Abbildung 6. Postulierter Mechanismus für die aerobe Spaltung von Indolen durch HRP nach Ling und Sayre (2005). R = Methyl- oder Ethylrest.

Des Weiteren sind eine Myeloperoxidase und eine Peroxidase aus *Coprinus cinereus* in der Lage, Styrol-Derivate zu substituierten Benzaldehyden zu spalten. Allerdings wurden ebenfalls nur niedrige Ausbeuten erzielt (Tuyman *et al.*, 2000).

Hajnal *et al.* (2015) publizierten ein manganabhängiges Enzym mit alkenspaltender Aktivität aus *Thermotoga maritima*. Es handelte sich dabei um ein Metalloprotein mit Cupin-Faltung. Die Cupin-Superfamilie umfasst eine Gruppe von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen, welche eine charakteristische, hochkonservierte β -barrel Domäne besitzen. Das Gen für dieses Protein wurde in *Escherichia coli* exprimiert. Auf diese Weise wurde 76 % Umsetzung von 4-Chlor- α -methylstyren zu 4-Chloracetophenon in einem Zweiphasensystem und in Anwesenheit von *tert*-Butylhydroperoxid und Sauerstoff erzielt. Ein Mechanismus der Alkenspaltung ist bislang nicht veröffentlicht worden.

1.2.2.3 Alkenspaltung mittels einer Peptidase aus *Trametes hirsuta*

Aus dem Basidiomycet *Trametes hirsuta* wurde eine Mn³⁺-abhängige Peptidase (Accession KC905051.1) mit der Fähigkeit, Alkene zu spalten, identifiziert (Rajagopalan *et al.*, 2013a). Das Enzym (412 Aminosäuren, 44639 Da) ist in der Lage, in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und Mn³⁺ die aliphatische Doppelbindung von *trans*-Anethol und anderen Vinylaromaten zu spalten. Bei Aspartat-Peptidasen sind normalerweise zwei Asparaginsäure-Reste im katalytischen Zentrum für deren Funktionalität von Bedeutung. Daneben postulierten Rajagopalan *et al.* (2013a) eine zusätzliche Beteiligung von Threonin an der Komplexierung von Mn³⁺, welche für die Alkenspaltung notwendig ist. Ein detaillierter Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung wurde bislang nicht veröffentlicht.

1.3 Präkursoren, Induktoren und Elicitoren zur Anreicherung von Aromastoffen

Die biotechnologische Bildung von Aromastoffen geht oft mit geringen Produktkonzentrationen einher. Dies kann beispielsweise durch Substratlimitierung, Produktinhibierung oder durch Regulationsmechanismen des Organismus verursacht werden. Eine Identifizierung von Substraten beziehungsweise Präkursoren ist demnach die Grundlage zur Erzielung höherer Produktkonzentrationen. Durch gezielte Supplementierung kann dann genügend Substrat zur Verfügung gestellt werden. Eine Inhibierung kann durch *in-situ*-Abtrennung der Produkte verhindert werden. Ferner werden Mikroorganismen wie Pflanzen und Tiere durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen gesteuert. Dabei spielen Induktoren und Elicitoren eine wichtige Rolle.

Unter Induktoren versteht man Substanzen, welche die Transkription von regulierten Genen steigern. Die Expression vieler katabolischer Enzyme wird beispielsweise erst bei Anwesenheit des entsprechenden Substrats induziert. Bei Pilzen sind verschiedene Induktoren bekannt. So ist die Induktion von Laccasen in Basidiomyceten durch Kupfer oder phenolische Substanzen möglich (Elisashvili *et al.*, 2010; Valle *et al.*, 2014). In *Pleurotus sajor-caju* wurde beispielsweise eine Induktion von Laccasen durch Ferulasäure beschrieben (Zucca *et al.*, 2011).

Elicitoren lösen bereits in geringen Konzentrationen Abwehrmechanismen aus (Baenas *et al.*, 2014). Sie bewirken physiologische Änderungen in Pflanzen, was eine Reaktionskaskade aktiviert. Elicitoren sind hauptsächlich in der Pflanzenphysiologie bekannt und erforscht. Sie werden in biotische und abiotische Substanzen unterteilt. Zu den biotischen Elicitoren gehören Lipopolysaccharide, Polysaccharide wie Pectin und Zellulose, Proteine wie Cellulasen oder Glycoproteine. Außerdem werden zu den biotischen Elicitoren auch komplexe Gemische wie Pilzsporen oder Zellwände von Mikroorganismen und pathogene Toxine gezählt. Die wichtigsten abiotischen Elicitoren sind Metallionen und Oxalate. Außerdem gehören die Pflanzenhormone Jasmonsäure, Methyljasmonat, Methylsalicylat, Salicylsäure und Ethylen ebenfalls zu den Elicitoren. Jasmonsäure reguliert bei einigen Pflanzen neben der Samenkeimung und des Wurzelwachstums auch den Sekundärmetabolismus, so wird etwa die Bildung von Alkaloiden, Terpenoiden und phenolischen Substanzen angeregt (Goossens *et al.*, 2003; Wasternack und Hause, 2013). Es gibt jedoch auch Pilze, welche beispielsweise durch Phytohormone beeinflusst werden. Dies ist naheliegend, da Pilze oft in symbiotischen Lebensgemeinschaften vorkommen, und diese durch die Abgabe solcher Effektoren beeinflusst werden können. Es sind bereits einige Elicitoren für Pilze wie Pektin oder Mannan beschrieben (Radman *et al.*, 2003). Aufgrund der geringen Zahl an Publikationen zur Elicitierung in Pilzen wurde ein möglicher Mechanismus bislang nur von Radman *et al.* (2003) anhand der bisher ermittelten Informationen in Pilzen postuliert. Danach wird nach Kontakt des Elicitors mit einem Membranrezeptor eine Signaltransduktion ausgelöst, welche in der Transkription der für die Abwehrreaktion verantwortlichen Gene resultiert.

Vanhulle *et al.* (2007) zeigten außerdem, dass bei *Pycnoporus sanguineus*, *Coriolopsis polyzona* und *Pleurotus ostreatus* eine Kombination aus Mannan-Oligosacchariden als Elicitor und Ferulasäure als Induktor zu einer maximalen Produktion an Laccasen führt. Durch gezielten Einsatz der Präkursoren, Induktoren sowie Elicitoren kann somit eine Anreicherung von Aromastoffen erzielt werden.

1.4 Motivation und Zielsetzung

Die Relevanz von biotechnologisch produzierten natürlichen Aromastoffen wurde einleitend bereits erläutert. Voraussetzung für die Entwicklung rentabler biotechnologischer Prozesse ist ein umfassendes Wissen über die entsprechenden Aromastoffe und deren möglichen Biogenesewege. Dies umfasst zum einen die Auswahl geeigneter Ausgangssubstrate, wie auch die Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Schlüsselenzymen. Die Identifizierung neuer, biotechnologisch herstellbarer Aromastoffe aus nachhaltigen Prozessen ist weiterhin für die stetig wachsende Nachfrage an natürlichen Aromastoffen von Bedeutung.

Aus diesem Grunde waren die Ziele dieser Arbeit, die Aromastoffbildung von Basidiomyceten zu untersuchen sowie Aromastoffe durch Supplementierung mit Präkursoren, Elicitoren oder Geninduktoren anzureichern. Im ersten Teil sollte dazu ein Pilz/Medium-Screening durchgeführt werden. Es sollten Basidiomyceten identifiziert werden, welche in verschiedenen Medien ein besonderes Potenzial zur Bildung von Aromastoffen besitzen. Bei ausgewählten Basidiomyceten sollten dann lipidreiche Nebenströme der Lebensmittelindustrie als Nährmedium eingesetzt werden, um deren Einfluss auf das Aromaprofil zu untersuchen.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte sich mit der enzymatischen Alkenspaltung mittels Basidiomyceten beschäftigen. Wie in Kapitel 1.2 dargelegt, existieren bislang hauptsächlich chemische Methoden zur Alkenspaltung. Es sind zwar auch mehrere enzymatische Systeme publiziert, jedoch handelt es sich meist um Seitenaktivitäten. Die Intention war, einen neuen effektiveren Weg zur direkten enzymatischen Alkenspaltung zu identifizieren. Dafür sollte zunächst ein Screening durchgeführt werden. Dabei sollte ein geeigneter Induktor zu Hilfe genommen werden, um eine mögliche Geninduktion der entsprechenden Enzyme zu bewirken. Bei erfolgreicher Suche sollte die entsprechende Enzymaktivität gereinigt und charakterisiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollte das in Submerskulturen von *Piptoporus betulinus* identifizierte (5 E, 7 E/Z)-Deca-3,7,9-trien-2-on (Decatrienon) untersucht und ein möglicher Biogeneseweg aufgeklärt werden. Dabei galt es, zunächst das Decatrienon mittels Supplementierung von möglichen Ausgangssubstanzen oder Induktoren anzureichern. Im zweiten Schritt sollten Informationen über mögliche Präkursoren zur Aufklärung des Biogenesewegs gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Geräte

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 gelisteten Geräte eingesetzt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

| Gerät | Typ | Hersteller |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Autoklav | Varioklav 75S | H+P Labortechnik (Oberschleißheim) |
| | 5075 ELV | Systemec (Wettenberg) |
| Fotometer | UV 1650 PC | Shimadzu (Duisburg) |
| IEF-Flachbettssystem | Multiphor II Multidrive XL | Pharmacia LKB (Schweden) |
| Inkubator | Certomat HK | B. Braun (Melsungen) |
| | BE 500 | Memmert (Schwabach) |
| Lyophilisator | VaCo2 | Zirbus Technology (Bad Grund) |
| Magnetrührer | MR 3001 | Heidolph (Kelheim) |
| | Variomag® | H+P Labortechnik (Oberschleißheim) |
| pH-Meter | UB-5 | Denver Instruments (Denver, USA) |
| | GPHR 1400 | NeoLab (Heidelberg) |
| Pipetten | Transferpette® | Brand (Wertheim) |
| Schüttler | Multitron | Infors (Einsbach) |
| SDS-PAGE | Mini PROTEAN® Tetra System | Bio-Rad (München) |
| Sterile Werkbank | Clean Air CA RE 4 | Clean Air (Hilden) |
| Thermoschüttler | Thermomixer comfort | Eppendorf (Hamburg) |
| Ultraschallbad | RK 100 H | Bandelin electronic (Berlin) |

| Gerät | Typ | Hersteller |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Ultraturrax | TP-18/10 | IKA Labortechnik (Staufen) |
| Vakuumzentrifuge | Concentrator plus | Eppendorf (Hamburg) |
| Vortex | Genie 2 | Scientific Industries (New York, USA) |
| Waage | SI-234 | Denver Instruments (Denver, USA) |
| Wasseraufbereiter | GenPure UC-TOC/UF | TKA (Niederelbert) |
| Wasserbad | SW22 | Julabo (Seelbach) |
| Zentrifuge | Rotana 460R | Hettich (Tuttlingen) |
| | Rotana 380 R | Hettich (Tuttlingen) |
| | Mikro R200 R | Hettich (Tuttlingen) |
| | Mikro Star 17R | VWR (Darmstadt) |

2.1.2 Chemikalien

Neben den in Tabelle 3 aufgelisteten Substanzen wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in der benötigten Reinheit von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), VWR (Hannover), Roth (Karlsruhe), Th. Geyer (Renningen) und LAT (Hannover) erworben.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

| Chemikalie | Qualität | Hersteller |
|--|-----------------------|---------------------|
| Brenztraubensäure Natriumsalz | 99 % | Sigma-Aldrich |
| D-Fructose-1,6-diphosphatnatriumsalzoctahydrat | 99 % | Fluka |
| L-(+)-Rhamnose-Monohydrat | Für die Bakteriologie | Merck |
| Linolensäure (Isomerenmischung) | Für die GC | Roth |
| Linolsäure | 99 % | Sigma-Aldrich |
| L-Phenylalanin | 98,5 % | Roth |
| Malonsäure-Dinatriumsalz Monohydrat | Purum, 99 % | Fluka/Sigma-Aldrich |
| Methyljasmonat | 99 % | Sigma-Aldrich |
| n-Undecan | purum, 97% GC | Fluka/Sigma-Aldrich |

| Chemikalie | Qualität | Hersteller |
|------------------------|----------|---|
| Piperin | ≥ 97 % | Sigma-Aldrich |
| <i>Trans</i> -Anethol | 99 % | Aldrich-Aldrich |
| Zimtsäure | > 99% | Sigma-Aldrich |
| Zimtsäuremethylester | > 99% | Sigma-Aldrich |
| α -Linolensäure | ≥ 98 % | Cayman Chemical Company (Tallin, Estland) |
| γ -Linolensäure | ≥ 98 % | Cayman Chemical Company (Tallin, Estland) |

2.1.3 Lösungsmittel

Die in der Gaschromatografie verwendeten Lösungsmittel wurden vor der Verwendung destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden in den angegebenen Qualitäten eingesetzt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Lösungsmittel.

| Lösungsmittel | Qualität | Hersteller |
|---------------|------------------------|--|
| Acetonitril | HPLC-MS | Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich) |
| Diethylether | HPLC, redestilliert | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Ethanol | 96%, redestilliert | KWST (Hannover) |
| Methanol | HPLC, redestilliert | SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich) |
| MTBE | HPLC, redestilliert | Sigma-Aldrich (Taufkirchen), |
| n-Hexan | HPLC-MS, redestilliert | SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich) |
| Pentan | HPLC, redestilliert | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Wasser | HPLC-MS | J. T. Baker (Deventer, Niederlande) |

2.1.4 Kulturmedien

Zur Stammhaltung und Kultivierung der Basidiomyceten wurde eine modifizierte Standardnährlösung (SNL) nach Sprecher (1959) eingesetzt. Die genauen Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in Tabelle 5 dargestellt.

Alle Medien wurden mit dH₂O aufgefüllt und mit 1 N NaOH auf pH 6 eingestellt, mit Ausnahme des Hefe-Malzextrakt-Mediums (YM-Medium, pH 6,2) und des Malzextrakt-Sojapepton-Mediums (MS-Medium, pH 5,6). Für die Kultivierung im Fermenter wurde Minimalmedium (MM) 1 mit Zusatz von 20 g L⁻¹ lyophilisiertem Kohlschnitt und 0,1 mL L⁻¹ Antischaummittel eingesetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

| | Glucose x H ₂ O (g L ⁻¹) | Aspar- agin x H ₂ O (g L ⁻¹) | Aspara- gin- säure (g L ⁻¹) | Hefeex- trakt (HE, g L ⁻¹) | NH ₄ NO ₃ (g L ⁻¹) | KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹) | MgSO ₄ (g L ⁻¹) | Spuren- ele- mente** (mL L ⁻¹) | B ₁ - Chlorid (mg L ⁻¹) | BME*** (mL L ⁻¹) | Pepton aus Casein* (g L ⁻¹) | Soja- pepton **** (g L ⁻¹) | Malzex- trakt (g L ⁻¹) |
|------------------|---|--|--|---|---|---|---|---|--|---------------------------------|--|---|--|
| SNL | 30,0 | 4,5 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| SNL-HE | 30,0 | 4,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Kjalke* | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| MM 1 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 0,5 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| MM 2 | 7,5 | 11,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,8 | 1,3 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| MM 3** | 10,0 | 0,0 | 4,8 | 0,0 | 2,4 | 1,5 | 0,5 | 1,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| YM-Medium | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 0,0 | 3,0 |
| MS-Medium | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 30,0 |

* modifiziert nach *Kjalke et al. (1992)*. ** modifiziert nach *Fraatz et al. (2014)*. *** Nach dem Autoklavieren wurde 10 mL sterilfiltrierte Vitaminlösung (nach *Verduyn et al., 1992*) zugegeben. **** tryptisch hydrolysiert.

2.1.5 Basidiomycetenstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Basidiomycetenstämme verwendet (siehe Tabelle 6), welche aus dem *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Utrecht, Niederlande), der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig), dem Institut für molekulare Holzbiotechnologie (IfmH, Georg-August-Universität Göttingen) oder durch Eigenisolat des Instituts für Lebensmittelchemie bezogen wurden.

Tabelle 6: Verwendete Basidiomycetenstämme.

| Art | Abkürzung | Stammnummer und Herkunft | Art | Abkürzung | Stamm |
|--|-----------|--------------------------|------------------------------|-----------|------------|
| <i>Auriporia aurulenta</i> | Aau | CBS 106238 | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | Ppu | DSMZ 5331 |
| <i>Gloeophyllum odoratum</i> | God | CBS 444.61 | <i>Pleurotus sajor-caju</i> | Psaj | DSMZ 5339 |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> | Gtr | DSMZ 1398 | <i>Pleurotus sapidus</i> | Psa | DSMZ 8266 |
| <i>Hericium erinaceus</i> | Her | CBS 260.74 | <i>Schizophyllum commune</i> | Sco | DSMZ 1024 |
| <i>Lentinus lepideus</i> | Lle | CBS 450.79 | <i>Trametes hirsuta</i> | Thi | DSMZ 7052 |
| <i>Piptoporus betulinus</i> | Pbe | Eigenisolat | <i>Trametes suaveolens</i> | Tsu | DSMZ 5237 |
| <i>Pleurotus eryngii</i> | Per | CBS 458.79 | <i>Trametes versicolor</i> | Tve | DSM 11269 |
| <i>Pleurotus lampas</i> | Pla | CBS 323.49 | <i>Tyromyces floriformis</i> | Tfl | CBS 232.53 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> | Posf | IfmH | <i>Wolfiporia cocos</i> | Wco | CBS 279.55 |

2.3 Allgemeine Methoden

2.3.1 Kultivierung

2.3.1.1 Sterilisation

Feste Substrate und Glasgeräte wurden 30 min, feste und flüssige Nährmedien 20 min (121 °C und 1 bar) autoklaviert.

2.3.1.2 Stammkulturen auf SNL-Agarplatten

Für die verwendeten Basidiomyceten wurde jeweils eine SNL-Agarplatte mit einem etwa 1 cm² großen Stück Myzel aus der Stammsammlung des Institutes angeimpft und bei 24 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Platten zu etwa $\frac{3}{4}$ bewachsen waren. Die Kulturen wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.1.3 Kulturführung

Je ein 1 cm² großes Myzelstück der entsprechenden Agarplatte wurde steril in 125 mL SNL überführt und mittels Ultraturrax homogenisiert. Die Kulturen wurden bei 24 °C und 150 rpm inkubiert bis die Basidiomyceten sichtbar angewachsen waren. Die Überführung in Hauptkulturen erfolgte durch Inokulation von frischem Medium mit 10 % der Vorkultur.

2.3.2 Proteinchemische Assays

2.3.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry wurde mittels eines kommerziellen Kits der Firma Bio-Rad im Mikrotitermaßstab durchgeführt. Dazu wurden 25 µL DC Protein Assay Reagenz A mit 5 µL der Probe vorsichtig gevortext und nach Zugabe von 200 µL DC Protein Assay Reagenz B 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 750 nm im Microplate-Reader. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe von 0,1 – 1 mg mL⁻¹ mit Schritten von 0,25 mg mL⁻¹ BSA mitgeführt und eine Kalibriergerade erstellt.

2.3.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mittels eines kommerziellen Kits der Firma Sigma im Mikrotitermaßstab durchgeführt. Dazu wurden 300 µL Bradfordlösung (Verdünnung 1:3 der Bradfordstammlösung mit ddH₂O) mit 30 µL der Probe versetzt und 15 min bei RT inkubiert.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm im Microplate-Reader. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe von 25 – 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit Schritten von 0,025 mg mL^{-1} BSA angefertigt und eine Kalibriergerade erstellt.

2.3.2.3 *Trans-Anethol-Assay*

Für die Überprüfung auf alken-spaltende Enzymaktivität wurde 1 μL *trans*-Anethol in 900 μL Bis-Tris-Puffer (50 mM, pH 6) gegeben und 100 μL Probe beziehungsweise 30 μL lyophilisierte Biomasse zugegeben. Die Umsetzung erfolgte bei RT, 200 rpm (horizontales Schütteln) für 16 h. Die Reaktionsansätze wurden mit 1 mL Cyclohexanol (500 mM in n-Hexan) ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte mittels Zentrifugation (4600 rpm, 4 °C, 15 min). Nach anschließender Trocknung über Natriumsulfat wurde die Konzentration an Anisaldehyd in den Proben mittels GC-FID (7890 A, Agilent) in Temperaturprogramm 3 nach 2.4.2.2 mittels.

2.3.2.4 *Linolsäure-Assay*

10 μL Probe wurde mit 190 μL Natriumphosphat-Puffer (pH 7) in Mikrotiterplatten pipettiert. Der Assay wurde mit 20 μL Linolsäure-Lösung (2,5 mM in H_2O) gestartet. Die Aktivitätsmessung erfolgte für 60 min bei 37 °C (Vorinkubation) und 234 nm. Als Blindprobe wurde ein Ansatz mit 10 μL Puffer statt Probe mitgeführt.

2.3.2.5 *Glyceroloxidase-Assay*

Die Glyceroloxidaseaktivität wurde über die Messung der H_2O_2 -Bildung bestimmt. Dazu wurden 150 μL Bis-Tris-Puffer (50 mM, pH 6), 30 μL Anethol (100 mM in EtOH), 30 μL HRP (100 U/mL) und 15 μL Dianisidin in eine Mikrotiterplatte gegeben und die Reaktion mit 75 μL Probe gestartet.

Nach Inkubation für 60 min bei RT zeigte sich eine orange Färbung bei Entstehung von H_2O_2 . Blindproben wurden mit dH_2O als Probe durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde H_2O_2 zugegeben, um die Färbung zu bestätigen.

2.3.2.6 *Laccase-/Peroxidase-Assay*

Die Laccase- und Peroxidase-Aktivität wurde nach Linke *et al.* (2007) mit dem folgenden Pipettierschema bestimmt:

245 μL 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5

15 μL Probe

30 μL ABTS (5 mM in ddH_2O)

10 μL H_2O_2 (2 mM in ddH_2O) Zugabe nur bei Peroxidase-Assay

2.3.2.7 Azocasein-Assay

Der Azocasein-Assay wurde nach Iversen und Jørgensen (1995) durchgeführt. Dazu wurden 375 μL Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 6, 4 °C) mit 25 μL Probe vermischt. Der Assay wurde mit 100 μL Azocasein (5 % in ddH₂O) gestartet (20 min, 43°C, 700 rpm). Die Reaktion wurde mit 1 mL Trichloressigsäure (3 % in ddH₂O bei RT) gestoppt (10 min auf Eis) und nach Zentrifugation bei RT die Extinktion bei 366 nm gemessen.

2.4 Gaschromatografie

2.4.1 Aufarbeitung für die Gaschromatografie

2.4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Kulturüberständen

Das Myzel wurde vom Kulturüberstand durch Zentrifugation (9500 rpm, 4 °C, 15 min) getrennt und mit 1 mL Cyclohexanol (50 mg L⁻¹ in MeOH) als Wiederfindungsstandard versetzt. Nach dreimaliger Extraktion mit Pentan/Ether wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und mittels Vigreux-Kolonnen bis auf etwa 1 mL konzentriert. Anschließend wurde 100 μL Cyclopentanol (500 mg L⁻¹) als externer Normierungsstandard zugegeben und die Probe in ein GC-Vial überführt.

2.4.1.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion von enzymatischen Umsetzungen

Zur Lösemittelextraktion der enzymatischen Umsetzungen wurde der Reaktionsansatz mit 1 mL n-Hexan (mit 500 mg L⁻¹ Cyclohexanol) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (4600 rpm, 4 °C, 15 min). Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatografisch analysiert.

2.4.1.3 Tegosoft-Extraktion von lipidhaltigen Kulturüberständen

Die Tegosoft-Extraktion erfolgte nach Schimanski *et al.* (2013). 10 mL Kulturüberstand wurden mit 1 mL Tegosoft CT (mit 50 mg L⁻¹ Cyclopentanol) versetzt und anschließend je 60 s geschüttelt und gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4600 rpm, 4 °C, 15 min) und das Tegosoft wurde in ein Glasvial überführt.

2.4.2 Durchführung der Gaschromatografie (GC)

Die gaschromatografischen Analysen erfolgten an verschiedenen GC-Systemen, welche im Folgenden beschrieben werden.

Identifizierung von Substanzen erfolgte mittels GC-MS und Datenbankenabgleich (NIST 08/ NIST 14) sowie mittels Bestimmung der Kovats-Indices (KI) anhand eines Alkanreihenstandards mit n-Alkanen von C 8 bis C 25 (40 mg L⁻¹ in Hexan).

Kovats-Indices (KI) wurden berechnet nach:

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

N: Anzahl der C-Atome des Alkans, welches vor dem Analyten eluiert

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

A: Analyt

t': relative Retentionszeit (Retentionszeit t – Totzeit t₀)

2.4.2.1 GC mit Flammenionisationsdetektor gekoppelt mit olfaktometrischem Detektor (GC-FID/O)

Die extrahierten Kulturüberstände wurden mittels GC-FID/O (GC System 7890 A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit folgenden Parametern untersucht:

| | |
|--|--|
| Injektion: | Modus: <i>on column</i> , Volumen: 1 µL |
| Gas: | Wasserstoff 5.0 |
| Fluss: | 2 mL/min (konstant) |
| Detektor: | FID und ODP 3 (Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim a. d. Ruhr) |
| Säule: | DB-Wax, 30 m x 320 µm x 0,25 µm (Agilent Technologies) |
| Software: | Chemstation Rev. B.04.01, ODP-Recorder 2.9.3.8 |
| Temperaturprogramm 1: 40 °C (3 min)//3 °C min ⁻¹ /230 °C (10 min) | |

2.4.2.2 GC-FID mit Autosampler:

Die Proben für die Bestimmung der alkenspaltenden Aktivität und zur Bestimmung der Konzentration an Decatrienon beziehungsweise Decatrienon-Präkursoren wurden mittels GC-FID (GC System 7890 A mit Autosampler, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit folgenden Parametern untersucht:

| | |
|------------|---|
| Injektion: | Modus: <i>on column</i> , Volumen: 1 µL |
| Gas: | Wasserstoff 5.0 |
| Fluss: | 2 mL min ⁻¹ |

Detektor: FID
 Säule: CP-Wax 52 CB, 30 m x 320 µm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
 Software: Chemstation Rev. B.04.01
 Temperaturprogramm 1: 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min)
 Temperaturprogramm 3: 70 °C (3 min)//5 °C min⁻¹/180 °C//25 °C min⁻¹/230 °C (10 min)

2.4.2.3 GC mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

Die Identifizierung von flüchtigen Substanzen erfolgte mittels GC-MS (GC 8000 Series 8035 mit Massenspektrometer MD800, Fisons, Ipswich, UK oder 7890B GC System mit Massenspektrometer 5977A MSD, Agilent Technologies):

Injektion: Modus: *on column*, Volumen: 0,5 µL
 Gas: Helium 5.0
 Gasfluss: 1,5 mL min⁻¹
 MS: Quelle 200 °C, EI -70 eV, Massenbereich: m/z 33-500
 Säule 1: VF-WAXms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
 Säule 2: VF-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
 Software GC 80000 Qual Browser Version 1.2, Xcalibur
 Datenbank: NIST 08
 Software 7890B: Masshunter Qualitative Analysis B.07.00
 Datenbank: NIST 14
 Temperaturprogramm 1: 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min)
 Temperaturprogramm 2: 40 °C (3 min)//5 °C min⁻¹/250 °C//25 °C min⁻¹/325 °C (10 min)
 Temperaturprogramm 3: 70 °C (3 min)//5 °C min⁻¹/180 °C//25 °C min⁻¹/230 °C (10 min)
 Temperaturprogramm 4: 100 °C (3 min)//25 °C min⁻¹/250 °C//5 °C min⁻¹/325 °C (10 min)

2.4.2.4 GC-FID mit thermal desorption system (TDS-GC-FID)

10 µL der Probe mit Tegosoft wurden mittels Hamilton-Spritze in ein konditioniertes Desorptionsröhrchen überführt und mittels TDS-GC-FID vermessen:

Injektion: Modus: TDS (siehe Tabelle 7)
 Gas: Wasserstoff 5.0
 Fluss: 2 mL min⁻¹
 Detektor: FID
 Säule: CB-Wax, 30 m x 320 µm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
 Software: Chemstation Rev. B.04.01, ODP-Recorder 2.9.3.8
 Temperaturprogramm: 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min)

Tabelle 7: TDS-Parameter.

| | KAS-Parameter (KAS 4) | TDS-Parameter (TDS 2) |
|------------------------|-------------------------|--|
| Starttemperatur | -10 °C | 20 °C |
| Startzeit | 0,01 min | 0,01 min |
| Heizrate | 12,0 ° s ⁻¹ | 60 ° min ⁻¹ |
| Endtemperatur | 230 °C | 150°C |
| Haltezeit | 3 min | 3 min |
| | KAS Kryo-Kühlung Ein | Transfer-Temperatur 250 °C |
| | Equilibrierzeit 0,5 min | TDS Sample Mode Standard Flow Mode Splitlos |

2.4.2.5 TDS-GC mit massenselektivem Detektor (TDS-GC-MS)

Bei Extraktion mit Tegosoft wurden 10 µL der Probe mittels Hamilton-Spritze in ein konditioniertes Desorptionsröhrchen überführt. Bei Twisterextraktion wurde der Twister zunächst luftgetrocknet und mittels Pinzette in ein konditioniertes Desorptionsröhrchen überführt. Mit Tenax befüllte Abluft-Proben wurden mit 1 µL Undecansäuremethylester (0,5 mg/mL) direkt zur Messung verwendet.

Die Identifizierung von flüchtigen Substanzen erfolgte mittels TDS-GC-MS (CP-3800 mit Massenspektrometer 1200, Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA):

Injektion: Modus: TDS, Parameter analog 2.4.2.4
 Gas: Helium 5.0
 Gasfluss: 1,2 mL min⁻¹
 MS: Quelle 200 °C, EI -70 eV, Massenbereich: m/z 33-500
 Säule: DB5-ms, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm (Agilent Technologies)
 Software: Varian MS Workstation 6.9.1 (Varian) mit NIST 08
 Datenbank: NIST 08
 Temperaturprogramm 2: 40 °C (3 min)//5 °C min⁻¹/250 °C//25 °C min⁻¹/325 °C (10 min)

2.4.2.6 Präparative Gaschromatografie

Die Reinigung der Decatrienon-Präkursoren wurden mittels präparativer GC (HP 5890 Series II, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) mit Kaltaufgabesystem (KAS 3) und *multicolumn switch system* II (Gerstel, Mühlheim) mit folgenden Parametern durchgeführt:

| | |
|------------------------|--|
| Injektion: | Modus: <i>splitless</i> , Volumen: 5 μ L |
| Gas: | Wasserstoff 5.0 |
| Fluss: | 8,9 mL/min bei 100 °C |
| Detektor: | FID |
| Vorsäule: | Optima-Wax 5 m x 530 μ m x 2 μ m (Macherey-Nagel) |
| Hauptsäule: | Optima-Wax 25 m x 530 μ m x 2 μ m (Macherey-Nagel) |
| Software: | Chemstation Rev. B.04.01 |
| KAS-Programm: | 45 °C //12 °C min ⁻¹ /275 °C (10 min) |
| Temperaturprogramm 2 : | 40 °C (3 min)//10 °C min ⁻¹ /135 °C//0,5 °C min ⁻¹ /170 °C//15 °C min ⁻¹ / 230 °C (10 min) |

2.5 Vergleich von Nährmedien

Es wurden entsprechend 2.3.1.3 Hauptkulturen von *Wolfiporia cocos*, *Postia floriformis*, *Auriporia aurulenta* und *Hericiium erinaceus* mit SNL, YM-Medium und MS-Medium angesetzt (siehe 2.1.4) und als Schüttelkultur (150 rpm) beziehungsweise als Oberflächenkultur bei 24 °C inkubiert. Bei gutem Bewuchs der Kolben wurden die Kulturen geerntet und sensorisch beurteilt. Die Proben wurden nach 2.4.1.1 für die GC aufgearbeitet und mittels GC-FID/O und GC-MS vermessen (siehe 2.4.2.1 und 2.4.2.3).

2.5.1 Weiterführende Versuche mit *Auriporia aurulenta* (Aau)

2.5.1.1 Supplementierung mit L-Phenylalanin

Es wurden Aau-Hauptkulturen in SNL (250 mL) mit Zusatz von 10 mL sterilfiltrierter L-Phenylalanin-Lösung (2,5 mM in dH₂O) beziehungsweise 1 mL L-Phenylalanin-Lösung (12,5 mM in dH₂O) analog 2.3.1.3 angesetzt. In einer weiteren Aau-Hauptkultur wurde L-Phenylalanin (0,4 g L⁻¹ beziehungsweise 2,4 mM) anstelle von Asparagin eingesetzt. Dabei wurde das L-Phenylalanin zuvor schon beim Ansetzen des Mediums zugegeben und autoklaviert. Alle zwei Tage wurde steril 3 mL Probe gezogen und analog 2.4.1 aufgearbeitet und gaschromatographisch analysiert (siehe 2.4.2).

2.5.1.2 Kultivierung von Aau in weiteren Kulturmedien

Es wurden Aau-Hauptkulturen in Kjalke-Medium, in SNL-HE und in SNL mit Hefeextrakt der Firma Roth anstelle Merck nach 2.3.1.3 angesetzt. Die Kulturen wurden nach 14 Tagen geerntet, nach 2.4.1.1 aufgearbeitet und mittels GC-FID beziehungsweise GC-MS vermessen (siehe 2.4.2).

2.5.2 Weiterführende Versuche mit *Wolfiporia cocos* (Wco)

2.5.2.1 Kultivierung von Wco mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen

Wco wurde in SNL mit 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹, 6,0 g L⁻¹ und 15,0 g L⁻¹ Hefeextrakt nach 2.3.1.3 kultiviert und für die GC aufgearbeitet (siehe 2.4.1). Die gaschromatografische Analyse erfolgte in Temperaturprogramm 1 nach 2.4.2.

2.5.2.2 Kultivierung von Wco mit möglichen Furaneol[®]-Präkursoren

Wco wurde in SNL mit 50 mM L-Rhamnose und 2 mM D-Fructose-1,6-Bisphosphat nach 2.3.1.3 kultiviert und für die GC aufgearbeitet (siehe 2.4.1). Die gaschromatografische Analyse erfolgte in Temperaturprogramm 1 nach 2.4.2.

2.5.2.3 Elicitierung von Wco mit Methyljasmonat:

Die Kultivierung von Wco in SNL erfolgte analog 2.3.1.3 mit Zugabe von 100 µM Methyljasmonat nach 3 Tagen Vorinkubation (sterilfiltriert). Direkt vor der Zugabe wurde 3 mL Probe gezogen (t = 0). Nach 1 h, 3 h, 5 h, 7 h sowie nach einem und nach zwei Tagen wurde jeweils 3 mL Probe gezogen, welche nach 2.4.1.1 aufgearbeitet und gaschromatografisch analysiert wurden (siehe 2.4.1). Des Weiteren wurden Blindwerte ohne Pilz beziehungsweise ohne Methyljasmonat mitgeführt.

2.5.2.4 Kultivierung von Wco auf lipidreichen Nebenströmen

Als Nebenströme wurden raffiniertes Rapsöl (Kunella Feinkost, Cottbus) und Rapspresskuchen (Teuteburger Ölmühle GmbH Co KG, Ibbenbüren) eingesetzt. 10 mL Wco-Vorkultur wurde steril in 125 mL MM1 mit 1,25 mL Rapsöl (sterilfiltriert) beziehungsweise in 125 mL MM2 mit 2,5 g Rapspresskuchen (autoklaviert) überführt. Entsprechende Blindwerte ohne Wco (chemischer Blindwert) beziehungsweise ohne Nebenstrom (biologischer Blindwert) wurden mitgeführt. Nach sechs Tagen erfolgte die sensorische Beurteilung und Ernte mittels Zentrifugation. Die Aufarbeitung für die GC erfolgte nach 2.4.1.3. Die Proben wurden anschließend zunächst mittels TDS-GC-FID und anschließend zur Identifikation der Substanzen mittels TDS-GC-MS/O analysiert (siehe 2.4.2).

2.6 Versuche zu alkenspaltenden Enzymaktivitäten

2.6.1 Screening nach alkenspaltenden Aktivitäten

Die Kultivierung der Basidiomyceten erfolgte in Submerskulturen analog 2.3.1. Zusätzlich wurden die Kulturen jeden zweiten Tag mit 0,04 % *trans*-Anethol (v:v, 50 mM in EtOH) induziert. Myzel und Kulturüberstand wurden mittels Zentrifugation (9500 rpm, 4 °C, 15 min) getrennt und lyophilisiert. Die lyophilisierte Biomasse wurde mit Mörser und Pistill homogenisiert und anschließend der *trans*-Anethol-Assay analog 2.3.2.3 durchgeführt.

2.6.2 Reinigung von alkenspaltenden Aktivitäten aus *Pleurotus sapidus*

Die Kultivierung von Pbe erfolgte in Submerskulturen analog 2.3.1. Zusätzlich wurden die Kulturen jeden zweiten Tag mit 0,04 % (v:v) *trans*-Anethol (50 mM in EtOH) induziert. Nach 7 Tagen wurde das Myzel abzentrifugiert und lyophilisiert.

2.6.2.1 Reinigung des alkenspaltenden Enzyms mittels Fast Protein Liquid Chromatography

Zur Reinigung der alkenspaltenden Aktivität aus *Pleurotus sapidus* wurden eine BioLogic DuoFlow und eine NGC-Quest-Anlage (Bio-Rad) gekoppelt mit einem Fraktionssammler Modell 2128 bei 4 °C genutzt. Die Proteine wurden bei 280 nm detektiert. Die Datenerfassung erfolgte mit der BioLogic-DuoFlow-Software beziehungsweise ChromLab (Bio-Rad).

Es wurden verschiedene Reinigungsmethoden mit verschiedenen Säulenmatrices (siehe Tabelle 8) erprobt. Die Größen der Probenschleife, die Flussrate, die Fraktionsgrößen und die gewählten Puffer wurden der jeweiligen Methode angepasst.

Tabelle 8: Verwendete FPLC-Systeme für die Reinigung der alkenspaltenden Aktivitäten.

| Säulenmatrix | Volumen | Trennprinzip |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|
| Phenyl Sepharose Fast Flow (high sub) | 20 mL | HIC |
| Phenyl Sepharose FF (high sub) | 1 mL | HIC |
| Q Sepharose FF | 1 mL | IEX |
| SP Sepharose FF/XL | 1 mL | IEX |
| SP Sepharose FF | 20 mL | IEX |
| ANX Sepharose FF | 1 mL | IEX |
| CM FF | 1 mL | IEX |
| Anethol-Sepharose (selbst gegossen) | 1 mL | Affinitätschromatografie |

| Säulenmatrix | Volumen | Trennprinzip |
|--------------------|---------|--------------|
| Superdex 75 10/300 | 24 mL | SEC |

Im Folgenden werden die zielführenden Reinigungsmethoden dargestellt. 10 g Psa-Lyophilisat wurde in 400 mL Bis-Tris-Puffer (50 mM, pH 6, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) bei 4 °C für eine Stunde suspendiert und das Myzel anschließend abzentrifugiert. Nach Membranfiltration (PES-Filter 0,45 µm, Merck) wurde mit der Probe nach dem in Tabelle 9 dargestellten Reinigungsprogramm verfahren. Fraktionen, die die Zielaktivität enthielten, wurden nach dem jeweiligen Trennschritt vereinigt, über eine 3 kDa Membran konzentriert und für den nächsten Trennschritt verwendet.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten FPLC-Methoden.

| Reinigungs-schritt | Säulenmatrix | Volumen | Trennprinzip | Puffer | Methode |
|--------------------|----------------------|---------|--------------|--|---|
| 1 | Phenyl FF (high sub) | 20 mL | HIC | A: 50 mM Bis-tris pH 6 + 1 M $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ B: Wasser | 80 mL filtrierte Probe. Puffer A 100 % 150 mL, linearer Gradient: Puffer A 100 % - 0 % in 130 mL. Fluss 2 mL/min. |
| 2 | SP Sepharose FF | 3 mL | IEX | A: 20 mM NaCl pH 4 B: 20 mM Natriumacetat pH 4 + 1 M NaCl | 80 mL Probe, Puffer A 100 % (200 mL), Stufengradient: Puffer A 80 % (150 mL), 0 % (200 mL). Fluss 1 mL/min |
| 3 | Superdex 75 10/300 | 24 mL | SEC | 100 mM Bis-tris pH 6 | 250 µL Probe. Elution ohne Gradient |

2.6.2.2 Peptidaseinhibitortest

Für den Peptidaseinhibitortest wurden 10 µL Peptidase-Inhibitor-Mix FY und 30 mg Psa-Lyophilisat mit 1 mL Bis-tris (50 mM, pH 6) gemischt und 1 h bei 4 °C gerührt. Parallel wurde ein Ansatz ohne Inhibitor angesetzt. Anschließend wurden beide Ansätze auf *trans*-Anethol-Umsetzung überprüft (siehe 2.3.2.3).

2.6.2.3 Analytische und präparative Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die analytische IEF wurde eine Pharmacia LKB Multiphor II verwendet. Dazu wurden Fertigele (Servalyte Precotes pH 3-10, 300 µm, 125 mm x 125 mm, Serva) und als Proteinstandard der pl 3-10 IEF-Marker Liquid Mix (Serva) verwendet. 10 µL Probe wurden mittels Applikatorstreifen in der Gelmitte aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte bei maximal 2000 V, 6 mA und 12 W für 3500 Vh. Die Proben wurden doppelt aufgetragen. Eine Spur wurde mittels Coomassie G zur Visualisierung der Proteinbanden angefärbt, während die zweite Spur in

gleichmäßige Stücke geschnitten, in Vials überführt und der *trans*-Anethol-Assay durchgeführt wurde (siehe 2.3.2.3).

Die präparative IEF wurde mittels Rotofor®-System von Bio-Rad gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt. Als Anoden- und Kathodenelektrolyte wurden je 0,1 M Natriumhydroxyd und Phosphorsäure verwendet. Es wurde jeweils 35 – 50 mL Kulturüberstand beziehungsweise HIC-Fraktion in die Trennkammer gefüllt. Eine Überprüfung der Aktivität in den Fraktionen erfolgte mittels *trans*-Anethol-Assay (siehe 2.3.2.3).

2.6.2.4 Test der Lipoxygenase aus *Pleurotus sapidus* (*Echerichia coli*) auf alken-spaltende Enzymaktivität

Zum Test der in *E. coli* exprimierten Lipoxygenase aus *Pleurotus sapidus* (Lox_{Psa1}) auf alken-spaltende Enzymaktivität wurden 100 μ L aufgereinigte Lox_{Psa1} mit 50 μ L beziehungsweise 100 μ L Linolsäure (2,5 mM in Wasser) gemischt und mit Bis-Tris-Puffer (50 mM, pH 6) auf 1000 μ L aufgefüllt. Zum Start der Reaktion wurde 1 μ L *trans*-Anethol zugegeben. Analog wurden Proben ohne Linolsäure beziehungsweise ohne Lox_{Psa1} angesetzt. Die Umsetzung erfolgte bei RT, 200 rpm (horizontales Schütteln) für 16 h. Die Reaktionsansätze wurden mit 1 mL Cyclohexanol (500 mM in n-Hexan) ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte mittels Zentrifugation (4600 rpm, 4 °C, 15 min). Nach anschließender Trocknung über Natriumsulfat wurde die Konzentration an Anisaldehyd in den Proben durch GC-FID (7890 A, Agilent) nach 2.4.2.2 ermittelt.

Analog wurde der Versuch mit 30 mg Psa-Lyophilisat und 1,25 mM beziehungsweise 2,5 mM Linolsäure durchgeführt. Als Blindwert wurde das Psa-Lyophilisat bei 95 °C 40 min erhitzt und anschließend analog verfahren.

Zum Test auf Umsetzung von Piperin wurde anstelle von Anethol eine 20 μ L Piperin-Lösung (10 g L⁻¹ in EtOH) eingesetzt.

2.6.2.5 Umsetzung von *trans*-Anethol mit HIC-Fraktionen in Anwesenheit von Cofaktoren

Der *trans*-Anethol-Assay wurde analog 2.3.2.3 durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich 20 μ L Mn(III)acetat, Fe(II)sulfat, Fe(III)chlorid, NADPH, NADH, Mg(II)sulfat, Ni(II)sulfat, Cu(II)sulfat und Zn(II)sulfat (je 50 mM) zugegeben. Es wurden je zwei Ansätze durchgeführt: eine aktive Probe mit aktiver HIC-Fraktion, eine desaktivierte Probe mit thermisch inaktiverter HIC-Fraktion (95 °C, 40 min).

In einem weiteren Versuch wurde der *trans*-Anethol-Assay analog 2.3.2.3 mit aktiven HIC-Fraktionen ohne Fe(II)sulfat und mit 20 μ L beziehungsweise 40 μ L Fe(II)sulfat (50 mM) durchgeführt. Als Blindwerte wurden eine Probe ohne HIC-Fraktion und Fe(II)sulfat, eine Probe mit inaktiverter HIC-Fraktion ohne Fe(II)sulfat und eine Probe mit Fe(II)sulfat ohne inaktiverter HIC-Fraktion mitgeführt.

2.6.2.6 Umsetzung von *trans*-Anethol mit IEX-Fractionen in Anwesenheit von Cofaktoren

Es wurden mit der IEX-Fraktion 1 und 2 und der LOX_{Psa}1 jeweils die gleichen vier Ansätze durchgeführt: Je ein Ansatz mit 100 µL Probe ohne Cofaktor, mit 20 µL Mn(III)acetat (50 mM in DMSO), mit 50 µL Linolsäure (2,5 mM) oder 20 µL Fe(II)sulfat (50 mM). Der *trans*-Anethol-Assay wurde analog 2.3.2.3 durchgeführt. Aufgrund von sehr gering aktivem Material konnten keine Blindwerte mitgeführt werden.

Weiterhin wurde mit LOX_{Psa}1 der gleiche Versuch mit hitzeinaktivierten Proben (95 °C, 40 min) durchgeführt.

2.6.2.7 Umsetzung von *trans*-Anethol mit IEX-Fractionen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid

Zunächst wurden vier Blindwerte ohne aktive Probe angesetzt – ohne, mit 5 µM, mit 50 µM oder mit 500 µM Wasserstoffperoxid. Analog wurden Proben mit 100 µL aktiver IEX-Fraktion 1 beziehungsweise 2 mit und ohne 50 µM Wasserstoffperoxid angesetzt. Der *trans*-Anethol-Assay wurde analog 2.3.2.3 durchgeführt.

2.6.2.8 Umsetzung von *trans*-Anethol mit IEX-Fractionen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und ABTS

100 µL der aktiven IEX1 bzw IEX2-Fraktion wurden mit 30 µL H₂O₂ (2 mM) und 100 µL ABTS (5 mM) versetzt. Analog wurde ein Blindwert ohne ABTS vorbereitet. Der *trans*-Anethol-Assay wurde analog 2.3.2.3 durchgeführt.

2.6.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung der Proteine wurden die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt (12 %, w/v) mit *Precision Plus Protein* Standard von Bio-Rad als Marker. Die Färbung erfolgte mit Coomassie (Instant Blue) oder Silberfärbung (Kit M335-KitAm von Mobitec) nach Herstelleranleitung.

Für die Peroxidase-Aktivitätsfärbung wurde das Gel mit 2,5 %iger Triton X-100-Lösung gewaschen und anschließend mit ABTS-Färbelösung (5 mM ABTS in 0,1 M Natriumtartratpuffer pH 4,5 mit 40 µM H₂O₂) überschichtet.

2.6.2.10 Proteinidentifikation mittels ESI-MS/MS

Die Proteinidentifikation wurde nach (Plagemann *et al.*, 2014) durchgeführt. Dabei wurde der ausgewählte Protein-Spot aus dem Gel ausgeschnitten und einer tryptischen Spaltung unterzogen. Die Proteinidentifizierung erfolgte mithilfe *Mascot*-Suche (*Mascot 2.4.0 search engine*, Matrix Science) und der NCBI-Proteindatenbank.

2.7 Versuche zur Bildung von Decatrienon mittels *Piptoporus betulinus*

2.7.1 Kultivierung mit Glucosinolaten

Nach 6 Tagen Vorkultur wurde eine 250 mL Pbe-Hauptkultur mit 250 μ L Glucosinolat-Gemisch (100 mM, je 25 mM Glucoiberin, Glucocapparin, Glucosinalbin und Glucotropaeolin, sterilfiltriert) versetzt und täglich 5 mL Probe gezogen. Analog wurde ein Blindwert ohne Zugabe des Glucosinolat-Gemischs kultiviert und ebenfalls täglich 5 mL Probe gezogen.

Parallel wurden in einem Doppelansatz jeweils zwei Kulturen mit 10 μ L beziehungsweise 250 μ L des Glucosinolat-Gemischs (100 mM) und entsprechende Blindwerte (mit Pbe ohne Glucosinolate, ohne Pbe mit Glucosinolaten) angesetzt und diese nach elf Tagen Kultivierung geerntet.

3 mL der Proben wurden nach Zugabe von 10 μ L Undecansäuremethylester (10 mg L^{-1}) jeweils mittels PDMS-Twister für eine Stunde unter Rühren bei RT extrahiert und nach 2.4.2.5 gaschromatografisch vermessen.

2.7.2 Kultivierung von Pbe mit Fettsäuren

2.7.2.1 Zugabe von Linolsäure/Linolensäure

Zur Kultivierung von Pbe mit Linolsäure und Linolensäure wurde Pbe nach fünf Tagen Vorkultur zunächst in Hauptkulturen überführt. Es wurden jeweils eine Hauptkultur mit Pbe in SNL, eine mit Pbe in SNL mit Zugabe von 100 μ L Linolsäure (1,25 mM in Ethanol, sterilfiltriert) und eine Hauptkultur mit Pbe in SNL mit Zugabe von 100 μ L Linolensäure-Gemisch (1,25 mM Gemisch aus α - und γ -Linolensäure in Ethanol, sterilfiltriert) hergestellt. Nach 14 Tagen Kultivierung bei RT und 150 rpm wurden die Kulturen geerntet und sensorisch evaluiert. Die Kulturen wurden nach 2.4.1.1 für die GC aufgearbeitet und analog 2.4.2.2 vermessen.

2.7.2.2 Getrennte Zugabe von α - beziehungsweise γ -Linolensäure

Der Versuch wurde analog 2.7.2.1 durchgeführt, wobei getrennt mit α - beziehungsweise γ -Linolensäure (Endkonzentration in 250 mL Kultur: 0,5 mM in EtOH) als Reinsubstanzen supplementiert wurde. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Kulturen durch ein Panel aus zehn Personen sensorisch bewertet. Die weitere Aufarbeitung und gaschromatografische Messung erfolgte analog 2.7.2.1.

2.7.2.3 Test auf Hydroperoxide nach Huber und Fröhlke (1972)

Die Färbelösung wurde in Reihenfolge der unten angegebenen Chemikalien angesetzt.

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| α -Naphthol | 13,69 mM |
| Methanol | 9,8 % (v/v) |
| ddH ₂ O | 88,9 % (v/v) |
| Kaliumdisulfit | 1,48 mM |
| Essigsäure | 1,3 % (v/v) |
| FeSO ₄ 7 H ₂ O | 1,18 mM |
| Farbentwickler 3 | 3,46 mM |

Die Lösung wurde so lange mit einem Magnetrührkern gerührt, bis ein Farbumschlag von rosa-farben nach farblos erfolgte. Die Lagerung erfolgte in einem geeigneten, in Aluminiumfolie gewickelten Glasgefäß mit Schraubdeckel bei 4 °C.

Je 180 mL Probe (Linolsäure-Gemisch, α - und γ -Linolensäure) wurden mit 20 μ L Huber-Reagenz versetzt und nach 1 h beziehungsweise 20 h bei 620 nm und RT vermessen.

2.7.2.4 Induktion mit Linolensäure/Wasserstoffperoxid

Zu 250 mL Pbe-Hauptkultur in SNL wurde 100 μ L Linolensäure-Gemisch (1,25 M in EtOH) gegeben. In einem parallelen Ansatz wurde zu einer 250 mL Pbe-Hauptkultur 1 mL sterilfiltriertes Wasserstoffperoxid (250 mM) zu den Kulturen gegeben. Nach zwei Tagen erfolgte eine weitere Zugabe von 100 μ L Linolensäure-Gemisch beziehungsweise 1 mL Wasserstoffperoxid. Es wurde direkt vor der Supplementierung, beziehungsweise nach sechs Stunden und im weiteren Verlauf täglich je 3 mL Probe gezogen und diese für die Gaschromatografie mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit P/E aufgearbeitet. Die GC-Analyse erfolgte nach 2.4.2.2.

2.7.3 Lichtinduktion

Zur Kultivierung unter verschiedenen Lichtverhältnissen wurden 250 mL Hauptkulturen bei Standardbedingungen, im Dunkeln, unter LEDs beziehungsweise unter Tageslichtlampen in einer Phytokammer bei 24 °C und 145 rpm kultiviert. Alle zwei Tage wurden 10 mL Probe gezogen und sensorisch sowie gaschromatografisch (siehe 2.4.1.1 und 2.4.2.2) analysiert. Nach sechs Tagen erfolgte die Ernte, Aufarbeitung und GC-Analyse der vollständigen Kulturen.

2.7.4 Supplementierung von Polyketidvorstufen

2.7.4.1 Supplementierung von Malonat und Pyruvat

Nach sechs Tagen Vorinkubation wurden zu 250 mL Pbe-Hauptkulturen in SNL je 2 mL sterilfiltriertes Brenztraubensäure-Natriumsalz (1 M in Wasser) beziehungsweise Malonsäure-Dinatriumsalz Monohydrat (1 M in Wasser) beziehungsweise 2 mL eines Gemisches (1:1, v/v, 1M) zu den Kulturen gegeben. Es wurde direkt vor der Supplementierung, beziehungsweise nach 8, 16, 24, und 48 h je 3 mL Probe gezogen und diese für die GC mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit P/E aufgearbeitet. Die GC-Analyse erfolgte nach 2.4.2.2.

2.7.4.2 Supplementierung von Acetat

Nach sechs Tagen Vorinkubation wurden zu 250 mL Pbe-Hauptkulturen in SNL je 1,5 mL sterilfiltriertes Natriumacetat (2,5 M) zu den Kulturen gegeben. Nach zwei Tagen erfolgte eine weitere Zugabe von 1,5 mL Natriumacetat. Es wurde direkt vor der Supplementierung, beziehungsweise nach sechs Stunden und im weiteren Verlauf täglich je 3 mL Probe gezogen und diese für die GC mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit P/E aufgearbeitet. Die GC-Analyse erfolgte nach 2.4.2.2.

2.7.4.3 Supplementierung von Acetat und Induktion mit Linolensäure

Zu den Pbe-Hauptkulturen wurden 20 µL Linolensäure-Gemisch (1,25 M in EtOH) gegeben. Nach drei Tagen Vorinkubation wurden zu 250 mL Pbe-Hauptkulturen in SNL je 1,5 mL sterilfiltriertes Natriumacetat (2,5 M in dH₂O) zu den Kulturen gegeben. Nach zwei Tagen erfolgte eine weitere Zugabe von 1,5 mL Natriumacetat. Es wurde direkt vor der Supplementierung, beziehungsweise nach sechs Stunden und im weiteren Verlauf täglich je 3 mL Probe gezogen und diese für die GC mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit P/E aufgearbeitet. Die GC-Analyse erfolgte nach 2.4.2.2.

2.7.5 Analyse des Pentan/Ether-Extrakt des Pbe-Myzels

Aus einer vorangegangenen Kultivierung von Pbe in SNL wurde nach Ernte der Kultur nach zehn Tagen das Myzel mittels Zentrifugation und Filtration abgetrennt und anschließend lyophilisiert. Zu einer Fettsäurebestimmung wurde das getrocknete Myzel anschließend in einer Soxhlet-Extraktion mit P/E extrahiert. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, bis etwa 15 mL einer trüben, gelben Lösung im Kolben verblieben. Dieses P/E-Myzel-Extrakt wurde für die folgenden Versuche herangezogen.

2.7.5.1 Hydrolyseversuche

Zur Hydrolyse der möglichen Decatrienon-Präkursoren wurde 0,1 g getrocknetes P/E-Myzel-Extrakt mit 10 mL destilliertem H₂O versetzt. Von dieser Stammlösung wurde 1 mL mit 1 mL H₂O als Blindwert angesetzt. Zur basischen Hydrolyse wurde zu 1 mL Stammlösung 1 mL 1 N beziehungsweise 6 N NaOH gegeben und zwei Stunden beziehungsweise 24 h bei RT inkubiert. Ebenfalls wurde zur sauren Hydrolyse 1 mL Stammlösung mit 1 mL 1 N beziehungsweise 6 N HCl vermischt und zwei Stunden beziehungsweise 24 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Proben mit 1 mL HCl beziehungsweise NaOH neutralisiert und nach 2.4.1 und 2.4.2.2 aufgearbeitet und gaschromatografisch vermessen.

2.7.5.2 Umkristallisieren

Das P/E-Myzel-Extrakt wurde in Pentan/Ether umkristallisiert. Dazu wurde nach Zugabe von Siedesteinen 1 mL des Extraktes mit 5 mL P/E unter Rückfluss erhitzt. Es erfolgte eine weitere Lösemittelzugabe, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hat (12 mL P/E). Über einen Faltenfilter wurde die Probe heiß filtriert und anschließend zur Kristallation abgekühlt. Zur vollständigen Kristallation wurde die Probe über Nacht bei 4 °C auskristallisiert. Das Kristallisat wurde über einen Büchnertrichter bei vermindertem Druck isoliert. Ein Teil des Kristallisats wurde in P/E gelöst und mittels GC-FID vermessen. Aufgrund großer Säurepeaks wurde die Probe getrocknet und in *N,O*-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) mit 1 % Trimethylchlor-silan (TMCS, 15 min bei 80 °C) derivatisiert. Es erfolgte eine GC-MS-Analyse mittels unpolarer Säule (VF-5ms) nach 2.4.2.3.

2.7.5.3 Flüssigchromatografie mit Massenspektrometriekopplung (LC-MS)

Zur LC-MS-Messung wurde der Niederschlag mit Stickstoff getrocknet und versucht, diesen in für die LC geeigneten Lösemitteln (Wasser, Acetonitril, Methanol mit 0,05 % Ameisensäure) zu lösen. Vollständig in Lösung gebracht wurde der Niederschlag nur durch Zugabe von Methanol.

Eine Bestimmung der Molekülmassen mittels Direkteinspritzen (LC-MS/MS Varian 212-LC Pump, ProStar 325 UV-Vis Detector, 320-MS TQ Mass Spectrometer) erfolgte mit Wasser mit 0,05 % Ameisensäure und Acetonitril als Fließmittel. Der Fluss betrug 0,5 mL min⁻¹. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 254 und 325 nm. Die Detektion der Molekülmassen erfolgte mittels Quadrupol Massenspektrometer im ESI-Negativmodus mit folgenden Systemparametern:

ESI-Nadelspannung: -4500 Volt; ESI-Schildspannung: -600 Volt; Trocknungsgastemperatur: 350 °C, API-Gehäusetemperatur: 50 °C, Zerstäuber-Gasdruck: 55 psi, Trocknungsgasdruck: 30 psi, Gas: Luft, Massenbereich: 50 - 600 m/z

2.7.5.4 Festphasenextraktion (SPE)

0,5 mL des Pentan/Ether-Myzel-Extrakts wurden mittels unmodifizierten Kieselgel-Säulen (Chromabond SiOH, 6 mL, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) fraktioniert. Dazu wurde die Säule mit 18 mL Pentan konditioniert und nacheinander mittels 8 mL Pentan/Diethylether (9:1, v/v), Pentan/Diethylether (3:1, v/v) und Diethylether eluiert. Die Fraktionen wurden an Vigreux-Kolonnen eingeeengt und nach 2.4.2.2 und 2.4.2.2 gaschromatografisch vermessen.

2.7.5.5 Präparative GC

Zur Reinigung der postulierten Präkursoren wurde zunächst eine Methode für die präparative GC entwickelt. Die zielführenden Parameter sind in Kapitel 2.4.2.6 gelistet. Nach 40 Injektionen (je 5 µL) erfolgte das Ausspülen der Fallen mit zweimal 200 µL P/E mittels Hamilton-Spritze. Anschließend wurde eine Reinheitskontrolle mittels GC-MS durchgeführt (siehe 2.4.2.3).

2.7.6 Kultivierung von Pbe mit Kohlextrakten

2.7.6.1 Herstellung der fraktionierten Kohlextrakte

20 g lyophilisierter zerkleinerter Weißkohl wurde in eine Extraktionshülse eingewogen und diese nach Verschließen mit Watte in die Extraktionsapparatur nach Soxhlet eingebracht. Es erfolgte eine fraktionierte Extraktion nach Soxhlet mit 220 mL Hexan, gefolgt von 220 mL Dichlormethan und 220 mL Ethylacetat (jeweils sechs Stunden). Anschließend wurde das Lyophilisat mit Methanol/Essigsäure (19:1, v:v) extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer auf 10 mL eingeeengt. Zur Analyse wurden die Extrakte mittels Stickstoff getrocknet und anschließend mit BSTFA + 1 % TMCS (15 min, 80 °C) silyliert. Es erfolgte eine Analyse mittels GC-MS auf unpolarer Säule (siehe 2.4.2.2).

2.7.6.2 Kultivierung von Pbe mit fraktionierten Kohlextrakten

Jeweils 4 mL Kohlextrakt (im Kolben mit N₂ abgeblasen) beziehungsweise 10 g Kohl wurden zu 500 mL MM 3 gegeben und mit 50 mL Pbe Vorkultur angeimpft. Zusätzlich wurden chemische Blindwerte (ohne Pbe) beziehungsweise ein biologischer Blindwert (Pbe in MM 3) angesetzt. Es wurde bei 24 °C und 150 rpm kultiviert und jeden zweiten Tag steril 3 mL Probe gezogen und gaschromatografisch nach 2.4.2.2 analysiert. Weiterhin wurde der pH-Wert während der Kultivierung kontrolliert.

Nach 12 Tagen wurden die Kulturen geerntet, mittels flüssig-flüssig-Extraktion aufgearbeitet und per GC analysiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Kultur mit Kohlschnitt mittels PDMS- beziehungsweise EG-Silikon-Twister extrahiert. Dazu wurde mit den Twistern in 10 mL Kulturüberstand für 1 h bei RT gerührt. Es erfolgte eine GC-MS-Analyse nach 2.4.2.5.

2.7.7 Kultivierung im Reaktor

Das Fermentermedium wurde nach 2.1.4 hergestellt und im 5 L Fermenter autoklaviert. Der Fermenter wurde mit 500 mL Pbe-Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte für zehn Tage bei 24 °C, 120 rpm und einer Luftzufuhr von $> 3,5 \text{ L min}^{-1}$ (maximale Luftzufuhr).

Es erfolgte ein tägliches Probeziehen von 5 mL Kultur durch Ablassen von Kulturüberstand aus dem Fermenter und 30 NL Abluft. Während der Kultivierung befand sich ein leeres TDS-Röhrchen im Abluftstrom. Bei Probenahme wurde dieses durch das konditionierte Tenax-Röhrchen ersetzt und mittels Probenehmer 30 NL Abluft (2 L min^{-1}) gezogen. Weiterhin erfolgte eine Kontrolle des pH-Wertes während der Kultivierung.

Die Bestimmung der Präkursoren erfolgte als Summenparameter mittels PDMS-Twister-Extraktion aus 3 mL Kulturüberstand für 1 h bei RT. Twister und Tenax-Röhrchen wurden mittels TDS-GC-MS auf unpolarer Säule vermessen (siehe 2.4.2.5). Die Bestimmung der Decatrienonkonzentration erfolgte durch Berechnung der in der Abluft von 1 L Kultur täglich gebildeten Menge.

2.8 Entsorgungshinweise

Biologisches Material wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Das Pilzmyzel wurde anschließend im Laborabfall entsorgt und der Kulturüberstand in den Abguss gegeben.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden nach Gruppen (nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel, nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel beziehungsweise halogenierte Lösungsmittel) gesammelt. Diese wurden der Zentralen Betriebseinheit Entsorgung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Basidiomyceten eingesetzt, um natürliche Aromastoffe herzustellen und beteiligte Präkursoren sowie Enzyme zu identifizieren. Es wurden bereits zahlreiche biotechnologische Verfahren zur Erzeugung von Aromastoffen etabliert (Bicas *et al.*, 2016). Besonderes Potenzial hierfür bieten die bisher kaum eingesetzten Basidiomyceten, welche über eine außergewöhnlich vielfältige Enzymausstattung verfügen und oftmals essbar sind. Durch die von ihnen sekretierten Enzyme wird ein effizienter Abbau von Makromolekülen wie Cellulose oder Lignin und die Biotransformation verschiedener Substrate zu wertvollen, zum Teil aromatischen Verbindungen, ermöglicht.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt den Einfluss verschiedener Nährmedien zur Produktion von Aromastoffen mittels Basidiomyceten. Durch die Variation der Nährmedien wurden verschiedene Präkursoren, Induktoren oder Elicitoren bereitgestellt. Insbesondere interessierte die Nutzung von lipidreichen Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zur Synthese von natürlichen Aromastoffen. Der zweite Teil befasst sich mit der Synthese von natürlichen Aromastoffen mittels alkenspaltenden Reaktionen. Einen Forschungsschwerpunkt bildete dabei die Umsetzung von Piperonal aus Piperin durch basidiomycetische Enzyme. Dabei wurde durch Substratinduktion nach Basidiomyceten mit alkenspaltender Enzymaktivität gesucht, worauf eine Reinigung der entsprechenden Enzyme folgte. Im letzten Teil der Arbeit wurde die Bildung des neuen Aromastoffs (*5 E, 7 E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on mit ananasähnlichem Geruch aus Schüttelkulturen von *Piptoporus betulinus* untersucht. Gegenstand der Analysen waren eine Anreicherung der Zielsubstanz sowie die Identifizierung möglicher Präkursoren.

3.1 Effekt verschiedener Medien auf das Aromaprofil von Basidiomyceten

Zu Beginn der Arbeit wurden *Wolfiporia cocos* (Wco), *Auriporia aurulenta* (Aau), *Hericium erinaceus* (Her) und *Postia floriformis* (ehemals *Tyromyces floriformis*) (Pfl) für erste Versuche gewählt (siehe Abbildung 7). Als Auswahlkriterium dienten ihre auf besondere Gerüche hindeutenden Namen oder ein während anderer Projekte im Institut bereits beobachteter außergewöhnlicher Geruch. Um Effekte verschiedener Medien auf das Aromaprofil dieser Basidiomyceten zu testen, wurden diese zunächst in verschiedenen Nährmedien emers oder submers kultiviert. Anschließend sollte das Aromaspektrum ausgewählter Basidiomyceten auf lipidreichen Nebenströmen evaluiert werden.

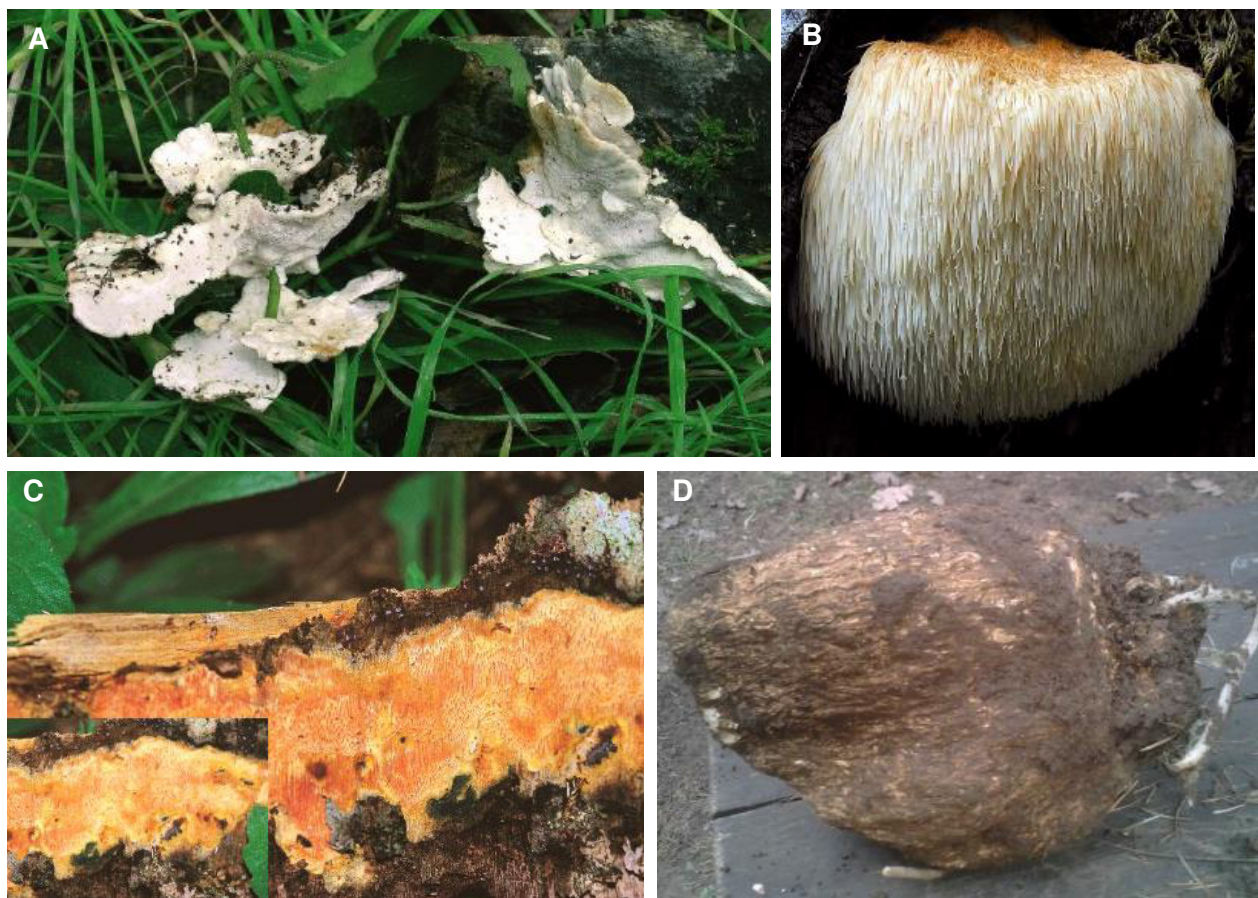


Abbildung 7: Fruchtkörper von *Postia floriformis* (A), *Hericium erinaceus* (B), *Auriporia aurulenta* (C) und *Wolfiporia cocos* (D).

Quellen: A, C: Bernicchia, A. (Polyporaceae s.l. Fungi Europaei 10. Ed. Candusso, Italy), B: Wilson, N. (http://www.mykoweb.com/CAF/species/Hericium_erinaceus.html, aufgerufen am 16.06.2016), D: Trappem (https://en.wikipedia.org/wiki/Wolfiporia_extensa#/media/File:Tuckahoe.jpg, aufgerufen am 16.06.2016).

3.1.1 Pilz/Medium-Screening

Als Medien wurde die im Institut für die Kultivierung von Basidiomyceten bewährte Standardnährlösung (SNL) sowie ein Hefe-Malz-Medium (YM-Medium) und ein Malzextrakt-Sojapepton-Medium (MS-Medium) verwendet. Die Medien wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzungen ausgewählt, um deren Effekte auf die Basidiomyceten hinsichtlich der Aromaprofile festzustellen.

Die Basidiomyceten wurden entsprechend 2.3.1.3 in den oben genannten Medien als Schüttelkultur beziehungsweise als Standkultur bei 24 °C kultiviert. Bei gutem Bewuchs der Kolben erfolgte die Ernte der Kulturen und deren sensorische Beurteilung von mindestens drei Personen. In Tabelle 10 sind die resultierenden Geruchseindrücke der Basidiomyceten in den verschiedenen Medien gelistet. Alle untersuchten Basidiomyceten produzierten in Submerskultur mehr Biomasse. In allen Standkulturen wurden Gerüche nach Vergorenem oder nach Hefe wahrgenommen. Weiterhin wuchsen Submerskulturen in Form von Pellets, während bei der Emerskultivierung nur die Oberfläche bewachsen war.

Tabelle 10: Geruchseindrücke der Basidiomycetenkulturen in Standardnährlösung (SNL), Hefe-Malz-Medium (YM-Medium) und Malzextrakt-Sojapepton-Medium (MS-Medium).

| Basidiomycet | | Geruchseindruck | | |
|---|---------|------------------------------|---|------------------------------|
| | | SNL | YM-Medium | MS-Medium |
| <i>Auriporia aurulenta</i> (Aau) | Submers | Orange, fruchtig | Orange, fruchtig | Fruchtig, Süßlich, Aprikose |
| | Emers | Hefe, leicht fruchtig | Nährmedium, Hefe, vergoren | Süßlich, Hefe, Orange |
| <i>Hericium erinaceus</i> (Her) | Submers | - | Hefe, süßlich, muffig | Blumig, Narzisse, beerig |
| | Emers | Hefe | Hefe, Nährmedium | Hefe, Nährmedium, vergoren |
| <i>Postia floriformis</i> (Pfl) | Submers | Süßlich, alkoholisch, blumig | Fruchtig, alkoholisch, Anis | Leicht fruchtig |
| | Emers | Alkoholisch, Nährmedium | Hefe, Nährmedium | Fruchtig, Honig |
| <i>Wolfiporia cocos</i> (Wco) | Submers | Zitrus, süßlich | Süßlich, Kokosnuss, Anis, leicht Zitrus | Aprikose, süßlich |
| | Emers | Vergoren, Nährmedium | Vergoren | Süßlich, leicht Zitrus, Hefe |

Aau wies nach 14 Tagen Kultivierung in den Submerskulturen in SNL und im YM-Medium orangenartige fruchtige Noten auf, während in MS-Medium der Geruch als aprikosenartig beschrieben wurde. Außerdem färbten sich die Medien während der Kultivierung leicht orange.

Her besaß nach 14 Kulturtagen im MS-Medium einen blumigen, narzissenartigen, aber auch beerigen Geruch. In allen anderen Medien verfügte Her über einen muffigen oder neutralen Geruch. Bei längerer Kultivierung entwickelte sich ein essigartiger Geruch. Sein spärliches Wachstum deutet darauf hin, dass der Basidiomycet ein spezielles Medium benötigt.

Pfl dagegen zeigte nach Ernte an Tag 14 in allen submersen Kulturen fruchtige, blumige Noten, wobei deren Intensität in SNL am größten war. In YM-Medium wurde zusätzlich ein anisartiger Geruch wahrgenommen.

Die Submerskultur von Wco wies bei der Ernte nach acht Tagen in Hauptkultur in SNL einen zitrusartigen, süßlichen Geruch auf, während im YM-Medium ein zusätzlicher kokosnuss- und anisartiger Geruch wahrgenommen wurde. Im MS-Medium dagegen wurde ein aprikoseartiger, süßlicher Geruch wahrgenommen. Alle Kulturen wiesen ein starkes Wachstum auf. Die verschiedenen Mediumkomponenten haben demnach einen unterschiedlichen Einfluss auf den Basidiomyceten. Vor allem das YM-Medium ruft mit Kokosnuss und Anis wesentlich andere Geruchseindrücke hervor als die anderen beiden Medien.

Die Untersuchung der Aromabestandteile im Kulturmedium der Basidiomyceten erfolgte über eine Lösungsmittelextraktion mit Pentan/Diethylether (P/E, siehe 2.4.1.1) und anschließender gaschromatischer Untersuchungen (GC-FID/O, GC-MS) nach 2.4.2. Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Basidiomyceten und ihre Aromaprofile eingegangen. Vielversprechende Kandidaten wurden weiter untersucht.

3.1.1.1 Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Aromabildung von Aau

Aau wächst in der Natur hauptsächlich auf Nadelholz als gelb-oranger resupinater Fruchtkörper. Der „Duftende Goldporling“ lockt bereits im Wald mit seinem aprikosenartigen, süßlich fruchtigen Geruch. Auch die Submerskulturen von Aau wiesen bei Kultivierung in SNL einen starken fruchtigen, orangenartigen Geruch auf. Mittels GC-FID/O wurden 26 flüchtige Substanzen detektiert (siehe Abbildung 8).

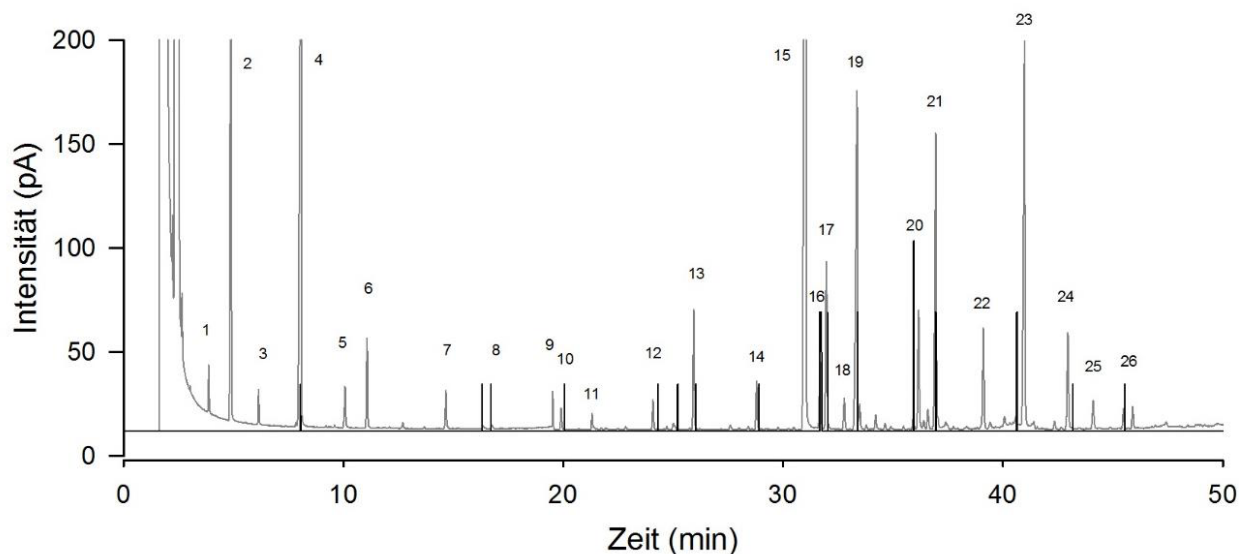


Abbildung 8: GC-FID/O-Chromatogramm des P/E-Extraktes von 200 mL Aau-Kultur in SNL nach 14 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*, 1 µL; Trägergas: H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel). FID-Signal in grau, ODP-Signal in schwarz.

Durch einen Abgleich der Massenspektren mit der Datenbank des *National Institute of Standards and Technology* (NIST-Datenbank) sowie Vergleiche von Kovats-Indices (KIs) mit der Literatur wurden 18 Substanzen identifiziert (siehe Tabelle 11) und anhand der internen Standards Cyclohexanol und Cyclopentanol semiquantifiziert.

Es wurde eine Reihe von aliphatischen Alkoholen identifiziert, welche nicht maßgeblich zum Gesamtaromaeindruck beitragen. 2-Methyl-1-propanol, 1-Butanol, 3-Methyl-1-butanol und 2,3-Butandiol wurden bereits in Extrakten zahlreicher Basidiomyceten nachgewiesen und besitzen meist Aminosäuren als Präkursoren (Abraham und Berger, 1994; Berger *et al.*, 1986; Schrader, 2007). Auch die Bildung von 1-Octen-3-ol in Basidiomyceten und dessen typischer Pilzgeruch wurden bereits hinlänglich untersucht. Dabei wurde eine oxidative Spaltung von Linolsäure mittels Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase belegt (Wurzenberger und Grosch, 1984). Die Reaktion findet verstärkt bei Zellschädigungen und daraus resultierendem Kontakt von Linolsäure mit intrazellulären Enzymen in Anwesenheit von Sauerstoff statt (Wurzenberger und Grosch, 1983). Darüber hinaus enthält das Aromaprofil von Aau in SNL viele für ein fruchtiges und blumiges Aroma typische Substanzen, darunter 3-Phenylbutansäure (Benzylacetat), 2-Phenylethylacetat, 3-Phenyl-1-propanol (Hydrocinnamylalkohol), Phenylmethanol, 2-Phenylethanol, 3-Phenyl-1-propylacetat (Hydrocinnamylacetat) und (2*E*)-3-Phenyl-2-propen-1-ol (Zimtalcohol). Daneben wurden 5-Butylfuran-2(5H)-on (2-Octen-4-olid) und Z3, Z6, E8-Dodecatrien-1-ol (Dodecatrienol) identifiziert. Sie sind beide mit 3,21 mg L⁻¹ und 3,37 mg L⁻¹ in hohen Konzentrationen enthalten.

Tabelle 11: Aromaprofil des P/E-Extraktes von Aau in SNL (14 Tage, 150 rpm, 24 °C). Identifizierung mittels GC-MS-Analyse (VFms-Wax) über Datenbankenabgleich der Massenspektren (MS) und Berechnung der Retentionsindizes (KI). Semiquantifizierung erfolgte mit Cyclohexanol als externem Standard.

| Peak Nr. | Konzentration (mg L ⁻¹) | Substanz | Identifikation | Geruch |
|----------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------|-------------------|
| 2 | 4,70 | 2-Methyl-1-propanol | MS, KI | würzig |
| 3 | 0,20 | 1-Butanol | MS, KI | |
| 4 | 5,53 | 3-Methyl-1-butanol | MS, KI | muffig |
| 5 | 0,30 | 3-Hydroxy-2-butanon | MS, KI | |
| 8 | 0,03 | 1-Octen-3-ol | MS, KI | Pilz |
| 9 | 0,10 | Essigsäure | MS, KI | |
| 10 | 0,11 | 2,3-Butandiol | MS, KI | |
| 12 | 0,21 | 2-Furanmethanol | MS, KI | Käse, süßlich |
| 13 | 0,86 | 3-Phenylpropansäure | MS, KI | fruchtig |
| 14 | 0,36 | 2-Phenylethylacetat | MS, KI | süßlich |
| 15 | 13,16 | Phenylmethanol | MS, KI | fruchtig, süßlich |
| 16 | 0,50 | 2-Phenylethanol | MS, KI | Kokosnuss, Mango |
| 17 | 1,24 | 3-Phenyl-1-propylacetat | MS, KI | Rose |
| 19 | 3,21 | 5-Butylfuran-2(5H)-on | MS | Kokosnuss |
| 20 | 0,95 | 3-Phenyl-propan-1-ol | MS | |
| 22 | 0,79 | (2 E)-3-Phenyl-2-propenyl-acetat | MS | |
| 23 | 3,37 | 3,6,8-(Z,Z,E)-Dodecatrien-1-ol | MS | nussig |
| 24 | 0,76 | (2 E)-3-Phenyl-2-propen-1-ol | MS | blumig |

2-Octen-4-olid wies einen Geruch nach Kokosnuss auf, während Dodecatrienol (siehe Abbildung 9) einen nussigen Geruch besaß. Dodecatrienon ist außerdem in der Literatur als Termiten-Pheromon bekannt (Cristaldo *et al.*, 2014), kommt aber auch in der koreanischen Minze *Agastache rugosa* und im Mexikanischen Blattpfeffer *Piper auritum* vor (Lim *et al.*, 2013; Monzote *et al.*, 2010). Termiten sind in der Lage Pilzgärten zu kultivieren, welche ihnen dann als Nahrungsquelle dienen (Aanen *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich normalerweise um *Termitomyces*-Arten. Jedoch wiesen Matsumura *et al.* (1976) die Bildung von Dodecatrienol bei Zugabe von Ethylenglycol zum Medium als Vorstufe auch in *Gloeophyllum trabeum* nach. Weitere Pilze sind für die Bildung von Dodecatrienon in der Literatur nicht bekannt.

2-Octen-4-olid wurde dagegen bereits in mehreren Basidiomyceten (beispielsweise *Tyromyces sambuceus*, *Nigroporus durus*) detektiert (Abraham und Berger, 1994). Die Autoren postulierten eine teilweise enzymatische Bildung der Lactone, bei der die Zyklisierung der 4/5-Hydroxycarbonsäuren, vermutlich aufgrund des im Laufe der Kultivierung angesäuerten Mediums, chemisch erfolgte. Für einige Pilze ist außerdem eine Bildung von Lactonen aus ungesättigten Fettsäuren wie γ -Decalacton aus Rizinolsäure oder δ -Dodecalacton aus Linolsäure beschrieben (Longo und Sanromán, 2006).

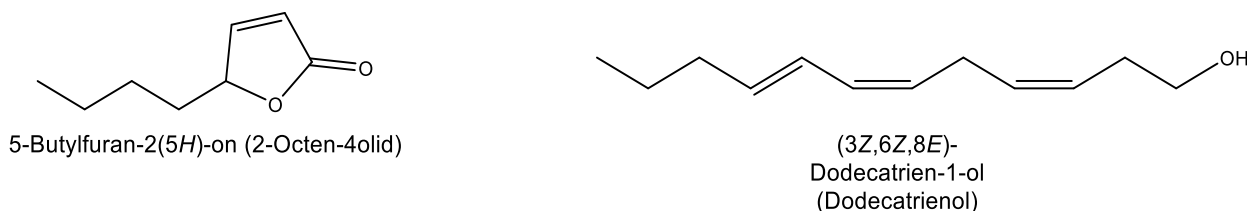


Abbildung 9: Strukturformeln von 2-Octen-4-olid und Dodecatrienol.

Im Gegensatz zu den gebildeten Aromastoffen in den Schüttelkulturen machten den Hauptanteil an aromaaktiven Substanzen in den Standkulturen Butansäure, Isobutansäure und 2-Methylbutansäure aus, die einen ranzigen, käseartigen Geruch besitzen (Mosciano *et al.*, 1995). Es wurden wie in den Schüttelkulturen auch fruchtige, blumige Substanzen detektiert, allerdings in wesentlich geringeren Mengen. Daher wurde der Gesamtaromaeindruck vom käsigen, muffigen Geruch von Butansäure und dessen Derivaten bestimmt. Die Standkulturen wurden aufgrund des Aromaprofils und des spärlichen Wachstums nicht weiter untersucht.

In den Schüttelkulturen aller Medien (SNL, YM-Medium und MS-Medium) wurden dieselben Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen detektiert. Dies deutete auf einen Einfluss der Nährstoffe auf die Aromastoffproduktion hin. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgte deshalb eine Reproduktion der Kultivierungsversuche. Die Chromatogramme der beiden Kultivierungsansätze wiesen insgesamt dieselben Peaks mit ähnlichen Intensitäten auf. Diese Ergebnisse bestätigten die Abhängigkeit der Aromastoffproduktion von den verschiedenen Medien. Allerdings wurden bei allen Substanzen der ersten Kultivierung höhere Konzentrationen ermittelt. Dies war vermutlich auf unterschiedliche Menge an organischem Material zurückzuführen.

Beim Vergleich der Konzentrationen der Substanzen im Bereich zwischen 30 und 42 min zeigt sich in SNL ein großer Unterschied in den Konzentrationen von 2-Octen-4-olid, während die übrigen Substanzen in ähnlichen Konzentrationsverhältnissen vorliegen (siehe Abbildung 10, links). Obwohl die Kulturbedingungen identisch gehalten wurden, war die Konzentration an 2-Octen-4-olid bei der ersten Kultivierung (Datenreihe 1) achtfach höher als bei der zweiten Kultivierung (Datenreihe 2). Dessen Bildung wird demnach von einem unbekanntem Faktor ange-regt.

Insgesamt sind die Konzentrationen der detektierten Aromastoffe im YM-Medium geringer als in SNL. Hydrocinnamylacetat wurde in YM-Medium nicht detektiert (siehe Abbildung 10, rechts).

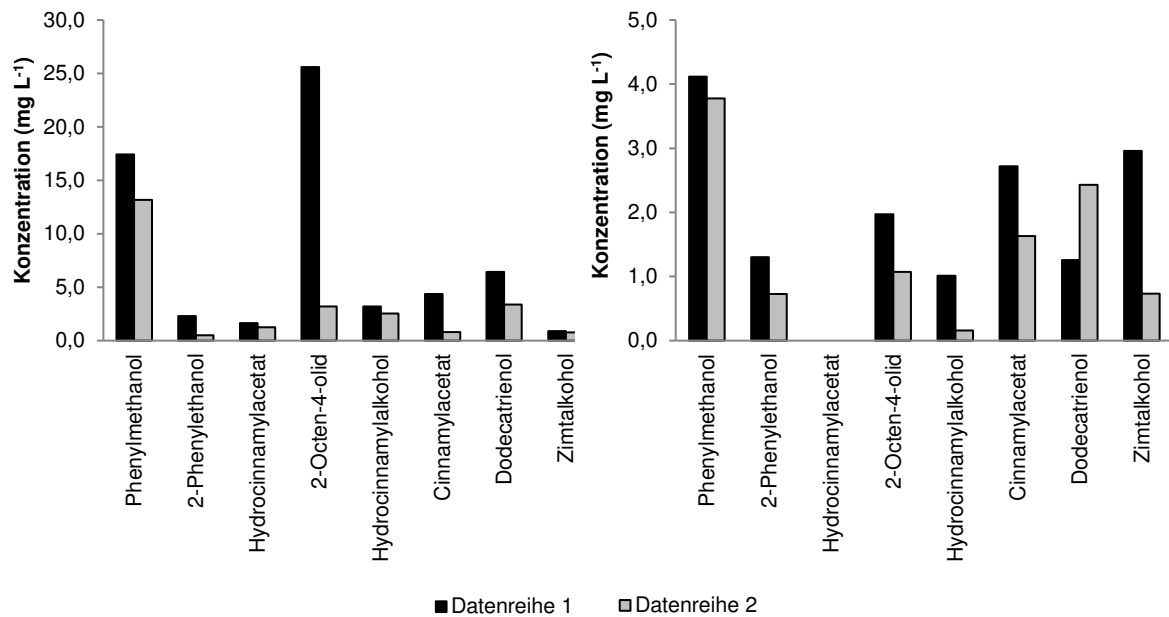


Abbildung 10: Konzentrationen an ausgewählten Aromastoffen der P/E-Extrakte zweier Aau-Kulturen in SNL (links) beziehungsweise YM-Medium (rechts) nach 14 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm). Gezeigt sind die Konzentrationen zweier unabhängiger Bestimmungen (Datenreihe 1 und 2).

Zum Vergleich der Zimtsäure-Derivate in beiden Kulturmedien, wurden die Konzentrationen der Einzelsubstanzen auf die Summe von Hydrocinnamylalkohol, Cinnamylacetat und Zimtalkohol bezogen (siehe Abbildung 11). Hierbei zeigt sich, dass in SNL Hydrocinnamylalkohol als Hauptprodukt entstand, während in YM-Medium Cinnamylacetat überwog und Hydrocinnamylalkohol

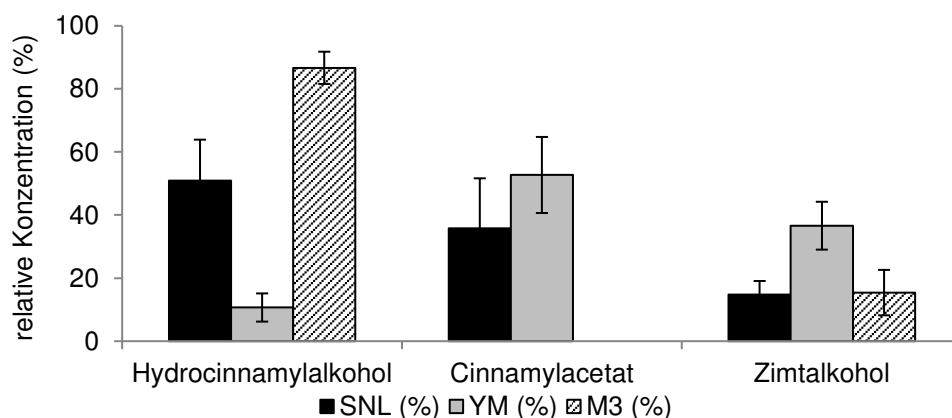


Abbildung 11: Relative Konzentration (%) an Hydrocinnamylalkohol, Cinnamylacetat und Zimtalkohol bezogen auf die Summe der drei Substanzen nach 14 Tagen Kultivierung in SNL, YM-Medium und MS-Medium im Schüttler (24°C, 150 rpm). Gezeigt sind die relativen Konzentrationen zweier unabhängiger Bestimmungen und deren Spannweite in %.

nur in geringeren Mengen gebildet wurde. Im MS-Medium wurde vor allem Hydrocinnamylalkohol gebildet, wohingegen Zimtalkohol nur in geringen Mengen vorkam und Cinnamylacetat nicht nachweisbar war. Die Konzentrationen aller genannten Substanzen stiegen im Verlauf der Kultivierung von Aau in SNL an. Nur die Phenylmethanol-Konzentration stieg nach zwölf Tagen nicht mehr weiter an.

Dotierung von L-Phenylalanin:

Da es sich bei den detektierten Substanzen um Zimtsäure-Derivate handelte, wurde ein Zusammenhang mit dem Phenylalanin-Abbau vermutet (Etschmann *et al.*, 2002). Deshalb wurde im Weiteren bei den Aau Schüttelkulturen Asparagin durch L-Phenylalanin (2,4 mM) ersetzt (siehe 2.5.1.1). Außerdem wurde ein Gemisch (1:1) aus Asparagin und Phenylalanin (0,1 mM beziehungsweise 5 mM) verwendet.

Nach acht Kulturtagen war die Konzentration an Phenylmethanol, Phenylethanol, Cinnamylacetat und Cinnamylalkohol in den Aau-Kulturen mit supplementierten Phenylalanin (2,4 mM beziehungsweise 5 mM) deutlich höher als ohne Phenylalanin (siehe Abbildung 12). Eine Supplementierung mit kleinerer Konzentration an Phenylalanin (0,1 mM) ergab keine Konzentrationserhöhung der oben genannten Substanzen. Im Vergleich dazu sind die Konzentrationen von 2-Octen-4-olid und Dodecatrienol durch den Zusatz an Phenylalanin geringer als ohne Phenylalaninzusatz. Dies war zu erwarten, da diese Substanzen, wie zuvor erläutert, höchst-

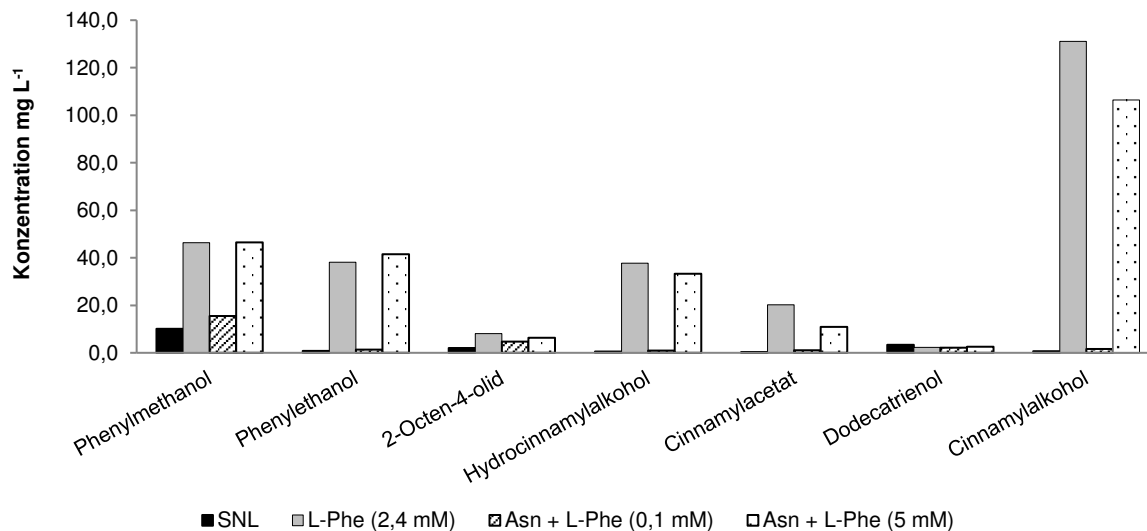


Abbildung 12: Konzentrationen in 9 mL Kulturüberstand nach acht Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm) von Aau in SNL, SNL mit L-Phe (2,4 mM) ohne Asn, SNL mit Asn + L-Phe1 (0,1 mM) und SNL mit Asn + L-Phe2 (5 mM).

wahrscheinlich nicht aus dem Phenylalanin-Abbau resultieren.

Mit Phenylalaninzusatz stiegen die Konzentrationen aller Zimtsäure-Derivate um ein Vielfaches an (siehe Abbildung 12). Die Konzentrationen an Cinnamylalkohol und Cinnamylacetat sanken nach Tag acht wieder ab, da diese vermutlich zum Hydrocinnamylalkohol abgebaut wurden

(siehe Abbildung 13). Dadurch wird der Abbau von Phenylalanin über den Zimtsäure-Weg unterstützt. An Tag vier und acht wurde zusätzlich Phenylethanol detektiert (siehe Abbildung 14), welche vermutlich weiter abgebaut wurde, da diese im weiteren Verlauf nicht mehr detektiert wurde.

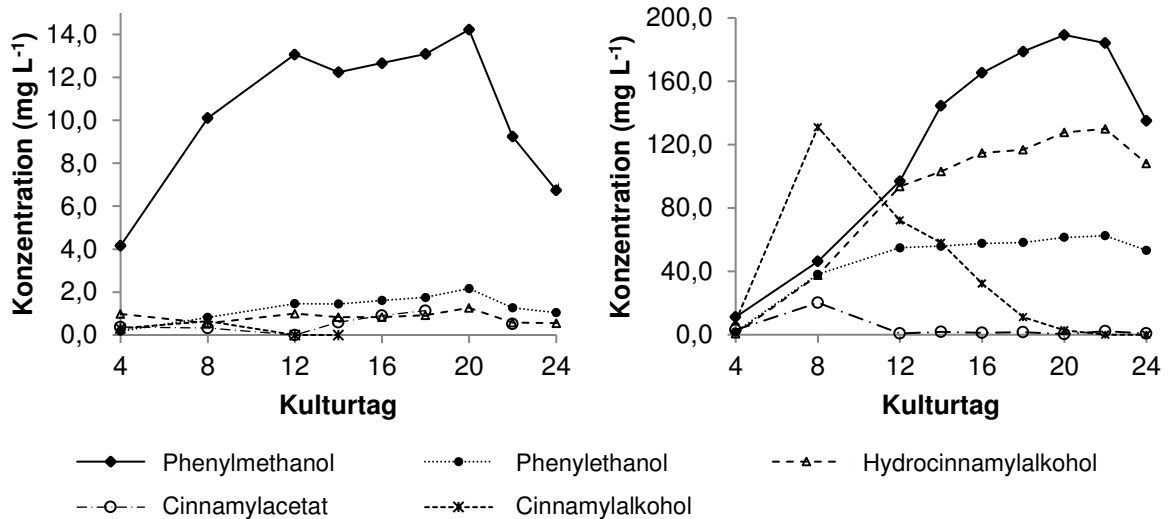


Abbildung 13: Konzentrationen in P/E-Extrakt von 9 mL Kulturüberstand nach 24 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm) von Aau in SNL (links) beziehungsweise SNL mit L-Phe (2,4 mM) (rechts).

In der Literatur sind zwei Hauptabbauwege von L-Phenylalanin bekannt: Der bereits 1907 postulierte Weg nach Ehrlich und der Abbau über den Zimtsäure-Weg (siehe Abbildung 15). Der Weg nach Ehrlich (1907) beschreibt die Transaminase katalysierte Konversion von L-Phenylalanin zu Phenylketopyruvat mit anschließender Decarboxylierung zu Phenylacetaldehyd und

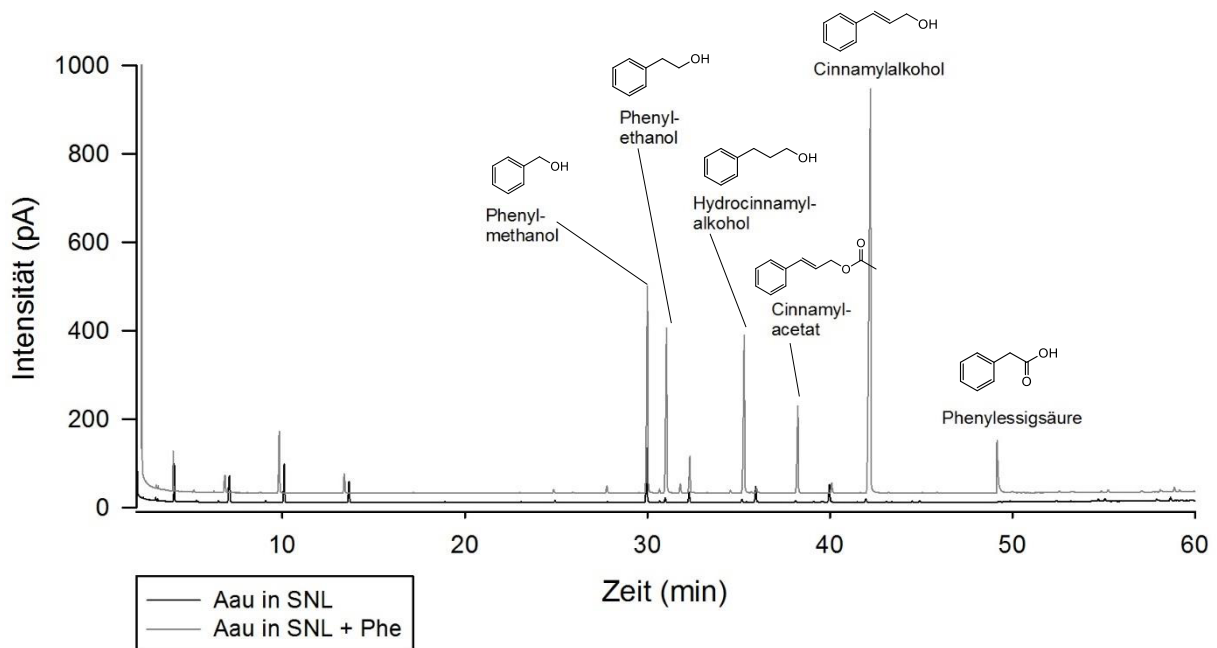
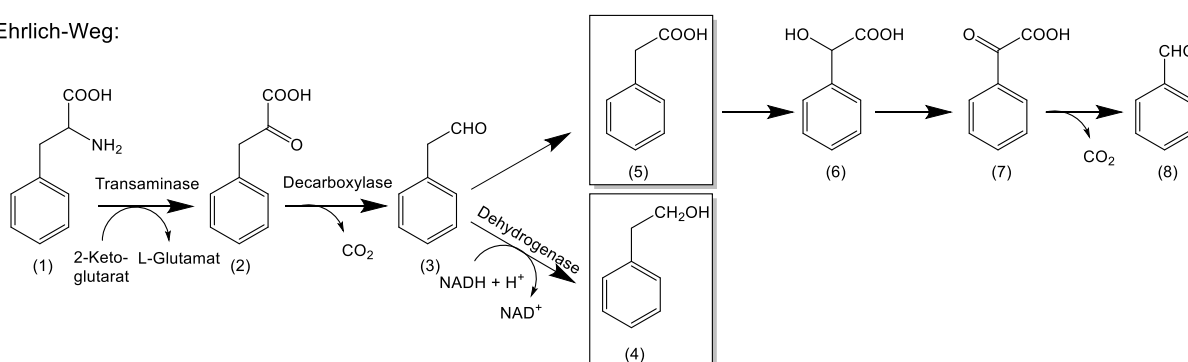


Abbildung 14: GC-FID-Chromatogramme (Optima Wax): Aau in SNL (schwarz), Aau in SNL mit L-Phe (grau). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; on column, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel).

nachfolgender Reduktion zu 2-Phenylethanol. Der Zimtsäure-Weg verläuft mittels Phenyl-Ammoniak-Lyase (PAL) über Zimtsäure zu verschiedenen Zimtsäure-Derivaten. Eine Betrachtung der detektierten Stoffwechselprodukte des Basidiomyceten zeigt Hinweise auf beide genannten Transformationswege. Zu Beginn des Kulturverlaufs wurde zunächst Cinnamylalkohol (11) gebildet. Dies deutet darauf hin, dass Phenylalanin über den Zimtsäureweg abgebaut wurde. Im weiteren Kulturverlauf sank die Cinnamylalkohol-Konzentration jedoch wieder ab, da es vermutlich zu Hydrocinnamylalkohol (12) reduziert wurde. Cinnamylacetat wurde nur solange gebildet, solange Cinnamylalkohol vorhanden war. Neben Hydrocinnamylalkohol ist Phenylmethanol (16) Endabbauprodukt des Zimtsäure-Wegs. Phenylethanol (4) und Phenylessigsäure (5) stammen hingegen vermutlich aus dem Ehrlich-Abbau. Weitere Abbauprodukte dieses Reaktionsweges wurden allerdings nicht identifiziert.

Ehrlich-Weg:



Zimtsäure-Weg:

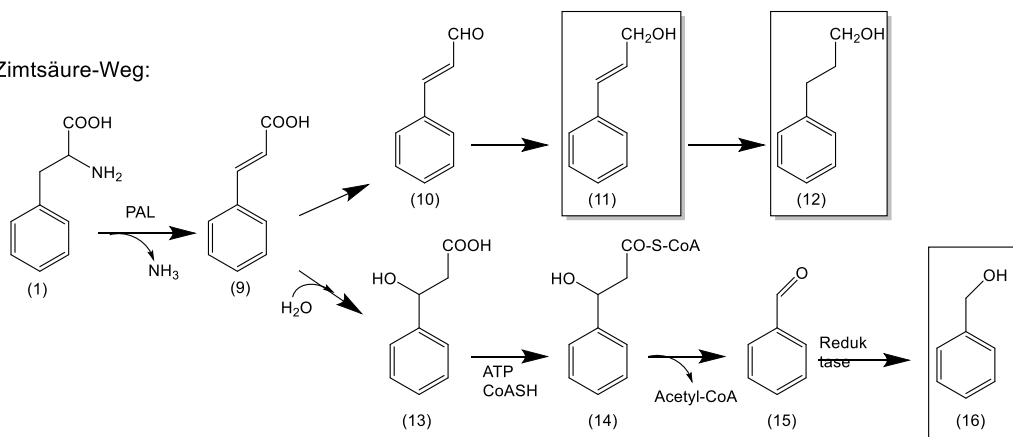


Abbildung 15: Mögliche Abbauege von L-Phenylalanin (modifiziert nach Ehrlich (1907), Krings *et al.* (1996) und Etschmann *et al.* (2002)).

Die Bildung erfolgte vermutlich über beide in der Literatur beschriebenen Mechanismen (Etschmann *et al.*, 2005; Krings *et al.*, 1996). Für Hefen wurden beide Mechanismen nachgewiesen, wobei der Abbau von L-Phenylalanin bevorzugt nach Ehrlich abläuft, wenn L-Phenylalanin die einzige Stickstoffquelle darstellt. Anderenfalls wird die Bildung von Phenylethanol mittels Zimtsäureweg gefördert (Albertazzi *et al.*, 1994; Äyräpää, 1965). Für Aau wurde demnach ein ähnlicher Abbaueweg von L-Phenylalanin vermutet.

Es wurde bewiesen, dass die Konzentrationen an Phenylmethanol, Phenylethanol und Hydrocinnamylalkohol durch Supplementierung von L-Phenylalanin (2,4 mM) um das 13-, 28- beziehungsweise 100-Fache gesteigert werden kann. Phenylmethanol kommt in verschiedenen Früchten sowie in grünem und schwarzem Tee vor. Es wird aufgrund seines fruchtigen Geruchs in Konzentrationen bis zu 1254 mg kg⁻¹ (Kaugummi) in Lebensmitteln (Burdock, 2001) sowie in Kosmetika und Putzmitteln (Scognamiglio *et al.*, 2012) eingesetzt. Hydrocinnamylalkohol besitzt einen blumig, süßlichen Geruch und kommt in Guave sowie in Erdbeeren, Passionsfrucht, Brombeeren und anderen Früchten vor. Es findet als Aromastoff in Kosmetika und Lebensmitteln Einsatz (Bhatia *et al.*, 2011; Burdock, 2001). Phenylethanol wird aufgrund seines rosenartigen Geruchs in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie verwendet. Man findet es in Rosenöl sowie in geringen Mengen in zahlreichen Pflanzen wie Hyazinthen, Jasmin und Narzissen (Burdock, 2001). Es wurden bereits zahlreiche biotechnologische Prozesse evaluiert, um die traditionelle Pflanzenextraktion durch wirtschaftlich rentablere Prozesse zu ersetzen. Durch *Saccharomyces cerevisiae* wurden bis zu 12,6 g L⁻¹ Phenylethanol erzielt (Stark *et al.*, 2002). Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass Aau ein hohes Potenzial zur Bildung von Phenylmethanol, Phenylethanol und Hydrocinnamylalkohol besitzt. Aufgrund der eher geringen Ausbeuten bedarf es einer weiteren Optimierung für einen möglichen Einsatz in der Industrie. Eine mögliche Anwendung könnte eine Kultivierung von Aau auf Nebenströmen der Lebensmittelindustrie mit hohen L-Phenylalaningehalten (z. B. Sojakuchen) in Verbindung mit einer effektiven *in-situ*-Produktabtrennung darstellen.

Einfluss des Hefeextraktes auf das Aromaprofil von Aau

In früheren Arbeiten im Institut wurde unter den gleichen Kultivierungsbedingungen (SNL, 24 °C, 150 rpm) ein gänzlich unterschiedliches Aromaspektrum zu dem gerade dargestellten erzielt (siehe Abbildung 16 oben). Dieses konnte trotz strenger Kontrolle der Bedingungen nicht reproduziert werden. In den bisher verwendeten alternativen Kulturmedien wurde ebenfalls kein ähnliches Aromaspektrum erzielt. Deshalb wurden zwei weitere Medien hinzugezogen: SNL ohne Hefeextrakt und ein modifiziertes Kjalke-Medium. Dabei war auffällig, dass ohne den Hefeextrakt der orangenartige, fruchtige Geruch nicht wahrnehmbar war. Der Hefeextrakt lieferte demnach einen ausschlaggebenden Beitrag zur Aromastoffbildung. Dies war vermutlich auf die im Hefeextrakt vorhandene Vielzahl an Proteinen und Aminosäuren zurückzuführen, welche als Ausgangsstoffe für Aromastoffe dienen können (Münch und Schieberle, 1998). Als mögliche Ursache für das nicht reproduzierbare Aromaspektrum wurde deshalb die Variabilität des in der SNL verwendeten Hefeextraktes vermutet. Um dessen Einfluss auf das Aromaprofil zu testen, wurde Aau in SNL mit Hefeextrakten zweier unterschiedlicher Hersteller kultiviert. Dabei wurde in der Tat ein Aromaspektrum detektiert, welches dem 2010 aufgenommenem stark ähnelte (siehe Abbildung 16, Mitte). Bei den zwei Peakgruppen zwischen 40 und 46 min handelt es sich um mehrere mittels GC-MS nicht identifizierbare Substanzen. Allerdings wurden in diesem Bereich nur schwache Gerüche *via* GC-O wahrgenommen. Aus den Ergebnissen wurde jedoch

gefolgert, dass die Zusammensetzung des Hefeextraktes maßgeblich zur Bildung von Aromastoffen beiträgt. Dies zeigt erneut das Potenzial von Aau als Aromastoffproduzent sowie die Bedeutung des Mediums für die Aromastoffproduktion. Durch Kultivierung von Aau auf Nebenströmen der Lebensmittelindustrie könnten weitere Prozesse zur Gewinnung von Aromastoffen entwickelt werden.

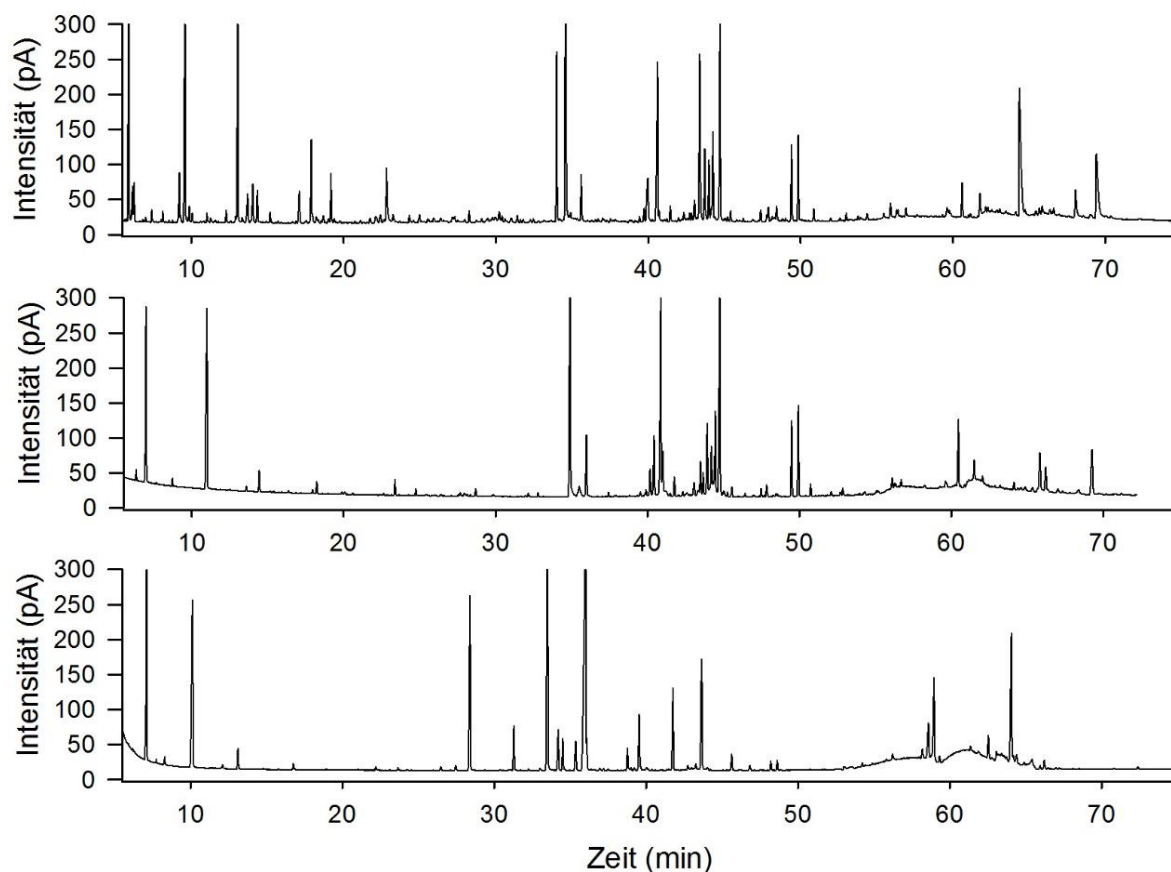


Abbildung 16: GC-FID Chromatogramme: P/E-Extrakt von Aau in SNL gemessen von Silke Schimanski 11/2010 (oben). P/E-Extrakt von Aau in SNL mit Hefeextrakt von Roth 11/2013 (Mitte). P/E-Extrakt von Aau in SNL mit Hefeextrakt von Merck 2/2013 (unten). 40 °C (3 min)// 3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*; H₂; Fluss: 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890.

3.1.1.2 Einfluss von verschiedenen Medien auf das Aromaprofil von *Hericium erinaceus*

Der Igel-Stachelbart *Hericium erinaceus* (Her) ist ein Speisepilz und in der Literatur als Produzent für bioaktive Substanzen wie Erinacine bekannt (Krzyczkowski *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2015; Wolters *et al.*, 2015). In getrockneten Fruchtkörpern von Her wurden 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Ethylpyrazin und 2,6-Diethylpyrazin als Schlüsselaromastoffe identifiziert (Miyazawa *et*

al., 2008). In dieser Arbeit wurden nun Aromaprofile von Her in verschiedenen Medien erstellt. Im Aromaprofil von Her in SNL (siehe Abbildung 17) wurden 13 Substanzen detektiert, welche anhand der NIST-Datenbank und KIs identifiziert wurden (siehe Tabelle 12). Der Basidiomycet

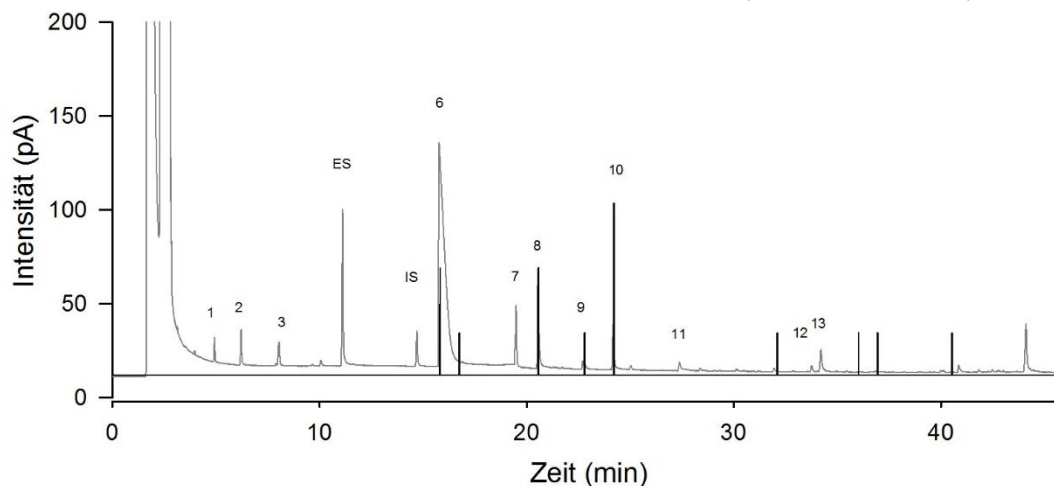


Abbildung 17: GC-FID/O-Chromatogramm des P/E-Extraktes von Her in SNL nach 14 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel). FID-Signal in grau, ODP-Signal in schwarz.

wies in SNL sowie in allen anderen verwendeten Medien einen neutralen bis muffigen Geruch auf. Dieser lässt sich durch 2-Methylpropansäure und Essigsäure erklären. Substanzen mit süßlich blumigen Noten wie Phenylethanol und Cyclohexylhexanoat sowie das nussig riechende 2-Acetylpyrrol wurden nur in geringen Mengen detektiert (0,02 mg L⁻¹, 0,04 mg L⁻¹ beziehungsweise 0,06 mg L⁻¹). Es wurden wie in den Aau-Aromaextrakten aliphatische Alkohole wie 2-Methyl-1-propanol, 1-Butanol und 3-Methyl-1-butanol detektiert. Desweiteren wurde Methylpyridin-3-carbonsäure (Methylnicotinat) identifiziert. Dieser süßlich nussige Aromastoff wurde mittels GC-O nicht detektiert, da er vermutlich in einer zu geringen Konzentration vorlag. Er wird in einigen Lebensmitteln wie bei Backwaren eingesetzt und wurde bereits im Krustenschelbart *Sarcodontia setosa* nachgewiesen (Abraham und Berger, 1994). Methylnicotinat wird des Weiteren als Arzneimittel zur Durchblutungsförderung verwendet. Mit 60 µg L⁻¹ ist dessen Konzentration allerdings eher gering. Durch Optimierung der Kultivierungsparameter könnte eine Anwendung in der Aromaindustrie von Interesse sein. Die in den Fruchtkörpern identifizierten Aromastoffe 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Ethylpyrazin und 2,6-Diethylpyrazin wurden nicht nachgewiesen. Möglicherweise ist ein komplexeres Medium notwendig, um die Produktion entsprechender Substanzen zu fördern. Darüber hinaus wurden keine neuen oder für die industrielle Anwendung relevanten Aromastoffe identifiziert, sodass dieser Pilz im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Tabelle 12: Aromaprofil des P/E-Extraktes von Her in SNL (14 Tage, 150 rpm, 24 °C). Identifizierung mittels GC-MS-Analyse (VFms-Wax) über Datenbankenabgleich der Massenspektren (MS) und Berechnung der Retentionsindizes (KI). Semiquantifizierung erfolgte mit Cyclohexanol als externem Standard.

| Peak Nr. | Konzentration (mg L ⁻¹) | Substanz | Identifikation | Geruch |
|----------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------|
| 1 | 0,11 | 2-Methyl-1-propanol | MS, KI | |
| 2 | 0,19 | 1-Butanol | MS, KI | |
| 3 | 0,22 | 3-Methyl-1-butanol | MS, KI | |
| 6 | 7,33 | Essigsäure | MS, KI | Essigsäure |
| 7 | 0,31 | Propansäure | MS, KI | |
| 8 | 0,74 | 2-Methylpropansäure | MS, KI | |
| 9 | 0,04 | Cyclohexylhexanoat | MS, KI | Käse, süßlich |
| 10 | 0,37 | 2-Methylhexansäure | MS, KI | Muffig, Hefe |
| 11 | 0,06 | Methylpyridin-3-carbonsäure | MS, KI | |
| 12 | 0,02 | Phenylethanol | MS, KI | Honig, blumig, Rose |
| 13 | 0,06 | 2-Acetylpyrrol | MS, KI | |

3.1.1.3 Einfluss von verschiedenen Medien auf das Aromaprofil von *Postia floriformis*

Der Rosetten-Saftporling *Postia floriformis* (Pfl) wurde bislang in der Literatur wenig beachtet. Dessen SNL-Submerskulturen wiesen bei der sensorischen Prüfung bereits einen sehr blumi-

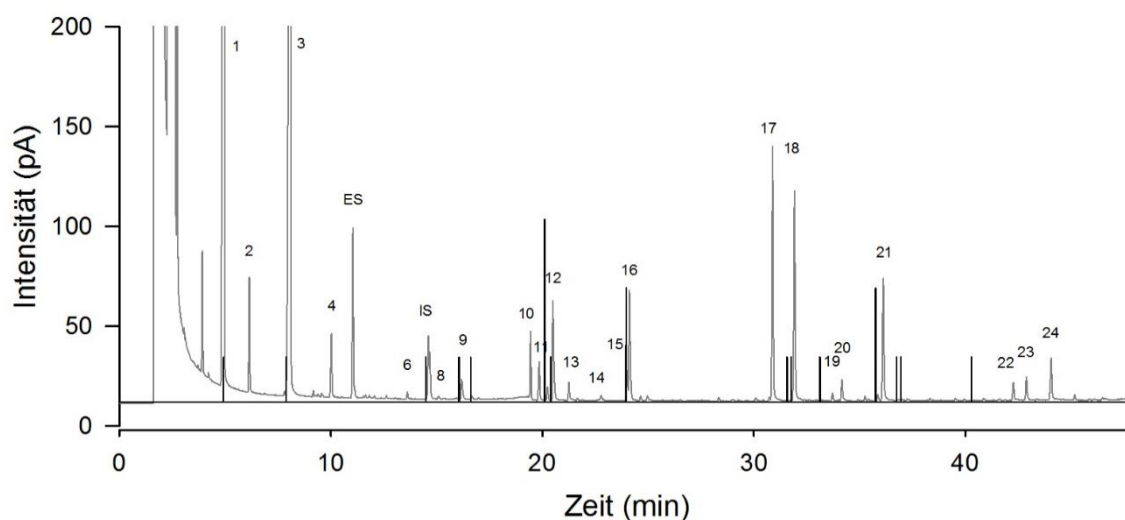


Abbildung 18: GC-FID/O-Chromatogramm des P/E-Extraktes von Pfl in SNL nach 14 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel). FID-Signal in schwarz, ODP-Signal in grau.

gen Geruchseindruck auf. Im Aromaextrakt nach 14 Tagen Submerskultivierung in SNL wurden mittels GC-FID/O 24 Substanzen detektiert (siehe Abbildung 18). Diese wurden mittels GC-MS-Analyse und Abgleich von Massenspektren in der NIST-Datenbank und KIs identifiziert (siehe Tabelle 13). Die Kultivierung in den drei Medien ergab allerdings keine Unterschiede im Aromaprofil. Der blumige Geruchseindruck beruhte auf dem Vorhandensein von Phenylmethanol, Phenylethanol und 3-Phenyl-1-propanol im Aromaprofil, welche bekannt für ihren blumigen Geruch sind (siehe Kapitel 3.1.1.1). 3-Octanol und 1-Octen-3-ol sind für den typischen Pilzgeruch verantwortlich. 1-Octen-3-ol entsteht, wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben durch die enzymatische oxidative Spaltung von Linolsäure (Wurzenberger und Grosch, 1984). Durch Folgereaktionen entstehen dann weitere C 8-Körper. Demnach lassen 1-Octen-3-ol und dessen Derivate auf eine beginnende Zellyse, vermutlich aufgrund von einer hohen Zelldichte im Medium in späten Kultivierungsphasen, schließen. Diese Komponenten trugen jedoch noch nicht zum Gesamtaromaeindruck der Kultur bei, da die Ernte der Kulturen rechtzeitig erfolgte.

Tabelle 13: Aromaprofil des P/E-Extraktes von Pfl in SNL (14 Tage, 150 rpm, 24 °C). Identifizierung mittels GC-MS-Analyse (VFms-Wax) über Datenbankenabgleich der Massenspektren (MS) und Berechnung der Retentionsindizes (KI). Semiquantifizierung erfolgte mit Cyclohexanol als externem Standard.

| Peak Nr. | Konzentration (mg L ⁻¹) | Substanz | Identifikation | Geruch |
|----------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| 1 | 12,93 | 2-Methyl-1-propanol | MS, KI | Lösungsmittel, bitter |
| 2 | 0,47 | 1-Butanol | MS | |
| 3 | 9,65 | 3-Methyl-1-butanol | MS, KI | Muffig |
| 4 | 0,37 | 3-Hydroxy-2-butanon | MS | |
| 6 | 0,36 | 3-Octanol | MS, KI | Muffig, Pilzig |
| 8 | 0,02 | 1-Octen-3-ol | MS, KI | Pilzig, muffig, erdig |
| 9 | 0,13 | Essigsäure | MS | |
| 10 | 0,27 | 3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol | MS, KI | Frisch, grün, blumig, Zitrusartig |
| 11 | 0,22 | 2,3-Butandiol | MS | |
| 12 | 0,67 | 2-Methylpropansäure | MS | |
| 13 | 0,11 | 2,3-Butanediol | MS | |
| 14 | 0,04 | Cyclohexylhexanoat | MS | |
| 15 | 0,16 | 2-Furanmethanol | MS, KI | Karamellartig |
| 16 | 0,75 | 3-Methylbutansäure | MS | |
| 17 | 1,59 | Phenylmethanol | MS, KI | Süßlich, blumig |
| 18 | 1,36 | Phenylethanol | MS, KI | Rose, Honig, blumig |
| 19 | 0,05 | 2-Acetylpyrrol | MS | |
| 21 | 0,83 | 3-Phenyl-1-propanol | MS | Fruchtig, blumig, Zimt |
| 22 | 0,11 | (2 E)-3-Phenyl-2-propen-1-ol | MS | |

Desweiteren wurde Cyclohexylhexanoat in den SNL-Schüttelkulturen mittels Vergleich des Massenspektrums mit der NIST-Datenbank und aufgrund des KI identifiziert (siehe Abbildung 19). Im Mediumblindwert wurde Cyclohexylhexanoat nur in nicht quantifizierbaren Mengen detektiert. Es erfolgte dennoch eine massenspektrometische Identifizierung. Somit scheint Pfl in der Lage zu sein, Cyclohexanoat herzustellen. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Bildung teilweise chemisch abläuft, da geringe Mengen ebenfalls in Her und Wco detektiert wurden.

Cyclohexanoat wurde bisher in der Natur noch nicht nachgewiesen. Möglicherweise erfolgte eine Bildung der Vorstufen durch den Pilz mit einer anschließenden sauren Veresterung aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Mediums. Außerdem ist eine chemische Bildung während der Aufarbeitung denkbar, da als Wiederfindungsstandard Cyclohexan verwendet wurde. Da Cyclohexylhexanoat vermutlich nicht auf natürlichem Weg entstand, ist es für eine industrielle Anwendung nicht geeignet.

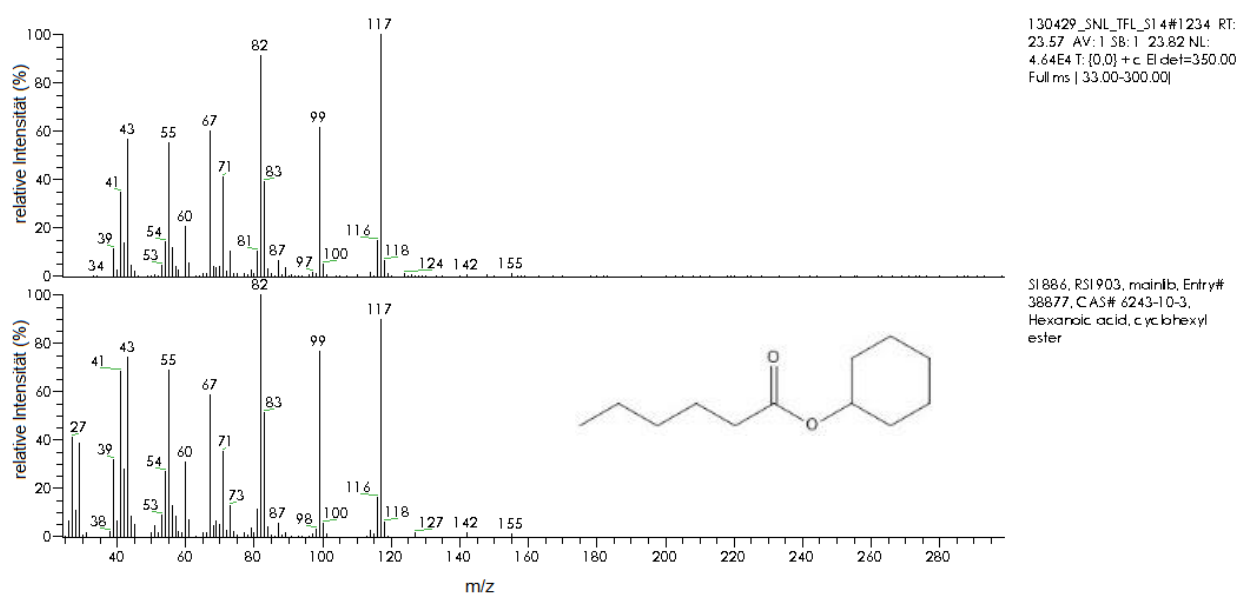


Abbildung 19: Massenspektren von Cyclohexylhexanoat (KI 1646) gebildet durch Pfl in SNL (oben) und Referenzspektrum (unten).

3.1.1.4 Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Aromabildung von *Wolfiporia cocos*

Wolfiporia cocos (Wco) ist ein essbarer Basidiomycet, welcher vor allem wegen seiner bioaktiven Inhaltsstoffe in der chinesischen Medizin bekannt ist (Akihisa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Sun, 2014). Die Submerskulturen von Wco wiesen einen intensiven zitrusartigen Geruch auf. Deshalb wurde zunächst ein Aromaprofil von Wco in SNL erstellt (siehe Abbildung 20). Dabei wurden 27 Substanzen detektiert, von denen 19 Substanzen mittels MS-Datenbanken (NIST) und KIs identifiziert wurden (siehe Tabelle 14). Dabei wurden die Terpene 3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol (Linalool) und *trans*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol (*trans*-Geraniol) gefunden. Linalool wies auch bei der GC mit olfaktorischer Detektion ein wie in der Literatur beschriebenes typisch zitrusartiges, frisches Aroma auf. Linalool kommt in etherischen Ölen von über 200 Pflanzen, unter anderem in Koriander, Zimt, Basilikum und Majoran vor. Es wird als Aroma- und Duftstoff in Lebensmitteln und Kosmetika eingesetzt. *Trans*-Geraniol besitzt einen blumigen, frischen Geruch und ist ebenfalls Bestandteil zahlreicher etherischer Öle, wie Palmarosa-, Geranien- oder Rosenöle (Burdock, 2001). Aufgrund seines angenehmen Geruchs findet Geraniol Anwendung in der Parfüm- und Kosmetikindustrie. Die Bildung von Linalool und Geraniol in Basidiomyceten wurde bereits nachgewiesen (Abraham und Berger, 1994; Drawert *et al.*,

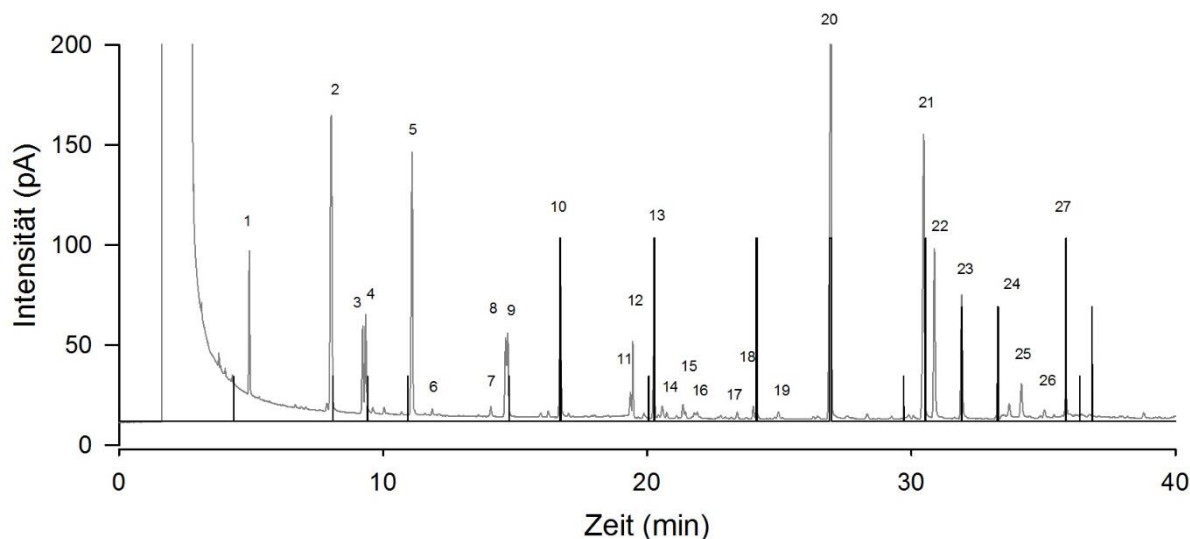


Abbildung 20: GC-FID/O-Chromatogramm des P/E-Extraktes von Wco in SNL nach 8 Tagen Kultivierung (24 °C, 150 rpm). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel). FID-Signal in grau, ODP-Signal in schwarz.

1983). Des Weiteren wurde Phenyllessigsäuremethylester detektiert, welches einen honigartigen Geruch besitzt. Es kommt in verschiedensten Pflanzen vor, vor allem in Früchten wie in Erdbeeren, Ananas oder der Sternfrucht (Burdock, 2001). Hanssen und Abraham (1987) identifizierten in Kulturen von *Gloeophyllum odoratum* L-Phenylalanin als Vorstufe von Phenyllessigsäuremethylester. Ein ähnlicher Mechanismus ist für Wco denkbar. Insgesamt trugen die Gerüche von Linalool, Geraniol und Phenyllessigsäure hauptsächlich zum Gesamtaromaeindruck bei. Dagegen wurden die Gerüche der für die Aromaextrakte von Pilzen typischen aliphatischen Alkohole und dessen Derivate nicht als dominierend wahrgenommen. Weiterhin wurde 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon in den SNL-Schüttelkulturen von Wco detektiert. Da dieser als besonders aromaaktiv bekannt ist und demnach häufig in der Aromaindustrie eingesetzt wird, wurden weitere Analysen unternommen.

Tabelle 14: Aromaprofil des P/E-Extraktes von Wco in SNL (7 Tage, 150 rpm, 24 °C). Identifizierung mittels GC-MS-Analyse (VFms-Wax) über Datenbankenabgleich der Massenspektren (MS) und Berechnung der Retentionsindizes (KI). Semiquantifizierung erfolgte mit Cyclohexanol als externem Standard.

| Peak Nr. | Konzentration (mg L ⁻¹) | Substanz | Identifikation | Geruch |
|----------|-------------------------------------|-----------------------|----------------|--------|
| 1 | 0,28 | 2-Methyl-1-propanol | MS, KI | |
| 2 | 1,12 | 2-Methyl-1-butanol | MS, KI | Muffig |
| 3 | 0,23 | 3-Octanon | MS, KI | minzig |
| 4 | 0,28 | 3-Methyl-3-buten-1-ol | MS, KI | |

| Peak Nr. | Konzentration (mg L ⁻¹) | Substanz | Identifikation | Geruch |
|----------|-------------------------------------|--|----------------|---------------------------|
| 6 | 0,02 | 3-Methyl-2-buten-1-ol | MS, KI | |
| 7 | 0,03 | 2-Nonanon | MS, KI | |
| 8 | 0,25 | 3-Octanol | MS, KI | Kokosnuss, leicht süßlich |
| 10 | 0,47 | 1-Octen-3-ol | MS, KI | pilzig, Holz |
| 12 | 0,16 | Nonanol | MS, KI | muffig |
| 13 | 0,20 | 3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol | MS, KI | zitrus, frisch |
| 18 | 0,04 | Cyclohexylhexanoat | MS | süßlich, Hefe, muffig |
| 19 | 0,02 | 2-Furanmethanol | MS, KI | |
| 20 | 1,77 | Phenyllessigsäuremethylester | MS | Honig |
| 21 | 1,04 | <i>trans</i> -3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol | MS, KI | Blumig, frisch |
| 22 | 0,58 | Phenylmethanol | MS, KI | |
| 23 | 0,42 | Phenylethanol | MS, KI | Rose |
| 24 | 0,04 | 2-Acetylpyrrol | MS, KI | |
| 26 | 0,03 | 3-Phenyl-1-propanol | MS | |
| 27 | 0,09 | 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon | MS, KI | Karamell, süßlich |

Nachweis von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (Furaneol®) in Wco-Kulturen:

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon ist unter der Abkürzung HDMF oder Furaneol® (Firmenname S. A. Genf) bekannt. Erstmals wurde Furaneol® 1960 als Produkt der Maillard-Reaktion beschrieben (Hodge, 1960), welche meist beim Erhitzen von Aminosäure und reduzierenden Zuckern abläuft. In der Literatur ist neben der chemischen Bildung auch die Produktion durch Pflanzen und Mikroorganismen bekannt (Hauck *et al.*, 2003; Roscher *et al.*, 1997; Schiefner *et al.*, 2013), wobei die Biogenesewege nicht vollständig geklärt sind. Furaneol® wurde ursprünglich aus Erdbeeren und Ananas isoliert, weshalb es auch als *strawberry furanone* bekannt ist (Willhalm *et al.*, 1965). In starken Verdünnungen besitzt Furaneol® einen erdbeerartigen, fruchtigen Geruch, welcher hauptsächlich vom *R*-Isomer ausgeht (Emura *et al.*, 2009). Mit steigender Konzentration wird das Aroma jedoch über karamellartig bis hin zu röstartig wahrgenommen.

Um zu bestätigen, dass es sich um Furaneol® handelte, wurde eine Furaneol®-Standardlösung hergestellt. Mittels authentischem Standard und Co-Chromatografie wurde Furaneol® in Wco Schüttelkulturen bestätigt (siehe Abbildung 21).

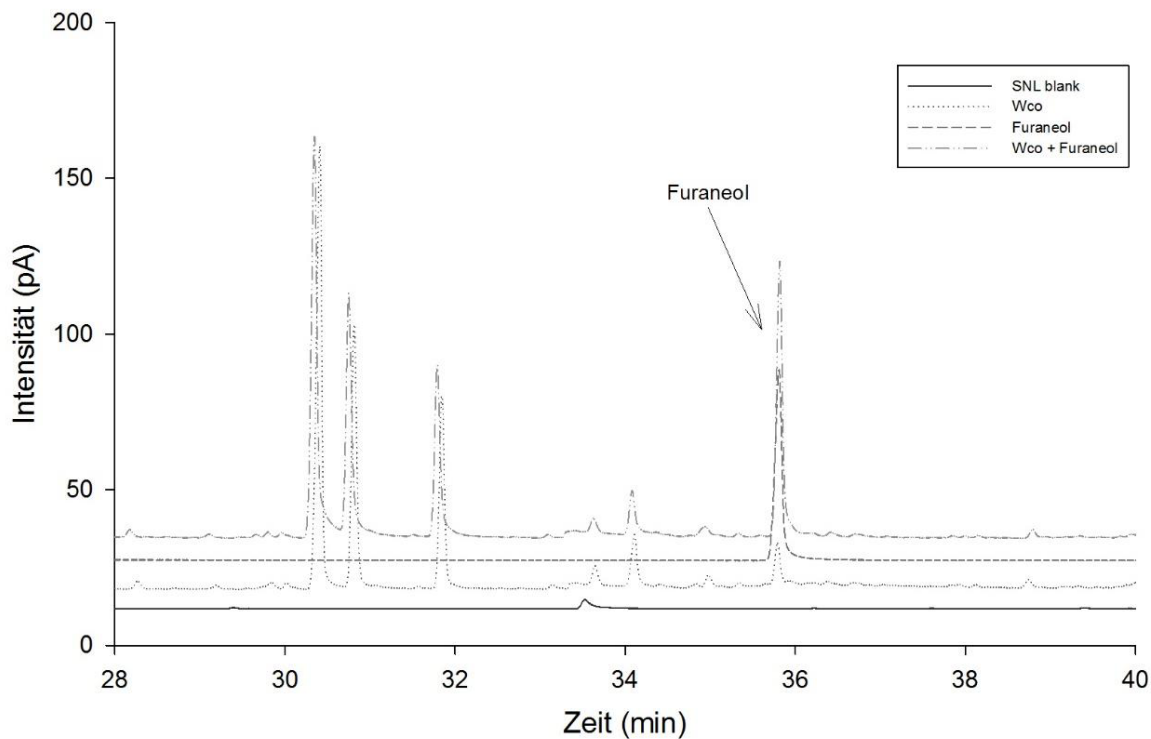


Abbildung 21: GC-FID-Chromatogramme zur Identifizierung von Furaneol® in Wco-Kulturen (P/E-Extrakt nach sechs Tagen Kultivierung bei 24 °C, 150 rpm). Von unten nach oben: SNL, Wco in SNL, Furaneol®-Standard (127 µg mL⁻¹) und Wco in SNL + Furaneol®-Standard. 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB-Wax; *on column*; H₂; 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890.

Um auszuschließen, dass Furaneol® bereits im Medium enthalten war, wurde ein Blindwert mittels GC-MS vermessen. Dabei wurde kein Furaneol® detektiert, obwohl im Blindwert mittels GC-O bei der Retentionszeit von Furaneol® ein karamellartiger Geruch detektiert wurde. Furaneol® weist mit 0,03 - 1,70 µg L⁻¹ (Schwab und Roscher, 1997) einen extrem niedrigen Geruchsschwellenwert in Wasser auf, weshalb vermutlich die Empfindlichkeit der olfaktorischen Detektion die der Detektion mittels FID beziehungsweise MS überstieg. Furaneol® ist demnach in geringen Mengen schon im Blindwert enthalten.

Um herauszufinden, woher das Furaneol® im Blindwert stammte, wurde eine GC-O von P/E-Extrakten von getrennt autoklavierter SNL, SNL mit sterilfiltrierter Glucoselösung, nicht autoklavierter SNL und nicht autoklaviertem Hefeextrakt durchgeführt. Dabei wurde der Furaneol®-Geruch bereits in nicht autoklaviertem Hefeextrakt olfaktorisch detektiert. Deshalb wurde im Weiteren Wco in SNL ohne Hefeextrakt kultiviert. Es stellte sich allerdings heraus, dass Wco in SNL ohne Hefeextrakt trotz Supplementierung mit einem Vitamin-Gemisch nicht anwuchs. Daher

wurde Wco zunächst wie zuvor in einer SNL-Vorkultur mit Hefeextrakt angezogen. Nach Waschen der Kultur wurde Wco dann in eine Hauptkultur ohne Hefeextrakt überführt. Als Blindwert für die Furaneol®-Bildung wurde eine Probe direkt nach dem Überführen in die Hauptkultur gezogen.

Die Hauptkulturen ohne Hefeextrakt rochen jeweils frisch und zitrusartig. Bei der GC-FID/O-Analyse konnte kein Furaneol® detektiert werden. Nach 20 Tagen Kultivierung war in SNL ohne Hefeextrakt wesentlich weniger Biomasse vorhanden als nach acht Tage in SNL mit Hefeextrakt. Die Kulturen besaßen zwar ebenfalls einen zitrusartigen und frischen Geruch, allerdings dominierten bei olfaktorischer Analyse waldig pilzartige Gerüche. 1-Octen-3-ol war Hauptkomponente in beiden Kulturen, was den Pilz-Geruch erklärt. Dieses wird durch Linolsäure-Abbau bei Zellyse freigesetzt und lässt auf für das Pilzwachstum unzureichende Bedingungen schließen (Schindler und Seipenbusch, 1990). Ob Furaneol® von Wco *de novo* gebildet werden kann, war demnach noch unklar, da vermutlich zu wenig Biomasse vorhanden war, um Furaneol® in detektierbaren Mengen zu bilden.

Abhängigkeit der Furaneol®-Bildung vom Hefeextrakt

Weiterhin sollte erforscht werden, ob mit steigendem Hefeextrakt-Gehalt der Furaneol®-Gehalt ebenfalls stieg. Dies würde bedeuten, dass die Präkursoren zur Bildung von Furaneol® im Hefeextrakt zu finden sind. Dazu wurde Wco in SNL mit steigenden Hefeextrakt-Mengen unter Mitführen entsprechender Blindwerte kultiviert. Die Furaneol®-Konzentration stieg mit Erhöhung des Hefeextrakt-Anteils an (siehe Abbildung 22). Bei der 5-fachen Menge Hefeextrakt wurde auch die 5-fache Menge an Furaneol® ($0,21 \text{ mg L}^{-1}$) erzielt. Die Furaneol®-Menge in den Blindwerten lag dabei auch bei der 5-fachen Menge an Hefeextrakt unter der Bestimmungsgrenze. Damit war evident, dass im Hefeextrakt weitere Vorstufen für die Furaneol®-Bildung vorhanden waren.

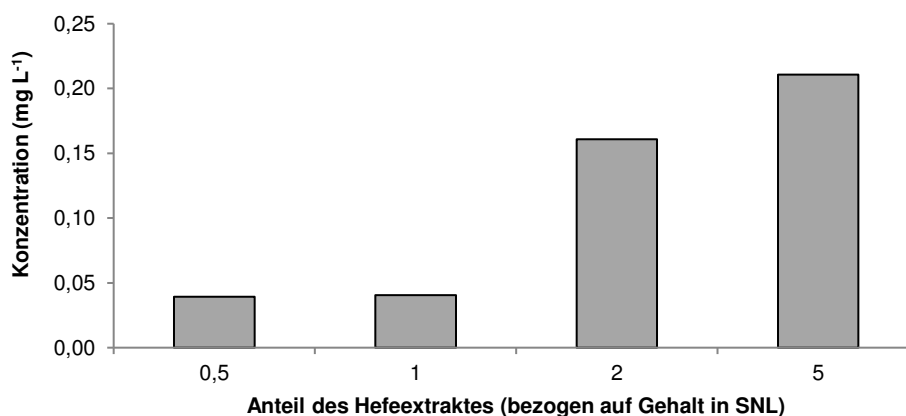


Abbildung 22: Furaneol®-Bildung nach sechs Tagen Kultivierung von Wco in SNL mit ½-, 1-, 2-, 5-facher Menge Hefeextrakt (24 °C, 150 rpm).

Ferner wurde überprüft, ob durch mehrmalige thermische Behandlung (mögliche Bereitstellung von Furaneol[®]-Präkursoren durch die Maillard-Reaktion) die Furaneol[®]-Bildung erhöht wird. Wco-Kulturen mit mehrmals hintereinander autoklaviertem SNL ergaben jedoch keine Erhöhung des Furaneol[®]-Gehaltes. Ein erneutes Erhitzen des Mediums führte demnach nicht zur erneuten Produktion von Furaneol[®]-Vorstufen.

Dotierung von Wco-Kulturen mit möglichen Präkursoren

Da die vorangehenden Ergebnisse bewiesen, dass Präkursoren für die Furaneol[®]-Bildung im Hefeextrakt vorhanden waren, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit herausgefunden werden, um welche Präkursoren es sich handelte. In der Literatur sind verschiedene Präkursoren für die Furaneol[®]-Bildung bekannt. Nach Roscher *et al.* (1997) ist L-(+)-Rhamnose Präkursor für die Bildung von Furaneol[®] bei *Pichia capsulata* in Casein-Pepton-Medium, wobei *P. capsulata* Furaneol[®] nur aus durch thermische Sterilisation generierten Intermediaten bilden kann. Eine chemische Bildung von Furaneol[®] ist aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Anwesenheit von NADPH möglich (Hauck *et al.*, 2002). Für die Bildung von Furaneol[®] aus D-Fructose-1,6-bisphosphat durch *Zygosaccharomyces rouxii* wurde die chemische Bildung von 1-Deoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat als Intermediat und eine anschließende enzymatische Bildung von Furaneol[®] postuliert (Hauck *et al.*, 2003).

Entsprechend der in der Literatur berichteten Präkursoren, wurden L-Rhamnose (48 mM) und D-Fructose-1,6-diphosphat (2 mM) sterilfiltriert zu den Wco-Kulturen gegeben. Ein Zusatz von L-Rhamnose oder D-Fructose-1,6-diphosphat ergab jedoch weder einen stärkeren Geruch der Kulturen nach Furanol, noch eine Erhöhung der Konzentration an Furanol bei gaschromatografischer Auswertung. Durch L-Rhamnose oder D-Fructose-1,6-diphosphat kann Furaneol[®] dementsprechend nicht *de novo* gebildet werden.

Elicitierung von Wco-Kulturen mit Methyljasmonat

In der Literatur wurde eine Erhöhung des Furaneol[®]-Gehalts in Erdbeeren durch Elicitierung mit Methyljasmonat (Methyl-[(1*R*,2*R*)-3-oxo-2-((*Z*)-pent-2-enyl)-cyclopentyl]-acetat, siehe Abbildung 24) beschrieben (de la Pena Moreno *et al.*, 2010). Entsprechend wurde eine Elicitierung der Wco-Kulturen mit Methyljasmonat (100 µM) durchgeführt. Dabei wurden zwei neue Peaks bei $t = 48$ min beziehungsweise $t = 51$ min detektiert (siehe Abbildung 23). Es handelt sich vermutlich um Methyljasmonat-Derivate, da der Methyljasmonat-Peak im Kulturverlauf sank, während die Peaks der zwei neuen Substanzen stiegen. Bei dem Peak bei $t = 48$ min handelte es sich um Methyl-[(1*R*,2*R*)-3-hydroxy-2-((*Z*)-pent-2-enyl)cyclopentyl]acetat (siehe Abbildung 24). Der Peak bei $t = 51$ min konnte nicht eindeutig identifiziert werden, das Massenspektrum ließ jedoch ebenfalls auf ein Methyljasmonat-Derivat schließen. Die Konzentration an Furaneol[®]

wurde jedoch nicht erhöht. Dementsprechend wurde die Bildung von Furaneol® in Wco durch Methyljasmonat nicht elicitiert.

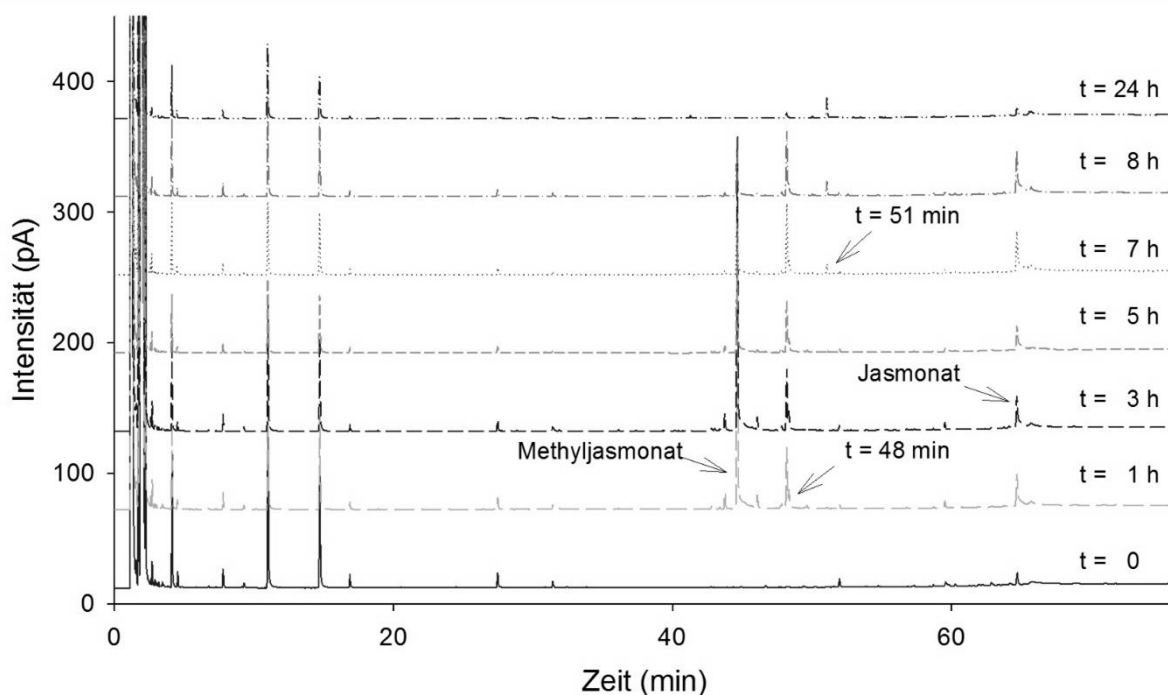


Abbildung 23: GC-FID-Chromatogramme: P/E-Extrakte von Wco in SNL vor der Elicitierung ($t = 0$) und 1 h, 3 h, 5 h, 7 h sowie 1 d nach Elicitierung mit Methyljasmonat ($100 \mu\text{M}$). $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min)// $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}/230 \text{ }^\circ\text{C}$ (10 min); DB-Wax; 30 m/0,32 mm/0,25 μm . *on column*; H_2 ; 2 mL min^{-1} ; Agilent GC 7890.

Da Furaneol® aus den untersuchten Ausgangssubstanzen nicht *de novo* gebildet wurde, wurde auf eine weitere Analyse der Furaneol®-Bildung in dieser Arbeit verzichtet. Dennoch zeigt Wco ein großes Potential zur Aromastoffbildung in verschiedenen Medien. Die Konzentrationen an gebildetem Furaneol® waren bislang zu niedrig, um in industriellen Prozessen Anwendung zu finden. Deshalb sollte in weiterführenden Arbeiten die Bildung des Furaneols® genauer untersucht werden, um möglicherweise durch gezielte Supplementierung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie die Ausbeute an Furaneol® zu erhöhen.

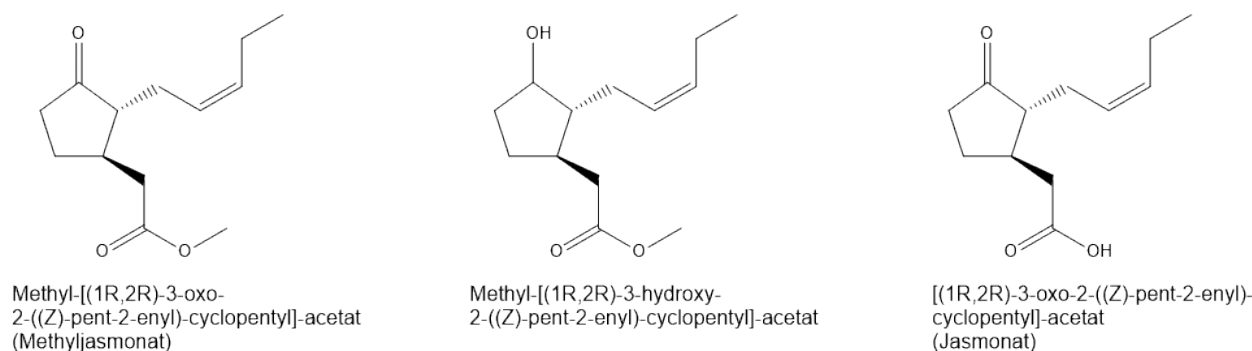


Abbildung 24: Strukturformeln von Methyljasmonat, Methyl-[(1R,2R)-3-hydroxy-2-((Z)-pent-2-enyl)-cyclopentyl]-acetat und Jasmonat.

3.1.2 Lipidreiche Nebenströme

Basidiomyceten besitzen die außergewöhnliche Fähigkeit, Materialien, die für die meisten anderen Organismen nicht ohne Weiteres zugänglich sind, abzubauen und in ihren Stoffwechsel zu integrieren. Von besonderem Interesse ist hierbei der Abbau von Seitenströmen der Lebensmittelindustrie. Diese können zwar nicht mehr für die eigentliche Produktion der Lebensmittel verwendet werden, enthalten aber noch viel organisches, schwer zugängliches Material. Ein Beispiel hierfür ist Rapspresskuchen. Bei der Rapsölherstellung anfallende Presskuchen enthalten laut Ölhersteller Henry Lamotte immer noch etwa 22 % Rohfett. Zusätzlich stellen Fettsäuren oft Vorstufen für Aromastoffe dar, so zum Beispiel bei der Bildung von 3-(Z)-Hexenol aus Linolensäure (Schrader, 2007). Daraus entstand die Idee, entsprechende Seitenströme als Nährmedium für Basidiomyceten zur Synthese von Aromastoffen zu nutzen.

Als Modellorganismus wurde hierbei *Wco* verwendet, da dieser beim Test der verschiedenen Medien bereits ein breites Aromaspektrum bei robustem Wachstum in verschiedenen Medien aufwies. Es wurden *Wco*-Hauptkulturen in Minimalmedium (MM) mit 2 % Rapsöl oder Rapspresskuchen (RPK) supplementiert (siehe 2.5.2.4). Da es sich bei Rapsöl um ein weniger reichhaltiges Medium handelt, wurden hier zusätzlich Kulturen mit Rapsöl in SNL angesetzt. Daneben wurden als Blindwerte *Wco* in MM beziehungsweise SNL (Pilz-Blindwert) und MM beziehungsweise SNL mit 2 % Rapsöl beziehungsweise RPK (Medium-Blindwert) mitgeführt.

Bei Kultivierung mit Rapsöl zeigten sich zu Kulturbeginn auf der Oberfläche wie erwartet kleine Fetttröpfchen, welche durch Schütteln bei 150 rpm emulgiert wurden. Nach sechs Kultivierungstagen waren jedoch bereits keine Fetttröpfchen mehr an der Oberfläche erkennbar. Das Öl wurde also entweder im Myzel eingeschlossen oder es wurde metabolisiert. Außerdem wurde in allen Kulturen ein fruchtiger, frischer Geruch wahrgenommen (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Sensorische Prüfung der *Wco*-Hauptkulturen nach sechs Tagen Kultivierung in SNL, SNL + Rapsöl, und Minimalmedium (MM) + Rapsöl/Rapspresskuchen (RPK).

| Wco in | Wachstum | Aromaeindruck |
|---------------------|---|------------------------------|
| SNL | ++++ | Zitrusartig, frisch |
| SNL + Rapsöl | ++++, keine Fetttröpfchen an der Oberfläche | Zitrusartig, frisch, Melone |
| MM | ++ | Zitrusartig, frisch |
| MM + Rapsöl | ++, keine Fetttröpfchen an der Oberfläche | Zitrusartig, frisch, Melone |
| MM + RPK | +++ , braun | Süßlich, frisch, zitrusartig |

Die Extrakte der Kulturen wurden nach Schimanski *et al.* (2013) mit Tegosoft extrahiert (siehe 2.4.1.3) und anschließend mittels TDS-GC-FID beziehungsweise TDS-GC-O/MS analysiert (siehe 2.4.2). Die Chromatogramme der Extrakte der Kulturen von *Wco* mit Rapsöl beziehungsweise mit RPK unterschieden sich vom Pilz-Blindwert hinsichtlich der produzierten flüchtigen Substanzen (siehe Abbildung 25). Bei Zusatz von Öl und RPK wurden hauptsächlich Octansäure- und Decansäuremethylester gebildet. Außerdem ergab die TDS-GC-O-Analyse von *Wco*

mit Rapsöl zahlreiche olfaktorische Signale. In diesen Extrakten wurde β -Caryophyllen und β -Ionon detektiert, welche in Kulturen mit RPK nicht auftraten. β -Caryophyllen ist ein polyzyklisches Sesquiterpen welches in verschiedenen ätherischen Ölen beispielsweise von Nelke vorkommt. β -Ionon besitzt einen veilchenartigen Geruch und findet vor allem in der Riechstoffindustrie sowie als Aromastoff in Lebensmitteln Einsatz (Burdock, 2001). In Basidiomyceten ist die Bildung von β -Ionon aus Carotinoiden bereits bekannt (Zelena *et al.*, 2009; Zorn *et al.*, 2003). Der Gehalt an Carotinoiden in raffinierten Rapsöl ist allerdings sehr gering und kann oft nicht nachgewiesen werden (Franke *et al.*, 2010). Rapspresskuchen enthält außerdem nach Franke *et al.* (2010) einen wesentlich höheren Anteil an Carotinoiden (1,4 mg/100 g) – hier wurde dagegen kein β -Ionon gebildet. Daher ist die Bildung von β -Ionon aus Carotinoiden bei der Kultivierung von Wco mit Rapsöl unwahrscheinlich. Demnach haben wahrscheinlich die Fette im Rapsöl einen direkten Einfluss auf die Bildung von β -Caryophyllen und β -Ionon.

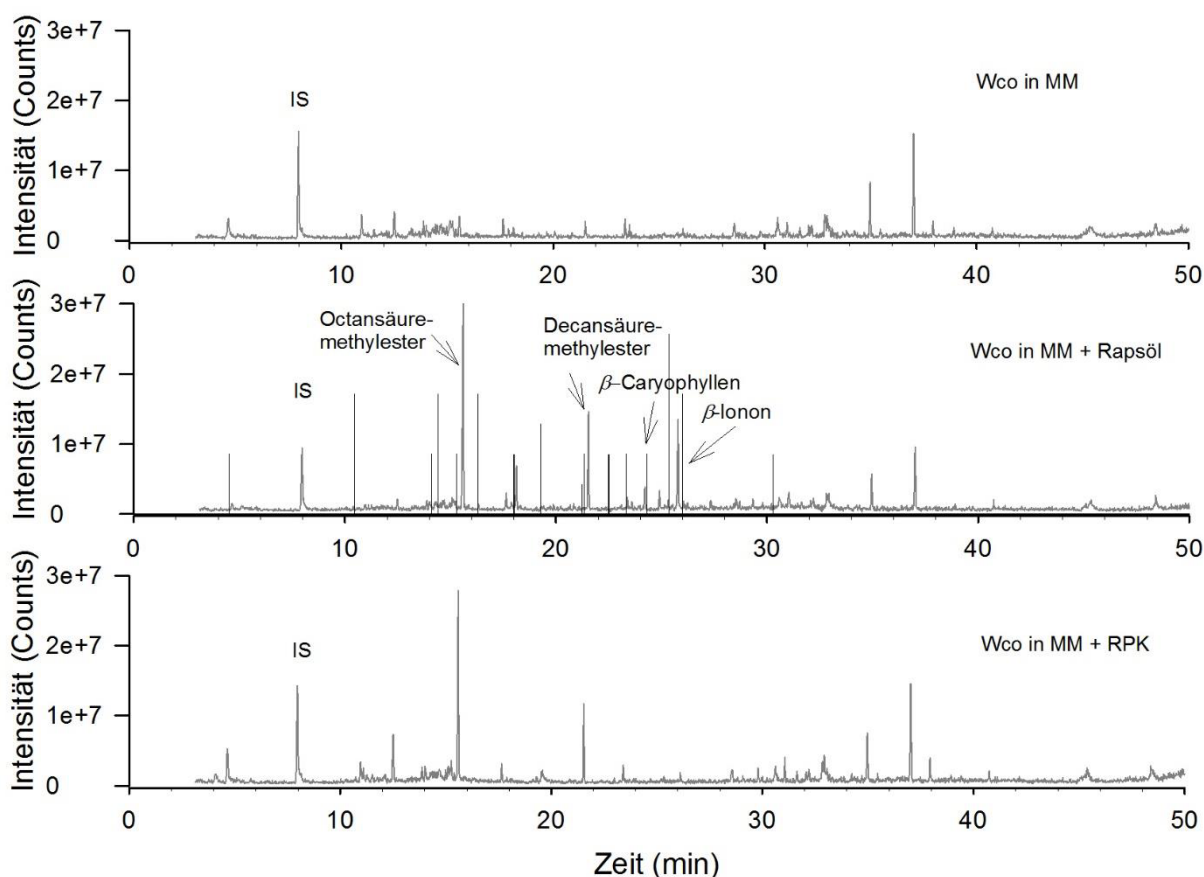


Abbildung 25: GC-MS-Chromatogramme der Tegosoft-Extrakte von Wco-Kulturen ohne Zusatz (oben), mit Rapsöl (Mitte) und mit Rapspresskuchen (unten). 40 °C (3 min)//10 °C min⁻¹/135 °C //0,5 °C min⁻¹/170 °C//15 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB5-ms; Helium 1,2 mL min⁻¹; Varian CP3800. MS-Signal in grau, ODP-Signal in schwarz. IS: Externer Standard.

Des Weiteren wurde beim Vergleich der Kulturen von MM und Rapsöl mit den Kulturen mit SNL und Rapsöl ebenfalls Unterschiede festgestellt (siehe Abbildung 26). In den Kulturen mit SNL und Rapsöl sind im Vergleich zu den Kulturen in MM Octansäure- und Decansäuremethylester

in wesentlich geringeren Konzentrationen vorhanden und auch Caryophyllen wurde nicht detektiert. Stattdessen wies dieser Extrakt Phenylmethanol auf. Dies liegt vermutlich daran, dass in SNL mit dem Hefeextrakt, wie bereits zuvor erläutert, eine Vielzahl an Aromavorstufen geliefert wird. Dadurch hat das Rapsöl einen anderen Effekt auf das Aromaprofil als im MM. Im MM muss das Öl als Hauptnährstoffquelle direkt zum Stoffwechsel beitragen, während in SNL zunächst die vorhandenen Glucose- und Aminosäure-Vorräte aufgebraucht werden. Eventuell spielen hier induktive Effekte eine Rolle.

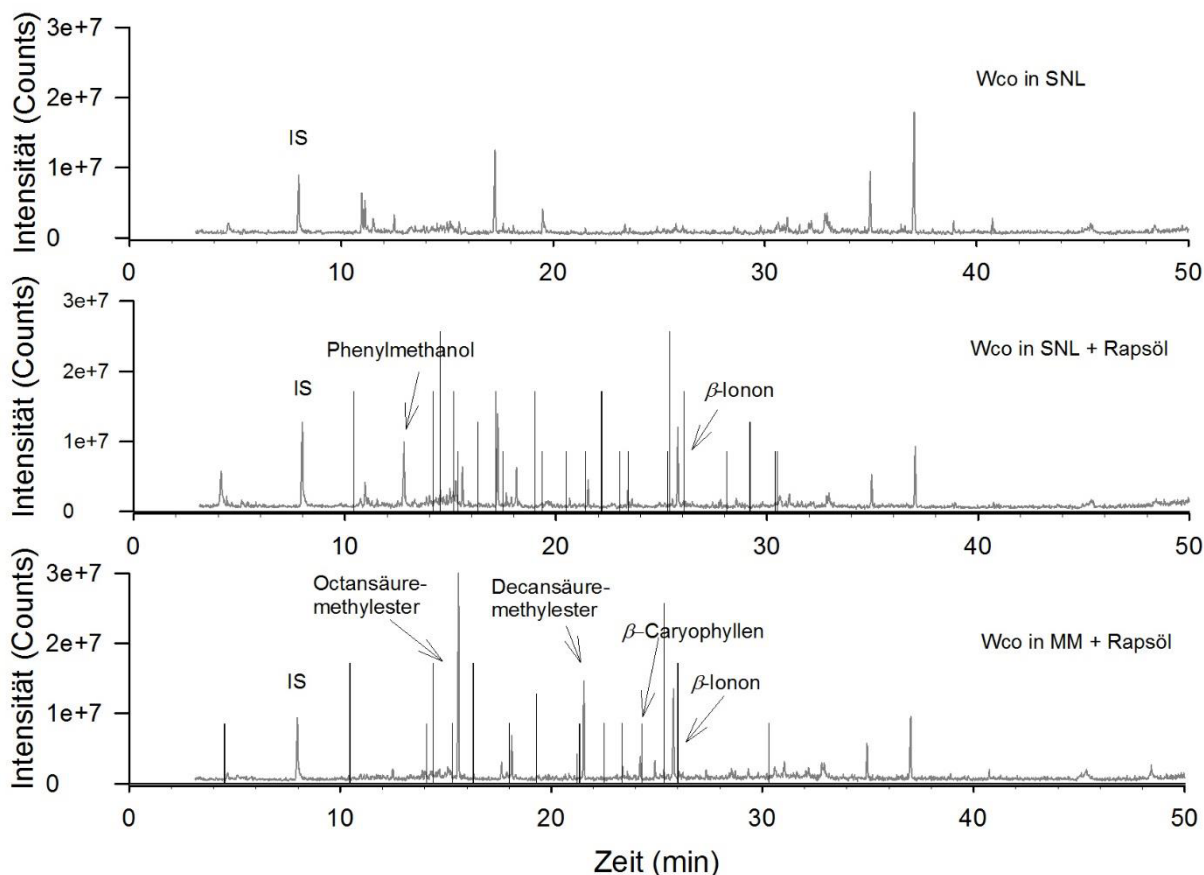


Abbildung 26: GC-MS-Chromatogramme der Tegosoft-Extrakte von Wco-Kulturen ohne Zusatz in SNL (oben), mit Rapsöl in SNL (Mitte) und mit Rapsöl in MM (unten). 40 °C (3 min)// 10 °C min⁻¹/135 °C//0,5 °C min⁻¹/170 °C//15 °C min⁻¹/230 °C (10 min); DB5-ms; Helium; Fluss: 1,2 mL min⁻¹; Varian CP3800. MS-Signal in grau, ODP-Signal in schwarz. IS: Externer Standard.

Es wurde ein positiver Einfluss von Rapsöl und RPK auf das Aromaprofil von Wco bewiesen. Rapsöl hat dabei einen stärkeren Einfluss als RPK. Dabei führte die Verwendung zusätzlicher Substrate neben dem Rapsöl zu weiteren Unterschieden im Aromaprofil. Insgesamt erwies sich die Kultivierung mit Fetten also als besonders ergiebig bezüglich der Aromaproduktion. In weiteren Arbeiten sollte demnach sowohl nach alternativen fetthaltigen Matrices sowie nach geeigneten Seitenströmen gesucht werden. Auch das Aufklären von Bildungswegen der bisher identifizierten Aromastoffe wäre von wissenschaftlichem und industriellem Interesse. Durch Kennt-

niss der Synthesewege können effiziente biotechnologische Prozesse zur Bildung von natürlichen Aromastoffen entwickelt werden. Die Nutzung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie für die Aromastoffproduktion erfüllt die Anforderungen an natürliche Aromastoffe nach der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008. Durch den Einsatz von Nebenströmen entstehen außerdem nachhaltige Prozesse, da die vermeintlichen „Abfallprodukte“ aus der Lebensmittelindustrie zur Produktion von natürlichen Aromastoffen weiterverwendet werden können. Durch weiterführende Untersuchungen können die in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für einen solchen Einsatz in der Aromaindustrie genutzt werden.

3.2 Alkenspaltende Enzymaktivitäten in Basidiomyceten

Enzymatische Alkenspaltungen sind für die Industrie von hohem Interesse. Durch Alkenspaltungen können schwierige Substrate zur Freisetzung von hochwertigen Aromastoffen zugänglich gemacht werden. Beispielsweise könnte natürliches Piperonal aus Piperin mit Hilfe eines alkenspaltenden Enzyms hergestellt werden (siehe Abbildung 27). Piperin ist eine geruchlose Substanz, welche in Schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum*) zu fünf bis neun Prozent enthalten ist (Burdock, 2001; Epstein *et al.*, 1993).

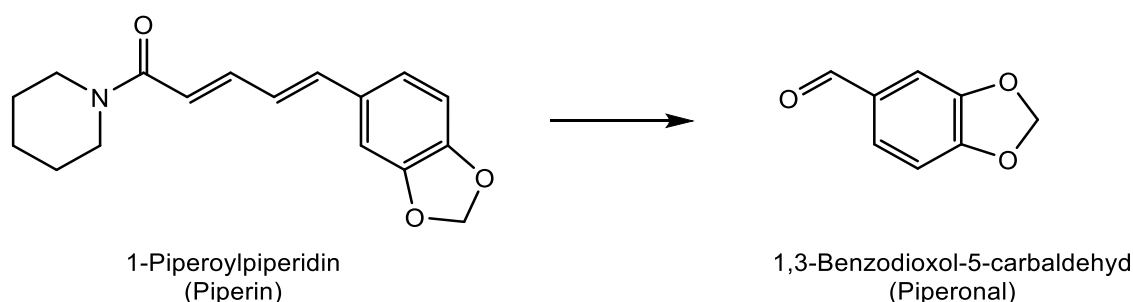


Abbildung 27: Spaltung von Piperin zu Piperonal.

Bei Piperonal (1,3-Benzodioxol-5-carbaldehyd, Abbildung 27) handelt es sich um eine süßliche heliotropartig riechende Substanz (Burdock, 2001). Sein Geruch, der an die Vanilleblume (*Heliotropium arborescens*) erinnert, verlieh ihm das Synonym „Heliotropin“. Eine erste Synthese von Piperonal wurde dagegen aus dem Pfefferinhaltsstoff Piperin (1-Piperoylpiperidin) realisiert, woher sich der heute gebräuchliche Name Piperonal ableitete.

Es kommt in geringen Mengen in Blütenölen von Mädesüß (*Filipendula ulmaria*), Robinien (*Robinia pseudoacacia* 2 g/100 g) und Vanille (*Vanilla planifolia*, 5 g/100 g) vor (Saifullina und Kozhina, 1975; Tyrkov und Akmaev, 2013; Zhang und Mueller, 2012). Außerdem wurde es im Sassafras-Baum (*Sassafras albidum*), in Pfeffer (*Piper nigrum*) und Dill (*Anethum graveolens*) in geringen Mengen nachgewiesen (Chandra *et al.*, 2014; Schaffer *et al.*, 2013; Schreier *et al.*, 1981). Piperonal findet aufgrund seines angenehmen Geruchs zur Seifenparfümierung oder

auch in Parfüms Anwendung (Opdyke, 1974), wobei zum Teil auch dessen antiinflammatorische Wirkung genutzt wird (Stiehm und Baur, 2000). In Lebensmitteln wird Piperonal als Aromastoff zur Abrundung von Kirsch- und Vanillearomen eingesetzt (*The good scents company*: Eintrag Heliotropin). Piperonal ist in der Positivliste des Anhang I der VO (EG) 1334/2008 gelistet und darf somit Lebensmitteln als Aromastoff zugesetzt werden. Allerdings ist Piperonal nach der Verordnung (EG) Nr. 273/2004 über Drogenausgangsstoffe ein „erfasster Stoff der Kategorie 1“, welche bei der „unerlaubten Herstellung von Suchtstoffen oder psychotropen Substanzen“ verwendet werden kann. Dementsprechend ist ein Inverkehrbringen nach § 3 Absatz 2 nur mit vorheriger Erlaubnis der zuständigen Behörden möglich.

Da Piperonal in Pflanzen nur in geringen Mengen enthalten ist, führt die Gewinnung durch die ohnehin schon kostenintensive Extraktion aus Pflanzen zu wirtschaftlich nicht rentablen Prozessen. Der Aromahersteller Symrise nutzt deshalb nach eigenen Angaben ausschließlich physikalische Verfahren zur Gewinnung der Rohstoffe aus Pflanzen wie beispielsweise Safrol aus dem Sassafras-Baum (*Sassafras albidum*). Ein detaillierter Herstellungsweg wurde nicht offenlegt. Wissenschaftliche Publikationen zur Synthese von Piperonal befassen sich hauptsächlich mit der Spaltung von Isosafrol (Santos *et al.*, 2004) oder allgemeinen Alkenspaltungen. Ein „Königsweg“ ist bislang nicht publiziert.

Es sind unter anderem bereits einige Basidiomyceten bekannt, welche alkenspaltende Enzymaktivitäten aufweisen (Rajagopalan *et al.*, 2013a; Tuynman *et al.*, 2000). Zur Identifizierung von weiteren Arten mit alkenspaltenden Enzymaktivitäten wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Stammscreening durchgeführt. Die für die Aktivität verantwortlichen Enzyme des vielversprechendsten Stamms wurden gereinigt und anschließend weiter untersucht.

3.2.1 Screening nach alkenspaltenden Enzymaktivitäten in Basidiomyceten

Für das Stammscreening wurden 18 Basidiomyceten auf alkenspaltende Enzymaktivitäten hin untersucht. Auswahlkriterien waren ein in der Literatur beschriebener anisartiger Geruchseindruck und/oder Homologien zu der publizierten Aminosäuresequenz einer Peptidase (siehe 1.2.2.2) mit alkenspaltender Aktivität aus *Trametes hirsuta* (Rajagopalan *et al.*, 2013a). Zur Detektion von alkenspaltender Aktivität wurde die Umsetzung von *trans*-Anethol zu *para*-Anisaldehyd verwendet (siehe Abbildung 28), da dieses bereits zu diesem Zweck erfolgreich genutzt wurde (Rajagopalan *et al.*, 2013b). Das Produkt *para*-Anisaldehyd weist einen anisartigen, süßlichen Geruch auf (Bilia *et al.*, 2002). Deshalb diente als erster Indikator für eine mögliche alkenspaltende Aktivität in Basidiomyceten ein Anisgeruch der Kulturen.

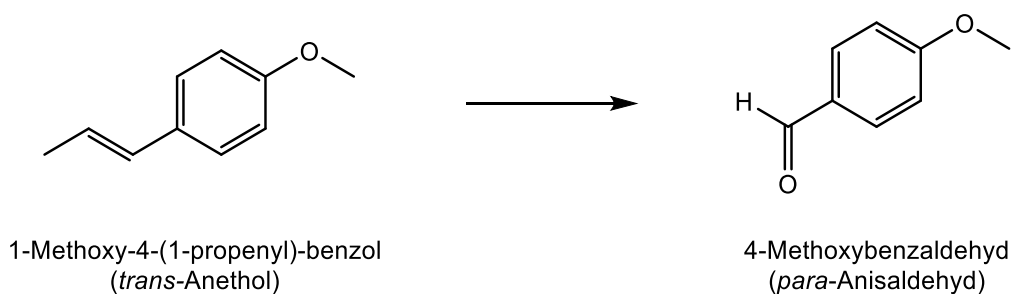


Abbildung 28: Spaltung von *trans*-Anethol zu *para*-Anisaldehyd.

Die Kultivierung erfolgte in SNL-Medium unter Zusatz von *trans*-Anethol zur Induktion der gewünschten Aktivität. *Trametes hirsuta* wurde als Positivkontrolle mitgeführt. *Trans*-Anethol besitzt einen anisartigen, süßlichen Geruch und kommt unter anderem in Anis (*Pimpinella anisum*), Zimt (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) und einigen Fenchel-Arten vor (Burdock, 2001). Es ist für seine fungizide Wirkung bekannt (Huang *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2006; Voda *et al.*, 2003). Dies ließ vermuten, dass einige Pilze alken-spaltende Enzyme entwickelt haben, welche *trans*-Anethol abbauen und damit das Fungizid unschädlich machen. *Trans*-Anethol wurde bereits als Induktor für das alken-spaltende Enzym aus *Trametes hirsuta* identifiziert (Rajagopalan *et al.*, 2013b). Hier handelt es sich vermutlich um eine Substratinduktion, da aufgrund der vorhandenen *trans*-Anethol-Konzentration die Genexpression des Anethol-abbauenden Enzyms erhöht wird.

Das gefriergetrocknete Myzel von neun der 18 getesteten Basidiomyceten wies nach Umsetzung von *trans*-Anethol eine Anisaldehydkonzentration von $\geq 100 \text{ mg L}^{-1}$ auf (siehe Tabelle 16). Piperin wurde hingegen nur von *Pleurotus sapidus* sowie von *Trametes hirsuta* umgesetzt. Die konzentrierten Kulturüberstände der entsprechenden Basidiomyceten zeigten dagegen weder eine Umsetzung von *trans*-Anethol noch von Piperin. Demnach sind die Transformationen auf intrazelluläre Enzymaktivitäten zurückzuführen.

Die höchsten Produktkonzentrationen an Anisaldehyd wurden mit dem Myzel von *Pleurotus sapidus* sowie *Trametes hirsuta* erzielt. Für Letzteren wurde bereits ein alken-spaltendes Enzym publiziert (siehe 1.2.2.2). Zur Entwicklung einer Reinigungsstrategie und Isolierung der alken-spaltenden Enzymaktivität wurde deshalb *Pleurotus sapidus* (Psa) herangezogen.

Tabelle 16: Biotransformation von *trans*-Anethol und Piperin mit resuspendierten Myzel-Lyophilisaten von 18 Basidiomyceten.

| Stamm | Geruchseindruck | Konzentration Anisaldehyd (mg L ⁻¹) | Konzentration Piperonal (mg L ⁻¹) |
|---|-----------------|---|---|
| <i>Gloeophyllum odoratum</i> | Anis | 26,5 | n. d. |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> | | 9,9 | n. d. |
| <i>Lentinus lepideus</i> | Anis | 42,3 | n. d. |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Anis | 1,0 | n. d. |
| <i>Piptoporus soleniensis</i> | | 24,9 | n. d. |
| <i>Pleurotus eryngii</i> | | 637,9 | n. d. |
| <i>Pleurotus lampas</i> | | 115,0 | n. d. |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | | 559,7 | n. d. |
| <i>Pleurotus ostreatus var. florida</i> | | 292,8 | n. d. |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | | 152,1 | n. d. |
| <i>Pleurotus sajor-caju</i> | | 168,3 | n. d. |
| <i>Pleurotus sapidus</i> | | 779,6 | 3,2 |
| <i>Schizophyllum commune</i> | | 15,5 | n. d. |
| <i>Trametes hirsuta</i> | Anis | 1009,6 | 5,2 |
| <i>Trametes suaveolens</i> | Anis | 91,7 | n. d. |
| <i>Trametes versicolor 85</i> | | 140,0 | n. d. |
| <i>Trametes versicolor 87</i> | | 60,4 | n. d. |
| <i>Wolfiporia cocos</i> | | 26,5 | n. d. |

3.2.2 Sequenzanalyse der Peptidase A aus *Trametes hirsuta*

Da sich im Laufe der im Folgenden beschriebenen Reinigung Parallelen zu dem von Rajagopalan *et al.* (2013a) publizierten alkenspaltendes Enzym aus *Trametes hirsuta* (siehe 1.2.2.1) zeigten, soll hier zu Beginn näher darauf eingegangen werden. Es wurde mittels der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) eine Sequenzanalyse durchgeführt. Das *Pleurotus sapidus*-Genom ist nicht vollständig sequenziert, Psa jedoch mit dem bereits sequenzierten *Pleurotus ostreatus* eng verwandt. Der BLASTp (*Protein Basic Local Alignment Search Tool*, genutzte Matrix *BLOSUM 50* mit Standardeinstellungen) der publizierten Aminosäuresequenz gegen das *Pleurotus ostreatus*-Genom ergab eine Sequenzidentität von 92 % (siehe Abbildung 29). Die entsprechende Sequenz ist als hypothetisches Protein annotiert (Accession: KDAQ29413 (Riley *et al.*, 2014)). Beide Sequenzen weisen dabei ein Signalpeptid (rot markiert) auf und stimmen in ihren katalytischen Motiven überein (gelb). Das Protein gehört zur Pepsin-retropepsin Familie mit einer hohen Ähnlichkeit zu einer Peptidase A aus Basidiomyceten. Um aufzuklären, ob es sich bei dem untersuchten Protein ebenfalls um eine Peptidase handelt, wurde es zunächst gereinigt.

| | | | |
|-----|-----|---|-----|
| Thi | 1 | <u>MILSRFAPLALLPFVA</u> ADGVHKLKLTCLPPATSNPLLESAYLAEKYGG-GSQMPLSAGIG | 59 |
| | | :.: . :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: | |
| Pos | 1 | <u>MILTS-TLLGLL</u> PFVAADGLHRLPLKMPSTASNPSEAAAYLAEKYGGVQAQVPLMGAGG | 59 |
| Thi | 60 | <u>RNVRSRPTVKDGEELFWTQDEF</u> STEGGHNVPLSNFMNAQYFAEITLGTPPQSFVKVILDDT | 119 |
| | | . :. . :. | |
| Pos | 60 | SGRRVPQ-----SDLFRTQEEIN--GGHNVPLSNFMNAQYFSEITLGTPPQTFKVIDDT | 111 |
| Thi | 120 | <u>GS</u> SNLWVPSTKCTSIACFLHAKYDSTASSTYKANGSEFSIQYGSMEGFVSQDVLITIGD | 179 |
| | | :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: | |
| Pos | 112 | <u>GS</u> SNLWVPSTKCTSIACFLHAKYDSSSSSTYKNGTEFSIQYGSMEGFVSQDVLITIGD | 171 |
| Thi | 180 | ITIKNQDFAEATKEPGLAFAGKFDGILGLGYDTISVNHITPPFYQMMNQKLVDSPVFSF | 239 |
| | | . : :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :. | |
| Pos | 172 | LKIPRQDFAEATKEPGLAFAGKFDGILGLGYDTISVNHITPPFYSMINHGLLDDPVFSF | 231 |
| Thi | 240 | RLGSSEEDGGEAIFGGVDETAYSKGIEYVPRRKAYWEVELESIKLGDELELDNTGAAI | 299 |
| | | :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :. | |
| Pos | 232 | RIGKSEGDGGEAIFGGIDTSAFTGKLNYPVRRKAYWEVELESVGFDDHLELNTGAAI | 291 |
| Thi | 300 | <u>DTGT</u> SLIALPSDLAEMLNQIGAKKSWNGQYTVDCAKVPTLPDLTFYFSGKPYTLKGTDY | 359 |
| | | :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :. | |
| Pos | 292 | <u>DTGT</u> SLIALPTDIAEMLNQIGAKKSWNGQYTVDCSKVPDLPDLTFTFGQKYPLAASDY | 351 |
| Thi | 360 | VLEVQGTCMSSFTGIDINLPGGALWIIGDVFLRKYTYVDHGRDAVGFALA | 411 |
| | | .: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :. | |
| Pos | 352 | ILNVQGTCSAFTGLDINVP-GGSLWIIGDVFLRRYTYVDKGRDAVGFALA | 402 |

Abbildung 29: Alignment auf Aminosäureebene (*BLOSUM 50* mit Standardeinstellungen) der publizierten Sequenz aus *Trametes hirsuta* (Thi, Accession: AHL68248.1 (Rajagopalan *et al.*, 2013a)) mit der Sequenz eines hypothetischen Proteins aus *Pleurotus ostreatus* (Pos, Accession: KDQ29413 (Riley *et al.*, 2014)). Sequenzidentität 92 %. Signalpeptid (rot), katalytische Motive (gelb), Prä-Pro-Peptid unterstrichen. Identische Aminosäuren mit „:“, ähnliche Aminosäuren mit „.“ gekennzeichnet.

3.2.3 Reinigung einer alken-spaltenden Enzymaktivität aus *P. sapidus*

Pleurotus sapidus (Psa) setzte im Screening sowohl *trans*-Anethol als auch Piperin um. Zur Isolierung der entsprechenden alken-spaltenden Enzymaktivität wurde deswegen dieser Organismus ausgewählt. Für den Aktivitätsassay wurde im Folgenden nur *trans*-Anethol als Substrat verwendet, da dieses gegenüber Piperin eine deutlich höhere Umsatzrate aufwies (62,7 % vs. 2,9 %). Um der alken-spaltenden Enzymaktivität in Psa weiter auf den Grund zu gehen, wurde das Enzym im ersten Schritt teilgereinigt und im weiteren Verlauf mittels verschiedener Aktivitätsassays und analytischer Methoden untersucht.

Zunächst wurden in Vorversuchen die optimalen Bedingungen für die Umsetzung von *trans*-Anethol zu *p*-Anisaldehyd bestimmt. Dabei wurde bei pH 6 und 16 h Inkubationsdauer bei Raumtemperatur (RT) die höchste Umsetzung erzielt. Im Folgenden wird auf die besten Reinigungsmethoden eingegangen.

3.2.3.1 Dreistufige Reinigung der alkenspaltenden Enzymaktivität

Als zielführendste Methode erwies sich eine Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) gefolgt von einer Kationenaustauschchromatografie (IEX) und einer Größenausschlusschromatografie (SEC).

Für die HIC wurde lyophilisiertes Psa-Myzel mit Bis-Tris-Puffer mit 1 M Ammoniumsulfat extrahiert, membranfiltriert und auf eine 20 mL Phenyl-Säule (*fast flow*) aufgetragen. Die gesuchte Aktivität eluierte mit 100 % Wasser (siehe Abbildung 30). Eine Stufenelution erzielte keine weitere Reinigung.

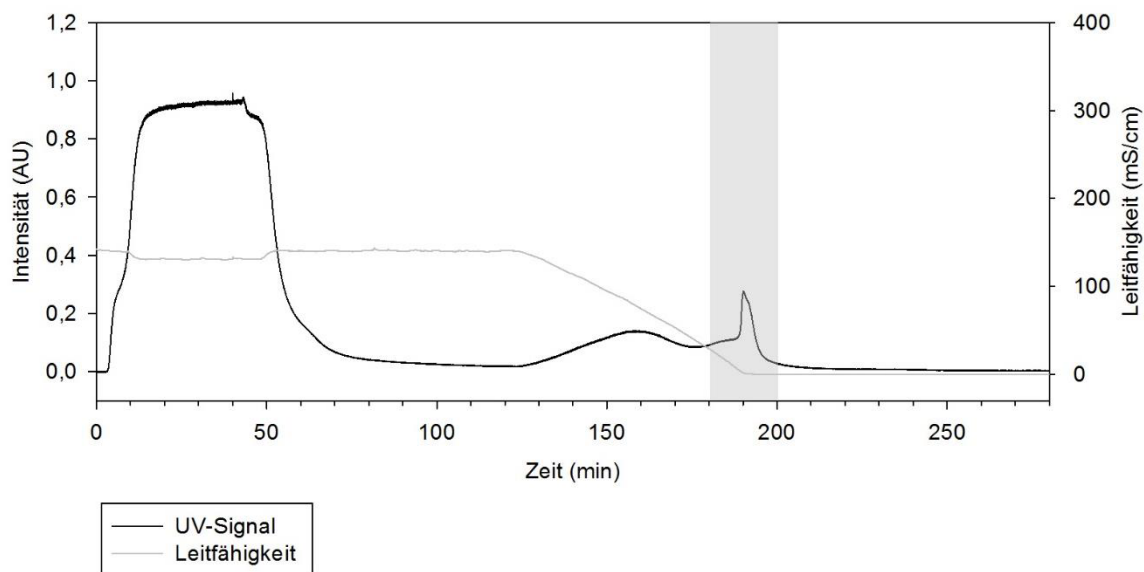


Abbildung 30: HIC-Chromatogramm von lyophilisiertem Psa-Myzel: Phenyl FF, 20 mL. Puffer B: Wasser. Puffer A: Bis-Tris-Puffer 50 mM, pH 6 + 1 M $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$, 80 mL filtrierte Probe. Puffer A 100 % 150 mL, linearer Gradient: Puffer A 100 % - 0 % in 130 mL. Fluss 2 mL min^{-1} . Detektion 280 nm.

Die aktive HIC-Fraktion wurde zur Charakterisierung hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes (pI) mittels isoelektrischer Fokussierung getrennt. Dabei zeigten sich zwei pIs bei 5,2 und 8,7. Ausgehend davon wurde bei der nachfolgenden Reinigung mittels IEX ein Natriumacetatpuffer (pH 4) eingesetzt, um eventuell mehrere für die Alkenspaltung verantwortlichen Enzyme zu trennen. Die Trennung erfolgte anschließend mit Hilfe von drei in Reihe geschalteter 1 mL Sepharose-Säulen (*fast flow*). Die gesuchte Aktivität eluierte mit 20 % beziehungsweise 100 % NaCl-haltigem Puffer (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

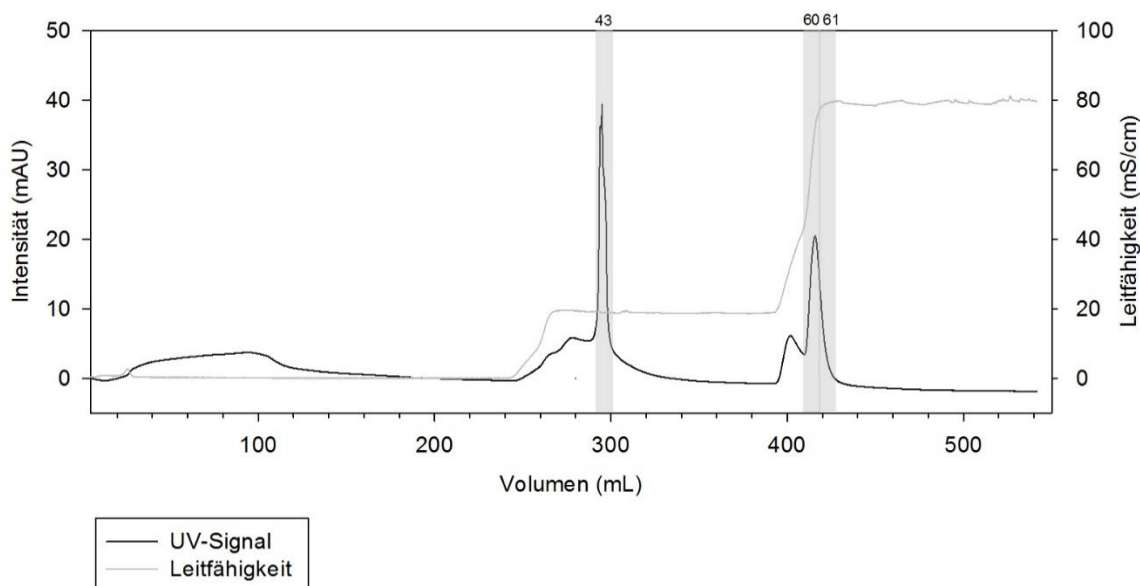


Abbildung 31: IEX-Chromatogramm der vereinigten aktiven HIC-Fractionen: SP FF, 25 mL. Puffer A: Natriumacetat 20 mM, pH 4. Puffer B: Natriumacetat 20 mM, pH 4 + 1 M NaCl. 80 mL aktive HIC-Probe, Puffer A 100 % (200 mL), Stufengradient: Puffer A 80 % (150 mL), 0 % (200 mL). Fluss 2 mL min⁻¹. Detektion 280 nm.

Nach der IEX wurden in den aktiven Fraktionen während des Aktivitätsassays nur sehr geringe Anisaldehyd-Konzentrationen detektiert, welche sich auch durch ein *Up-Scaling* der Reinigung nicht signifikant erhöhten. Bei dem von Rajagopalan *et al.* (2013a) identifizierten alkenspaltenenden Enzym handelte es sich um eine Mangan(III)-abhängige Metallopeptidase. Die Autoren beschrieben ebenfalls einen starken Aktivitätsverlust nach dem zweiten Aufreinigungsschritt. Um die hohen Aktivitätsverluste während der Reinigung zu kompensieren, wurde analog Rajagopalan *et al.* (2013a) dem Aktivitätstest Mn(III)acetat zugesetzt. Durch die Zugabe von 0,5 mM Mangan(III)acetat wurde die Anisaldehyd-Konzentration in den aktiven Fraktionen (Fraktion 43, 60, 61) um das 44-, 15- beziehungsweise 14-fache gesteigert (siehe Abbildung 32). Das gesuchte Enzym wies dementsprechend ebenfalls eine Mangan(III)-Abhängigkeit auf. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Fraktionen 60 und 61 vereinigt und als eine Fraktion behandelt, da diese in einem Peak eluierten.

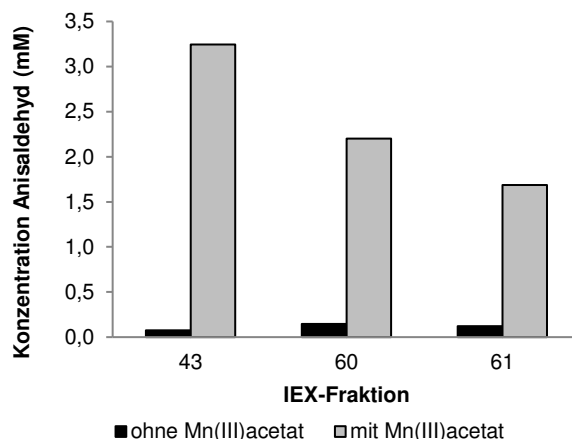


Abbildung 32: Biotransformation von *trans*-Anethol zu Anisaldehyd durch IEX-Fractionen (7 mL) mit und ohne Zugabe von Mn(III)acetat (0,5 mM).

Als dritter Reinigungsschritt wurde eine SEC durchgeführt. Die aktiven IEX-Fractionen (Peak 1 und 2) wurden dazu mittels Gefriertrocknung konzentriert und jeweils auf eine Superdex 75-Säule aufgetragen. Als Elutionspuffer wurde ein 50 mM Bis-Tris-Puffer mit 10 mM NaCl (pH 6) verwendet. Es zeigten sich jeweils zwei aktive Fractionen (siehe Abbildung 33).

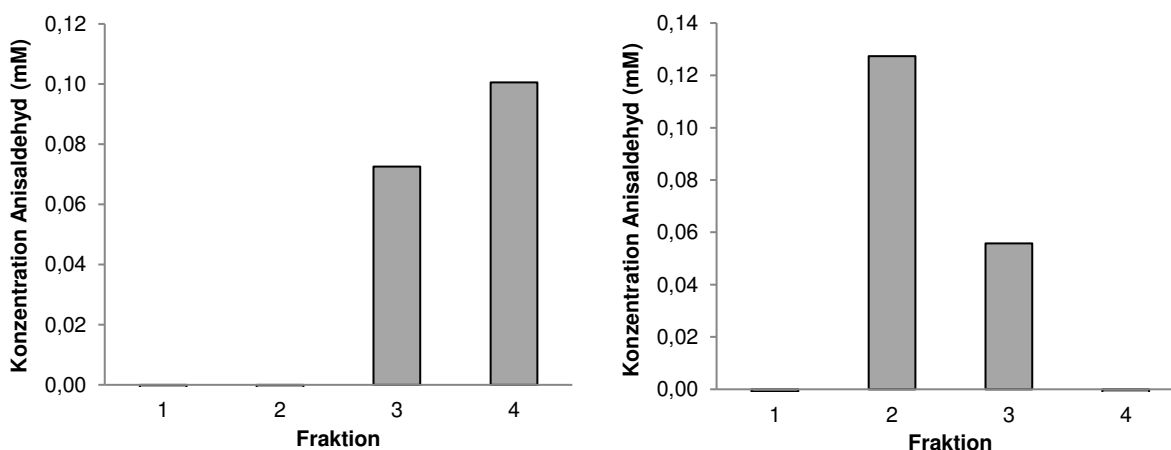


Abbildung 33: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Inkubation von *trans*-Anethol (7 mM) mit SEC-Fractionen (pH 6) in Anwesenheit von Mn(III)acetat (0,4 mM). Der chemische Blindwert (ohne SEC-Fraktion) wurde von den Proben subtrahiert. Links: Peak 1 der IEX. Rechts: Peak 2 der IEX.

Zur möglichen Identifizierung und Überprüfung des Reinigungserfolgs wurde nach der dreistufigen Reinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) ein SDS-Polyacrylamidgel angefertigt (siehe Abbildung 34). Während in der Spur des extrahierten Lyophilisats aufgrund der Vielzahl der enthaltenen Proteine keine Einzelbanden erkennbar waren, war nach dem ersten Reinigungsschritt der HIC (H) bereits ein erster Reinigungserfolg sichtbar. Die Spuren der beiden aktiven IEX-Fractionen enthielten noch zahlreiche Banden (IEX1 und IEX2). Nach der SEC zeigten sich einzelne Banden im Bereich von 40 kDa (SEC1 4) beziehungsweise 70 kDa

(SEC2 2) und 26 kDa (SEC2 2/3). Diese wurden ausgeschnitten und nach einer tryptischen Spaltung die Proteinsequenz mittels ESI-MS/MS analysiert. Mit den gefundenen Partialsequenzen wurden durch einen Datenbankabgleich (*Mascot search*) Homologien zu bekannten Proteinsequenzen gesucht.

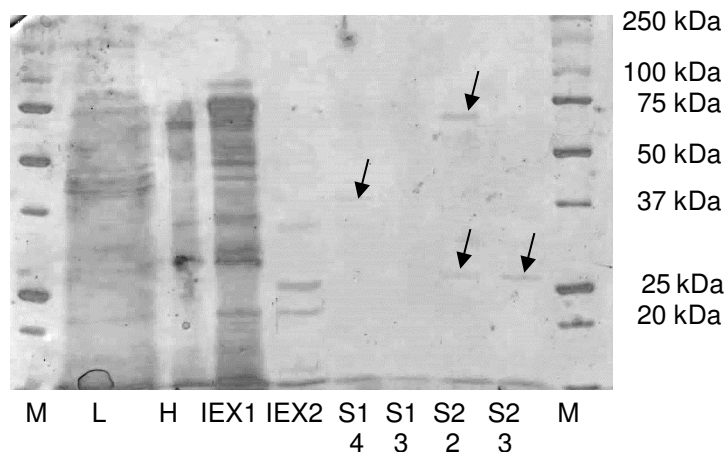


Abbildung 34: SDS-PAGE des Reinigungsprozesses. *Precision plus Protein Standard* (M), Psa-Lyophilisat (L), aktive HIC-Fraktion (H), IEX-Peak 1 (IEX1), IEX-Peak 2 (IEX2), SEC 1 Fraktion 4 (S1 4), SEC 1 Fraktion 3 (S1 3), SEC 2 Fraktion 2 (S2 2), SEC 2 Fraktion 3 (S2 3).

Die Sequenzierung der gereinigten Proteine ergab keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der gesuchten Aktivität. Es wurden nur einige wenige Peptide detektiert, die zudem nur geringe Homologien zu für die Aktivität ohnehin unwahrscheinlichen Proteinen wie beispielsweise dem *Thaumatin-like*-Protein aus *Laccaria bicolor* (40 kDa-Bande) aufwiesen. Bei *Thaumatin-like*-Proteinen handelt es sich oftmals um Glucanasen (Liu *et al.*, 2010). Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich nicht um das für die Alkenspaltung verantwortliche Enzym handelte. Es gab weiterhin keine Homologien zu dem publizierten alkenspaltenden Enzym aus *Trametes hirsuta*. Es war demnach wahrscheinlich, dass ein neues alkenspaltendes Enzym vorlag.

Um eine höhere aktive Enzymausbeute zu erzielen und damit weitere Untersuchungen durchzuführen, wurden weitere Reinigungsstrategien evaluiert. In der Literatur sind für Basidiomyceen - darunter auch in *Pleurotus* - zahlreiche Peptidasen beschrieben (Eisele *et al.*, 2011; Leonhardt *et al.*, 2016). Deshalb wurde vermutet, dass das gesuchte Enzym möglicherweise während der Reinigung durch diese Peptidasen abgebaut wird. Um dem entgegenzuwirken,

wurde dem Extraktionspuffer im ersten Reinigungsschritt ein Peptidaseinhibitorgemisch zugesetzt. Im anschließenden Aktivitätstest sank allerdings die Produktkonzentration um die Hälfte im Vergleich zu der Probe ohne Peptidaseinhibitor (siehe Abbildung 35).

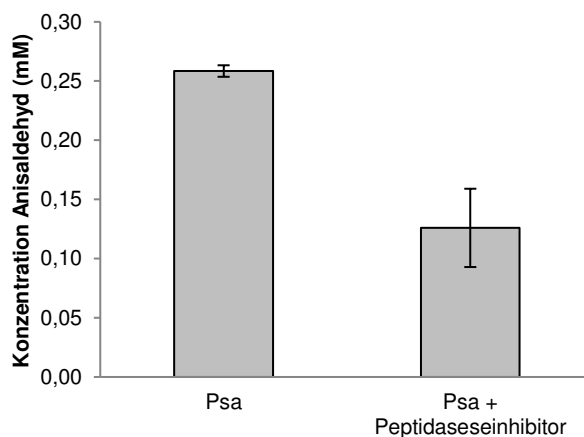


Abbildung 35: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 μL *trans*-Anethol zu Anisaldehyd mit Psa-Lyophilisat ohne beziehungsweise mit Peptidaseinhibitor (1 h, 4°C). n = 2.

Möglicherweise komplexierte das im Inhibitorgemisch enthaltene Phenantrolin potenzielle Cofaktoren und bewirkte so die Aktivitätsabnahme. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass es sich, wie oben bereits diskutiert, bei dem gesuchten Enzym um eine Peptidase ähnlich der aus *Trametes hirsuta* handelt. Im Azocasein-Assay wurde nach dem ersten Reinigungsschritt (HIC) jedoch keine Peptidase-Aktivität mehr detektiert, sodass dies ausgeschlossen wurde.

3.2.3.2 Isoelektrische Fokussierung als alternative Reinigungsstrategie

Nach der IEX wurde ein deutlicher Rückgang der alkenspaltenden Enzymaktivität beobachtet, weshalb zu geringe Aktivitäten für die SEC einsetzbar waren, um nach der SEC genügend Aktivität für weitere Untersuchungen zu erhalten. Deshalb wurden alternative Reinigungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit überprüft. Als weitere Strategie wurde eine analytische isoelektrische Fokussierung (IEF) der aktiven HIC-Fraktion durchgeführt. Dazu wurden zwei identische Proben parallel aufgetrennt. Eine Spur wurde mittels Coomassie angefärbt und diente zur Lokalisierung von Proteinbanden. Die zweite Spur wurde in gleichmäßige Stücke geteilt, in Reaktionsgefäße überführt und die Umsetzung von Anethol überprüft (siehe 2.6.2.3). Allerdings wurde dabei kein Produkt detektiert. Bei einer Umsetzung mit jeweils zwei gepoolten Gelstücken zur Erhöhung der Proteinkonzentration und somit der Enzymaktivität im Gel war der gaschromatografische Nachweis des Anisaldehyds auf Grund von Störeinflüssen durch das Gel unmöglich.

Deshalb wurde anstatt der analytischen eine präparative IEF (pIEF) mit der aktiven HIC-Fraktion durchgeführt. Die Aktivität verteilte sich auf zahlreiche Fraktionen, sodass jeweils nur niedrige Anisaldehyd-Konzentrationen erzielt wurden (Abbildung 36, links). Die Fraktionen mit den größten Aktivitäten wurden mittels einer 3 kDa-Membran zehnfach konzentriert und einer SDS-PAGE unterzogen. Mittels Silberfärbung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht (Abbildung 36, rechts).

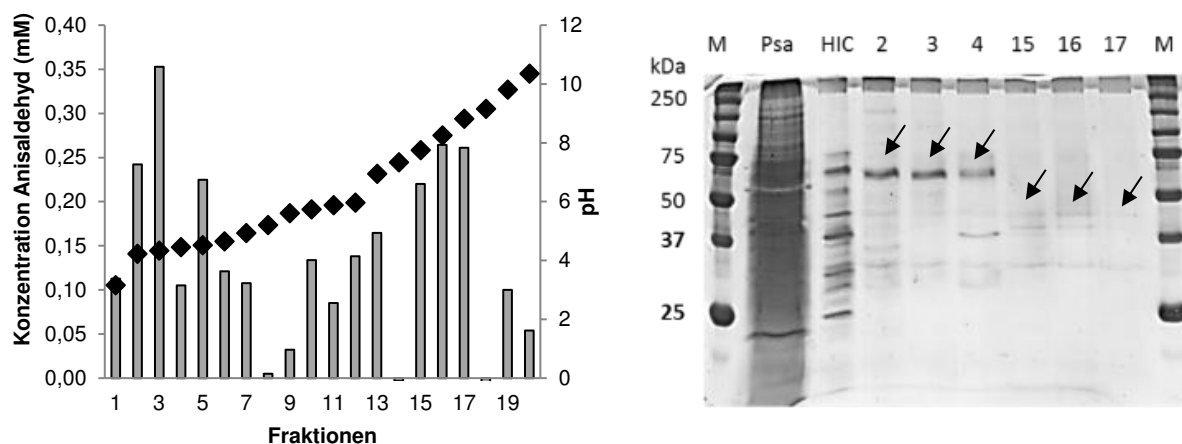


Abbildung 36: Links: Konzentration an Anisaldehyd (mM, graue Balken) nach Umsetzung von 1 μ L *trans*-Anethol mit pIEF-Fraktionen (Blindwert subtrahiert) und entsprechende pH-Werte (schwarze Rechtecke). Rechts: SDS-PAGE (12 %, Silberfärbung) der aktiven pIEF-Fraktionen: *Precision plus Protein Standard* (M), Psa-Lyophilisat (L), aktive HIC-Fraktion eluiert mit 100 % Wasser (HIC), aktive pIEF-Fraktionen (2-4, 15-17). Alle Fraktionen wurden mittels einer 3 kDa-Membran konzentriert.

In Fraktionen zwei bis vier (pH 4,2 – 4,5) ist eine Bande bei 67 kDa, bei den Fraktionen 15 bis 17 (pH 7,7 – 8,8) sind Doppelbanden bei 43 kDa sichtbar. Die Banden wurden ausgeschnitten und nach tryptischer Spaltung mittels ESI-MS/MS sequenziert. Für die 67 kDa-Bande wurde ein hypothetisches Protein aus *Pleurotus ostreatus* (Score 386, 5 % Sequenzabdeckung) gefunden, das zu der Familie der Esterasen/Lipasen gehört (gi|646307541, siehe Anhang 5.2.1). Bei den anderen Banden wurden keine aussagekräftigen Treffer erzielt. Dies könnte wiederum an den geringen Proteinkonzentrationen liegen.

Mit der entwickelten Reinigungsmethode konnte das für die Aktivität verantwortliche Enzym nicht eindeutig identifiziert werden. Deshalb wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung und Aufklärung der Aktivität unternommen.

3.2.4 Biotransformation von *trans*-Anethol durch eine Lipoxygenase aus *P. sapidus*

Im Rahmen der Aktivitätstest wurde auch eine bereits identifizierte Lipoxygenase aus Psa (LOX_{Psa}1) (Plagemann *et al.*, 2014) auf ihre alken-spaltende Aktivität untersucht. So zeigte sich, dass die rekombinante LOX_{Psa}1 aus *E. coli* in Anwesenheit von Linolsäure *trans*-Anethol ebenfalls umzusetzen vermag (siehe Abbildung 37). Linolsäure (LA) oder Lipoxygenase alleine ohne Zusatz eines Mediators katalysierten die Reaktion dagegen nicht. Eine Verdopplung der LA-Konzentration im Reaktionsansatz resultierte in einer höheren Produktausbeute, was auf eine Limitierung durch die Linolsäurekonzentration hindeutete.

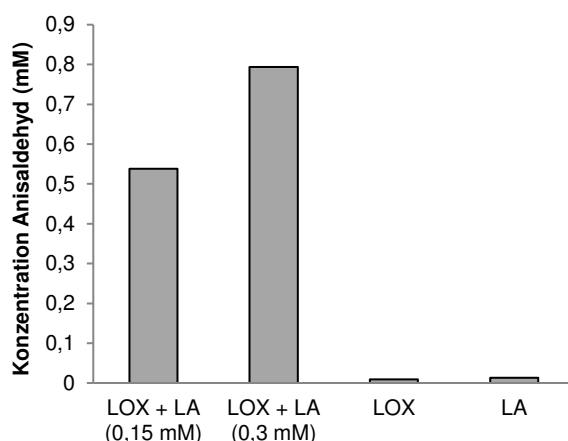


Abbildung 37: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 μ L *trans*-Anethol zu Anisaldehyd mittels LOX_{Psa}1 (*E. coli*) und 0,15 mM beziehungsweise 0,3 mM Linolsäure (LOX + LA) sowie Blindwerte (LOX, LA).

Die Zugabe von Linolsäure (1,25 mM) zum Reaktionsansatz mit zellfreiem Extrakt von Psa-Lyophilisat bewirkte ebenfalls einen Anstieg der Anisaldehyd-Konzentration (siehe Abbildung 38). Bei weiterer Erhöhung der LA-Konzentration (2,5 mM) wurde kein Effekt mehr erfasst.

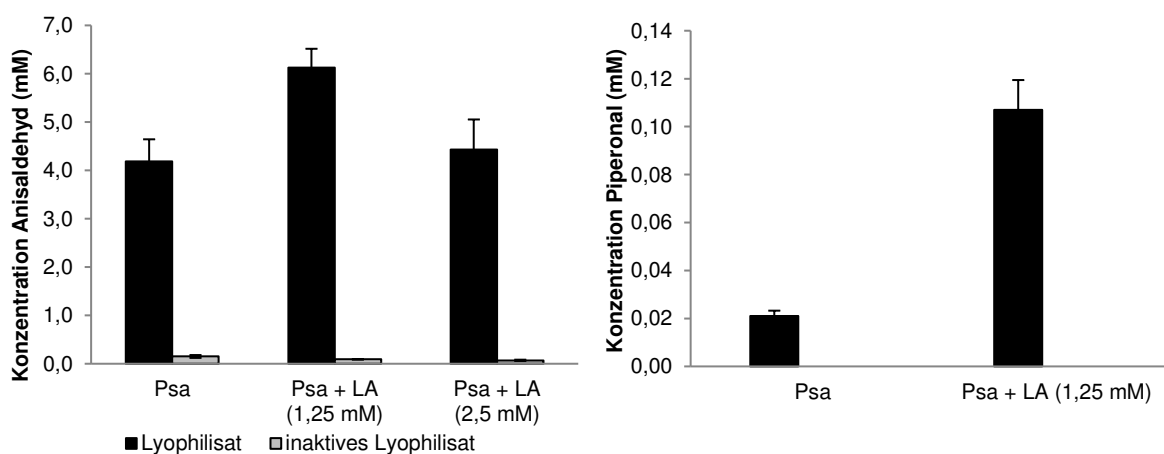


Abbildung 38: Produktkonzentrationen (mM) nach Umsetzung von *trans*-Anethol (7 mM, links) beziehungsweise Piperin (0,7 mM, rechts) mittels zellfreiem Extrakt von Psa-Lyophilisat mit und ohne Linolsäure (LA) und Blindwerte (inaktiviertes Lyophilisat). n = 3.

Wurde Piperin als Substrat verwendet, so wurde durch Zusatz von Linolsäure zum Lyophilisat der Umsatz um das fünffache gesteigert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es bei Piperin zwei mögliche Spaltstellen gibt im Gegensatz zu Anethol (siehe Abbildung 39), was eine geringere Produktkonzentration an Piperonal erklärt. Weiterhin wurde aufgrund der geringen Löslichkeit des Piperins (10 mg L^{-1} bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ in Wasser) weniger Substrat eingesetzt, was ebenfalls eine geringere Produktkonzentration erklärt.

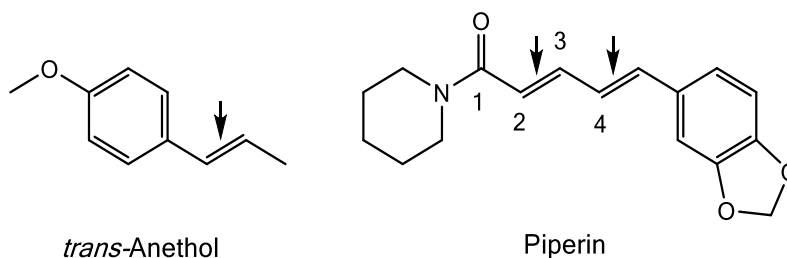


Abbildung 39: Mögliche Spaltstellen bei der Alkenspaltung mit einer Lipoxygenase in Anwesenheit von Linolsäure (angedeutet durch Pfeile).

Für die rekombinante LOX_{Psa}1 aus *E. coli* wurde auch bei verschiedenen Substratkonzentrationen, LA-Konzentrationen, Temperaturen und Inkubationszeiten stets ein Produktverhältnis von Piperonal zu (2 E)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-Propenal kleiner eins ermittelt (siehe Anhang 5.1). Dies bedeutet, dass stets mehr (2 E)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-Propenal als Piperonal entsteht. Die Spaltung der Doppelbindung an der C 2-Position ist demnach bevorzugt gegenüber der Spaltung an der C 4-Position.

Entsprechende Co-Oxidationen sind in der Literatur bereits für Carotinoide beschrieben (Aziz *et al.* (1999), Wu *et al.* (1999)). Ein denkbarer Mechanismus für die Entstehung des Anisaldehyds aus Anethol mittels Lox in Anwesenheit von Linolsäure ist eine Abstrahierung eines Wasserstoffatoms am Anethol durch ein Peroxyradikal der LA. Dies ist möglich, wenn intermediär gebildete Peroxyradikale nicht sofort und vollständig zu Hydroperoxiden weiterreagieren. Das entstehende Alkylradikal reagiert mit Sauerstoff und zerfällt zu Anisaldehyd und vermutlich Acetaldehyd (Ikediobi und Snyder, 1977).

Weiterhin ist eine Co-Oxidation durch Addition des Linolsäurehydroperoxids an Anethol denkbar, wie Mordi *et al.* (1993) es für β -Carotin beschrieben haben. Dabei entstehen durch die homolytische Spaltung der C=C-Bindung Epoxide, welche zu Anisaldehyd zerfallen können.

Die Präsenz der Lipoxygenase in Psa mit der Fähigkeit Alkene zu spalten erschwerte die Identifizierung und Charakterisierung weiterer alkenspaltender Enzymaktivitäten. Jedoch war ein Vorhandensein einer weiteren Aktivität evident, da nach Reinigung stets eine Restaktivität vorhanden war, welche unabhängig von einer Linolsäurezugabe war. Die Co-Oxidation durch die Lox wurde für diese Arbeit nicht weiter untersucht, da der Fokus auf der Aufklärung der von Lox unabhängigen alkenspaltenden Enzymaktivität lag.

3.2.5 Identifizierung einer LOX_{Psa1}-unabhängigen alken-spaltenden Enzymaktivität

Nach der Teilreinigung des von der LOX_{Psa1}-unabhängigen alken-spaltenden Enzyms (siehe 3.2.2) wurden in den aktiven Fraktionen weder Lox-Aktivität nachgewiesen, noch wurde ein Nachweis der LOX_{Psa1} mittels Proteinsequenzierung der vorhandenen Banden im SDS-PAGE-Gel der aktiven Fraktionen erbracht. Allerdings nahm die alken-spaltende Aktivität im Reinigungsverlauf stark ab, was einen Hinweis auf ein weiteres cofaktorabhängiges Enzym lieferte.

3.2.5.1 Einfluss von Cofaktoren auf die Anethol-Umsetzung

Anhand der aktiven HIC-Fractionen wurde zunächst der Einfluss verschiedener möglicher Cofaktoren (NADPH, NADH, Fe(II), Fe(III), Mg(II), Mn(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II)) auf die Aktivität getestet. Im Vergleich zu der aktiven HIC-Fraktion ohne Zusatz von Cofaktoren (HIC) erzielte eine Fe(II)-Zugabe einen Anstieg der Produktkonzentration um das Vierfache (siehe Abbildung 40, links). Allerdings war auch die Aktivität in der inaktivierten HIC-Fraktion (95 °C für 45 min) mit Fe(II) um das Dreifache höher als die aktive HIC-Fraktion ohne Cofaktor. Alle anderen Cofaktoren führten zu einer Verringerung der Aktivität oder zeigten keinen signifikanten Effekt.

Die zugehörigen Blindwerte, d. h. die alleinige Zugabe von Fe(II) ohne HIC-Fraktion (BW Fe(II)) beziehungsweise nur die inaktivierte HIC-Fraktion ohne Zugabe von Fe(II) (BW HIC), ergaben keine Erhöhung der Anisaldehydkonzentration im Vergleich zum Blindwert (BW) ohne Zugabe von HIC-Fraktion und Fe(II) (siehe Abbildung 40, rechts). In Kombination der inaktivierten HIC-

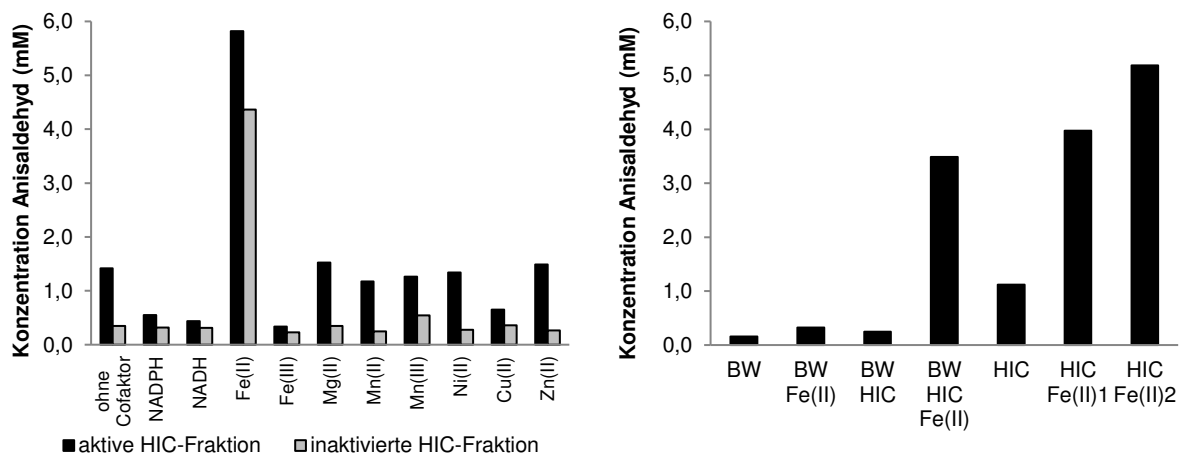


Abbildung 40: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 μ L *trans*-Anethol mit 100 μ L HIC-Fraktion. Links: Effekt von Cofaktoren. Rechts: Blindwerte (BW) mit und ohne Fe(II) und aktive Proben (HIC-Fractionen) mit 1 mM Fe(II) (HIC Fe(II)1) und 2 mM Fe(II) (HIC Fe(II)2).

Fraktion mit Fe(II) (BW HIC Fe(II)) kam es allerdings bereits zur Anethol-Umsetzung, welche höher war als mit der aktiven Fraktion ohne Fe(II)-Zugabe (HIC). Die Aktivität nahm außerdem bei Verdopplung der Fe(II)-Konzentration weiter zu, was eine Enzymaktivität zusätzlich als unwahrscheinlich erscheinen ließ.

Mögliche Erklärungsversuche sind eine Komplexierung des Fe(II) und eine daraus resultierende Aktivierung zur Anethol-Umsetzung (Dhakshinamoorthy und Pitchumani, 2006; Roelfes *et al.*, 2000).

Bei Zugabe von Mn(III), Linolsäure und Fe(II) zu den aktiven IEX-Fractionen (zweiter Reinigungsschritt) zeigten diese Cofaktoren jeweils deutlich unterschiedliche Einflüsse auf die Produktbildung (siehe Abbildung 41, links). Peak 1 der IEX (IEX 1) war hauptsächlich abhängig von Fe(II) während Peak 2 der IEX (IEX 2) hauptsächlich von Linolsäure abhängig war. Bei Durchführung desselben Versuchs mit der rekombinanten LOX_{Psa1} aus *E. coli* wurde wiederum ein anderes Muster erzielt. Eine enzymatische Umsetzung erfolgt nur in Anwesenheit von Linolsäure (siehe Abbildung 41). Hier wurde keine Aktivität im Blindwert (95 °C für 45 min) detektiert. Bei Zugabe von Fe(II) war allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der aktiven und der inaktivierten Probe zu erkennen.

IEX1 ist bei Vernachlässigung von Fe(II) als nichtenzymatischen Effekt hauptsächlich von Mn(III) abhängig, während IEX2 von Mn(III) und Linolsäure abhängig ist.

Die eisenabhängige Umsetzung wurde wie zuvor erläutert auf nichtenzymatische Prozesse zurückgeführt und deshalb nicht weiter untersucht.

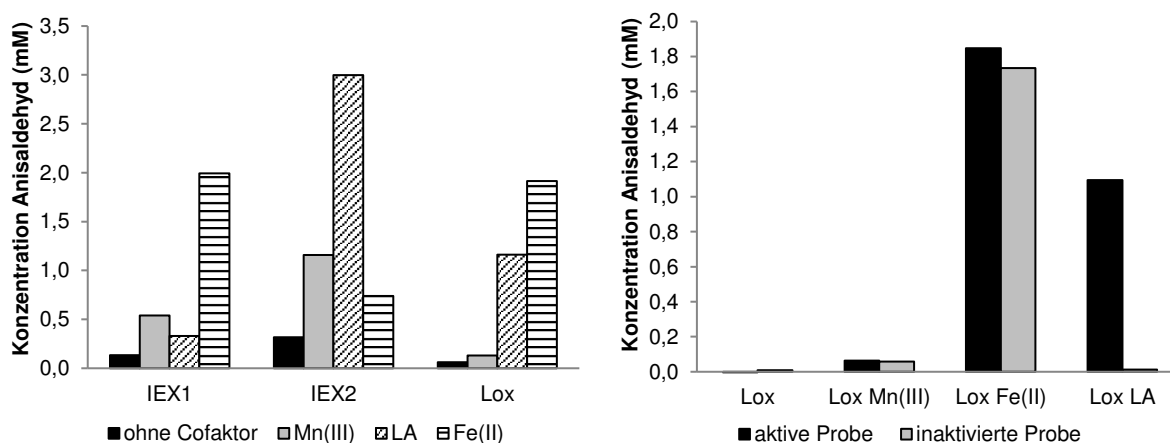


Abbildung 41: Links: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 µL *trans*-Anethol mit 100 µL IEX-Fraktion (IEX1, IEX2) beziehungsweise rekombinanter LOX_{Psa1} (Lox) ohne Cofaktoren (schwarz), mit Mn(III)acetat (grau), mit Linolsäure (LA, schräg gestreift), mit Fe(II)sulfat (gerade gestreift). Rechts: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 µL *trans*-Anethol mittels rekombinanter LOX_{Psa1} und entsprechende Blindwerte (Inaktivierung 95 °C, 45 min) mit und ohne Mn(III), Fe(II) oder LA.

Des Weiteren wurde analysiert, ob Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Fe(II) und Linolsäure bereits einen Effekt auf die Anethol-Umsetzung besitzt. Dabei zeigte sich, dass Anethol zwar umgesetzt wird, dies allerdings auf den Fe(II)-Zusatz zurückzuführen ist, da die Umsetzung auch ohne H₂O₂ stattfindet (siehe Abbildung 42, links). Bei Zusatz der IEX-Fractionen steigt die Umsetzung um 55 % beziehungsweise 33 % (siehe Abbildung 42, rechts), was auf eine leichte H₂O₂-Abhängigkeit hindeutet.

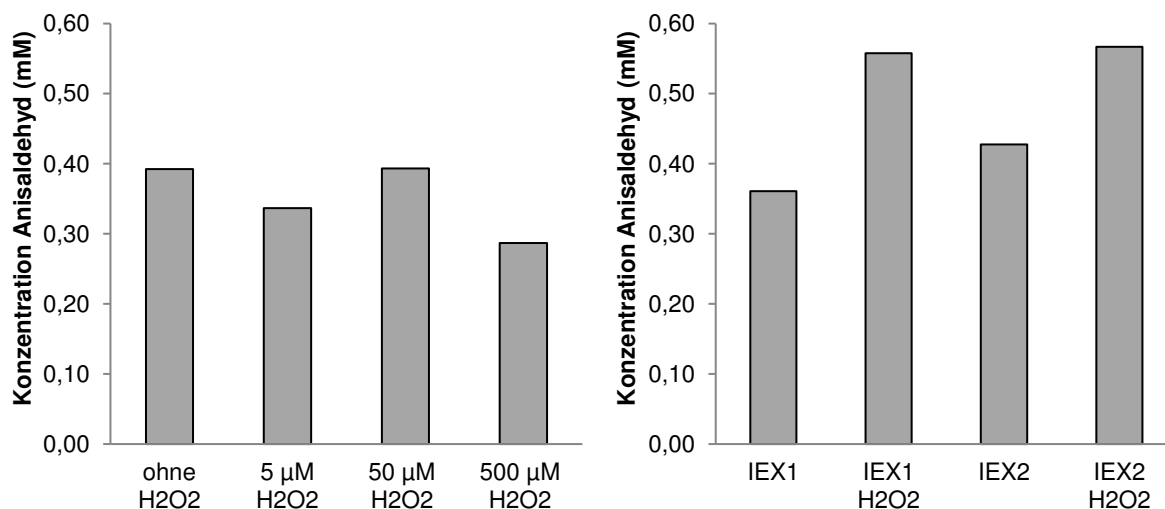


Abbildung 42: Konzentration an Anisaldehyd (mM) nach Umsetzung von 1 µL *trans*-Anethol in Anwesenheit von FeSO₄ (1 mM) und Linolsäure (2,5 mM). Links: Mit 0 µM, 5 µM, 50 µM und 500 µM H₂O₂. Rechts: Mit IEX-Fractionen (IEX1/IEX2) und ohne beziehungsweise mit 50 µM H₂O₂.

3.2.5.2 Untersuchung der IEX-Fractionen auf Peroxidaseaktivität

Aufgrund der H₂O₂-Abhängigkeit wurde vermutet, dass das Enzym zu den Oxidoreduktasen gehört, weshalb ein Glyceroloxidase- und ein Peroxidase- beziehungsweise Laccase-Assay durchgeführt wurde.

Im Glyceroloxidase-Assay mit Dianisidin als Substrat wurde vor allem in der IEX2-Fraktion mit alkenspaltender Aktivität eine Wasserstoffperoxidbildung detektiert. Die dazugehörige SDS-PAGE der konzentrierten IEX-Fractionen enthielt mehrere Proteinbanden (siehe Abbildung 43). Bei der aktiven Fraktion 1 der IEX (IEX1) wurden die Bande bei 74 kDa (1), die Bande bei 55 kDa (2) und die Doppelbande bei 30 kDa (3) ausgeschnitten und nach tryptischer Spaltung zur massenspektrometrischen Analyse der Aminosäuresequenz genutzt (siehe Tabelle 17). Dabei wurde bei der 55 kDa-Bande (2) ein hypothetisches Protein aus *Pleurotus ostreatus* identifiziert (gi|646308841, Score 104), welche Homologien zu einer Oxidoreduktase aufweist (konservierte

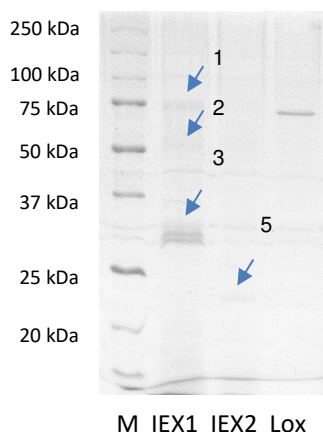


Abbildung 43: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (12 %) der teilgereinigten alkenspaltenden Enzymaktivitäten aus Psa (HIC und IEX). *Precision plus Protein Standard* (M), IEX-Fraktion 1 (IEX1), IEX-Fraktion 2 (IEX2), rekombinante LOX_{Psa1} aus *E. coli* (Lox).

Domänen: NAD(P)/NAD(P)⁺ Bindedomäne, NADB-Rossmann-Superfamilie, Glucose-Methanol-Cholin-(GMC)-Oxidoreduktase). Zur Rossmann-Superfamilie gehören Proteine, die NAD(P)H/ NAD(P)⁺ über eine Rossmann-Faltung binden. Dabei lagern sich zwei β -Faltblätter über α -Helices zusammen, um Dinukleotide wie NAD⁺ zu binden. Bei der aktiven Fraktion 2 der IEX (IEX2) wurde bei der 23 kDa-Bande (4) ein hypothetisches Protein aus *Pleurotus ostreatus* gefunden (gi|646302281, Score 204), welches Homologien zu einer NADP-abhängigen Oxidoreduktase aufweist (konservierte Domänen: NADB-Rossmann-Superfamilie, *short-chain-Dehydrogenase/ Reduktase-Familie*). In den IEX-Fraktionen wurde keine Lox als mögliches für die Aktivität verantwortliches Enzym gefunden. Die als Standard mitgeführte Positivprobe (rekombinante LOX_{Psa1} aus *E. coli*) wurde dagegen erfolgreich identifiziert.

Die Ergebnisse der Proteinsequenzierung bestätigten dementsprechend das Vorhandensein einer Oxidoreduktase in den Fraktionen, wodurch Wasserstoffperoxid zur Verfügung gestellt werden kann.

Tabelle 17: Homologien der Partialsequenzen zu Proteinen aus *Mascot*-Suche. Weitere Treffer mit geringeren Scores finden sich im Anhang.

| Bande Nr. | Molekülmasse (kDa) | Peptidsequenzen | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|-----------|--------------------|---|--|-------|----------------------|
| 1 | 74 | TSTPEPTR VLLPAPFILGSTIR | hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Asparaginase | 150 | 4 |
| 2 | 55 | AIAVEFVR AQHEIVLR ELGGVVDTEL EVVVSAGTIGTPK | hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , GMC-Oxidoreduktase, gi 646308841 | 104 | 4 |

| Bande Nr. | Molekülmasse (kDa) | Peptidsequenzen | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|-----------|--------------------|--|---|-------|----------------------|
| 3 | 30 | ADYTLTFCP GPFDASGFPVGCR | hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Thaumatin-like Protein | 236 | 8 |
| 4 | 23 | LFAVNVR GLTQSAAQEYGK GIPEAACYSSTK GVAITGAAEGIGR LVSDGFDVAINDIPAK | hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Acetoin Reduktase, gi 646302281 | 204 | 19 |

Des Weiteren wurde in der IEX2-Fraktion eine Peroxidaseaktivität im ABTS-Assay nachgewiesen. Laccase-Aktivität wurde dagegen nicht festgestellt. Die IEX1-Fraktion zeigte in Glyceroloxidase- und Peroxidase-Tests nur leichte Aktivität.

Um weitere Aufschlüsse über ein mögliches alkenspaltendes Enzym zu erhalten und die Peroxidasen im Gel sichtbar zu machen, wurde ein semi-natives Polyacrylamidgel angefertigt und eine Aktivitätsfärbung mit ABTS durchgeführt. Dabei wurden zwei Banden bei 45 kDa und 50 kDa detektiert (siehe Abbildung 44, rechts). Eine zweite Spur im selben Gel mit den gleichen Proben wurde mittels Coomassie gefärbt (siehe Abbildung 44, links). Dabei wurden an den Stellen der Peroxidasefärbung keine Banden detektiert. Im Coomassie-gefärbten Gel wurden Gelstücke entsprechender Höhe ausgeschnitten, peptidolytisch gespalten und die Proteinsequenzen mittels ESI-MS/MS analysiert. Zusätzlich wurde die Bande bei 75 kDa sequenziert, um sicherzustellen, dass es keine Verschiebung der Banden im Vergleich zur Peroxidasefärbung gab.

Bei der 50 kDa-Bande wurden keine verwertbaren Treffer erzielt. Dagegen wurde bei der 45 kDa-Bande eine Peroxidase mit einer molekularen Masse von 54,9 kDa aus *Pleurotus ostreatus* gefunden (gi|646301722, Score 55).

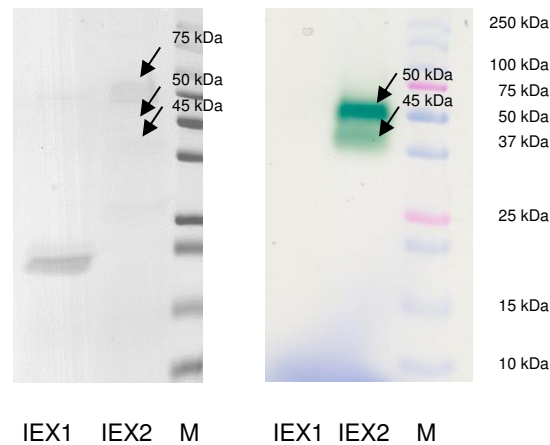


Abbildung 44: Semi-natives PA-Gel (12%) der IEX-Fractionen 14 und 17 (konzentriert mittels 3 kDa-Membran) nach Reinigung des Psa-Lyophilisats mittels HIC und IEX und Färbung mittels Coomassie (Links) beziehungsweise Aktivitätsfärbung mit ABTS und H_2O_2 zur Bestimmung von Peroxidasen (rechts).

Peptid 1: EGSELLGAR

Peptid 2: DGSFLTFR

Peptid 3: SGAPIEITPLKDDPK

Die detektierten Peptide sind in der Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* enthalten. Allerdings betrug die Sequenzabdeckung nur 6 % (siehe Abbildung 45). Aufgrund der Peroxidasefärbung sowie der Zugehörigkeit beider Organismen zum Genus *Pleurotus* wurde jedoch eine Übereinstimmung für wahrscheinlich gehalten.

```

MTTPAPPLDLNNIQGDILGGLPKRTETYFFFDVTNVDQFKANMAHFIPHIKTSAGIIKDREAIKEHKR
QKKPGLVPMAAVNVSFHSLGLQKLGITDDLSDNAFTTGQRKDAEILGDPGSKNGDAFTPAWEAPF
LKDIHGVIFVAGDCHGSVNKKLDEIKHIFGVGTSHASISEVTHVRGDVRPGDVHAHEHFGFLDGIS
NPAVEQFDQNPLPGQDPIRPGFILAKENGDSRAARPDWAKDGSFLTFRYLFQMVPDFDDFLES
NPVLPGLSRKEGSELLGARIVGRWKSGAPIEITPLKDDPKLAADAQRNNKFDGDSLVRGDQTKC
PFAAHIRKTYPRNDLEGPPLKADIDNRRIIRRGIQFGPEVTSQEHHDKKTHHGRLLFVCYSSIDD
GFHFIQESWANAPNFPVNAVTSAGPIPLDGVVPGFDAIIGQKVGGGIRQISGTNPNDPTTNITLPD
QDFVVPRGGEYFFSPSITALKTKFAIGVASPAPHSQAPISA
  
```

Abbildung 45: Aminosäuresequenz einer Peroxidase aus *Pleurotus ostreatus* (gi|646301722). Detektierte Partialsequenzen wurden grau hinterlegt.

In einem weiteren Test wurde zu der IEX-Fraktion 2 mit Peroxidaseaktivität bei der Anethol-Umsetzung ABTS zugesetzt. Damit wurde überprüft, ob ABTS als möglicher Mediator eine erhöhte Umsetzung von Anethol verursacht. In der Literatur sind bereits verschiedene mediator-abhängige Reaktionen beschrieben (Bohlin *et al.*, 2005; Kulshrestha und Husain, 2007; Satar und Husain, 2009). Da der Test keine signifikante Erhöhung der Anisaldehydkonzentration aufwies, wurde ABTS folglich als Mediator ausgeschlossen.

Bei der 75 kDa-Bande wurde erneut ein hypothetisches Protein mit einer Molekülmasse von 69,9 kDa aus *Pleurotus ostreatus* gefunden, das unter anderem eine GMC-Oxidoreduktase-Binderegion enthält (gi|646308841, Score 339). Schlussfolgernd ergeben die Ergebnisse der Proteinsequenzierung und der Aktivitätstests, dass sich in der IEX-Fraktion 2 eine Peroxidase sowie eine Oxidoreduktase befinden.

Es ist bereits bekannt, dass Peroxidasen in der Lage sind Alkene zu spalten (Mutti *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2004). Die Existenz einer Oxidoreduktase, welche Wasserstoffperoxid produziert, wäre eine Erklärung für den starken Aktivitätsverlust nach der Reinigung. Durch das Fehlen des Wasserstoffperoxid-Lieferanten würde nur eine reduzierte Peroxidase- und somit alkenspaltende Aktivität – ermöglicht durch eventuell vorhandene Restperoxide – detektiert werden. Inwieweit diese Peroxidase industrielle Anwendung zur Alkenspaltung finden kann, muss nach eindeutiger Identifizierung geklärt werden. Basierend auf den in dieser Arbeit gefundenen Partialessenzen könnte das entsprechende Gen identifiziert und heterolog exprimiert werden. Auf diese Weise könnten ausreichende Enzymaktivitäten für eine umfassende Enzymcharakterisierung erzielt werden.

3.2.6 Einordnung des Potenzials der Enzyme mit alkenspaltenden Aktivitäten aus *P. sapidus* für die industrielle Anwendung

Einführend wurde bereits die Bedeutung enzymatischer Alkenspaltungen für die Industrie dargestellt (siehe 1.2). Chemische Methoden können nicht zur Synthese von natürlichen Aromastoffen im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 verwendet werden. Es existieren zwar bereits einige enzymatische Prozesse zur Alkenspaltung, allerdings konnten diese aufgrund von geringen Ausbeuten oder einer Cofaktor-Abhängigkeit nicht in der Industrie zum Einsatz kommen. Das Basidiomycetenscreening innerhalb dieser Arbeit ergab von 18 nur zwei Basidiomyceten, die eine solche Aktivität aufwiesen. Diese besondere Aktivität in Psa wurde auf zwei Enzyme zurückgeführt: Eine Lipoxygenase (LOX_{Psa1}) und eine Peroxidase. LOX_{Psa1} katalysierte die Reaktion dabei nur in Anwesenheit von Linolsäure. Eine derartige Co-Oxidation wie beispielsweise die Bildung von β -Ionon aus β -Carotin mittels Lipoxygenase/Linolsäure-System konnte in der Industrie bisher keine Anwendung finden (Zelena *et al.*, 2009). Das von der Peroxidase benötigte Wasserstoffperoxid hingegen könnte durch eine *in-situ*-Produktion von Peroxiden bereitgestellt werden, und so eine attraktive Möglichkeit zur Bildung von Aromastoffen darstellen. Nach Optimierung des Systems könnte so eine Umsetzung von Piperin oder anderen Ausgangsstoffen wie Isosafrol zu Piperonal verwirklicht werden. Damit zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse einen lohnenden Ansatz zu einer neuartigen Gewinnung von natürlichen Aromastoffen auf.

3.3 Bildung von (5 *E*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on mittels *Piptoporus betulinus*

Bei Submerskultivierung des Basidiomyceten *Piptoporus betulinus* (Pbe) in vorangehenden Arbeiten im Institut auf Weißkohlschnitt (*Brassica oleracea* var. *capitata*) entwickelte sich im Kulturverlauf ein angenehmer Geruch nach Ananas und Honig (Schimanski, 2014). Mittels Gaschromatografie gekoppelt mit olfaktorischer Detektion wurden zwei für den ananasartigen Geruch hauptverantwortliche Substanzen ermittelt. Durch Bestimmung der exakten Masse (150,096 amu), Massenspektren und NMR-Spektren konnte eine der Substanzen als (5 *E*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on (Decatrienon) identifiziert werden (siehe Abbildung 46). Die Konfiguration an C 7 ist bisher nicht eindeutig geklärt. Hinsichtlich der zweiten Substanz wurde aufgrund der exakten Masse und Massenspektren angenommen, dass es sich um ein Isomer handelt. Weiterhin wurde eine Substanz mit süßlich grünem Geruch detektiert, welche mittels Vergleich der Kovats-Indices und Massenspektren als der entsprechende Alkohol (5 *E/Z*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-ol (siehe Abbildung 46) identifiziert wurde.



Abbildung 46: Strukturformeln von (5 *E*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on (links) und (5 *E/Z*, 7 *E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-ol (rechts).

Da es sich um einen neuen Aromastoff handelt, ist dieser nicht in der Positivliste des Anhangs der VO (EG) Nr. 1334/2008 aufgeführt. Dementsprechend müsste eine Einführung als Aromastoff über das Zulassungsverfahren der EFSA führen. Voraussetzung für dessen Rentabilität ist die vollständige Aufklärung der Struktur und des Biogeneseweges sowie ein industriell lukrativer Herstellungsprozess.

Der Biogeneseweg blieb bislang unklar. Aufgrund der Struktur des Decatrienons wurde zunächst vermutet, dass es sich um ein Produkt des Fettsäureabbaus einer ungewöhnlichen ungeradzahigen Fettsäure handelt. Jedoch wurden im Myzel von Pbe keine entsprechenden ungeradzahigen Fettsäuren gefunden. Deshalb sollte zur Aufklärung der Biogenese des Decatrienons dessen Bildung zunächst forciert werden und somit auch Erkenntnisse über mögliche Präkursoren gewonnen werden.

3.3.1 Anreicherung des Decatrienons

Eine Erhöhung der Decatrienonbildung war prinzipiell durch Induktion der Kulturen oder durch Supplementierung eines Präkursors zu den Kulturen denkbar. Prinzipiell kann eine Induktion mittels spezifischer Substanzen oder Reizen (wie zum Beispiel Licht) erfolgen, welche dann die Produktion bestimmter Enzyme anregen und somit zu einer erhöhten Bildung des Decatrienons führen.

3.3.1.1 Induktion mit Glucosinolaten

Bei Kultivierung von Pbe auf Weißkohl wurde bereits eine Steigerung der Decatrienon-Konzentration im Vergleich zur Kultivierung in SNL festgestellt (Schimanski, 2014). Typische Inhaltsstoffe von *Brassicaceae*n wie dem Weißkohl sind Glucosinolate. Diese sekundären Pflanzenstoffe können fungizid wirken (Osborn, 1996). Eine Hypothese war, dass die Glucosinolate als Abwehrstoffe der Pflanze bei Pbe die Bildung des Decatrienons induzieren könnten. Dazu wurde Pbe nach zweitägiger Vorinkubation unter Zugabe eines 1 μM beziehungsweise 100 μM Glucosinolat-Gemisches (Glucoiberin, Glucocapparin, Glucosinalbin und Glucotropaeolin) kultiviert (siehe 2.7.1). Es wurde allerdings keine Erhöhung der Decatrienon-Konzentration gegenüber der in SNL kultivierten Kultur detektiert. Eine Induktion durch Glucosinolate war demnach unwahrscheinlich, sodass diese Hypothese nicht weiterverfolgt wurde.

3.3.1.2 Supplementierung mit Linol- und Linolensäure

Anfangs wurde die Hypothese aufgestellt, dass Decatrienon aus dem Fettsäureabbau einer ungeradzahligen Fettsäure stammt. Wie oben bereits erwähnt, wurden bei einer weiteren Analyse der Weißkohl-Inhaltsstoffe jedoch keine hohen Gehalte an ungeradzahligen Fettsäuren festgestellt. Dagegen war auffällig, dass Weißkohl nach Nasirullah *et al.* (1984) zwar einen niedrigen Gehalt an Gesamt-Lipiden aufweist (0,12 g/100 g), jedoch ein hoher Gehalt an Linol- und Linolensäure hervorsteicht. Deshalb wurde zunächst durch Zugabe von Linolsäure beziehungsweise eines Linolensäure-Gemischs versucht, die Decatrienonbildung zu steigern (siehe 2.7.2.1).

Während der Kultivierung wurde in der Kultur mit Linolensäure-Gemisch bereits ein wesentlich intensiverer Geruch nach Ananas wahrgenommen als in den Kulturen mit SNL beziehungsweise SNL mit Linolsäure. Nach Ernte und gaschromatografischer Aufarbeitung der Kulturen wurde bei Kultivierung mit Linolensäure-Gemisch im Vergleich zur Kultivierung in SNL eine um das Dreifache höhere Konzentration an Decatrienon und eine um das Achtfache höhere Konzentration an Decatrienol detektiert (siehe Abbildung 47). Eine Linolsäuresupplementierung ergab dagegen keine Erhöhung der Decatrienon/-trienol-Konzentrationen.

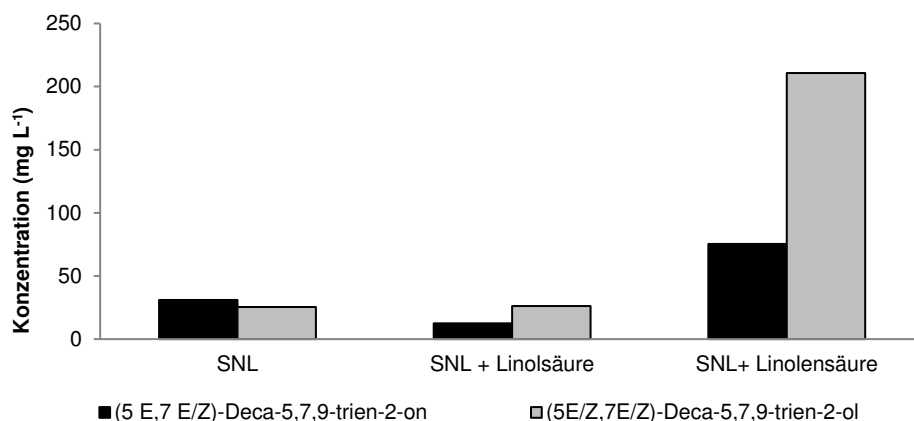


Abbildung 47: Konzentration (mg L⁻¹) an Decatrienon beziehungsweise Decatrienol nach Kultivierung von Pbe in SNL, Pbe in SNL + Linolsäure und Pbe in SNL + Linolensäure-Gemisch.

3.3.1.3 Supplementierung von α - und γ -Linolensäure

Bisher wurde für die Supplementierungen ein Gemisch aus α - und γ -Linolensäure verwendet. In einem zweiten Versuch wurden α - und γ -Linolensäure in zwei getrennten Ansätzen zum Medium zugegeben (siehe 2.7.2.2), um die Ergebnisse zu bestätigen und gleichzeitig mögliche unterschiedliche Effekte von α - und γ -Linolensäure zu evaluieren.

Es wurde ein Panel aus zehn Probanden zu den Aromaeindrücken der Kulturen befragt. Sechs von zehn Probanden empfanden Kulturen mit Linolensäure stärker nach Ananas riechend als ohne. Alle Probanden nahmen einen intensiveren Ananas-Geruch in Kulturen mit α -Linolensäure verglichen mit Kulturen mit γ -Linolensäure wahr. Dabei wiesen Kulturen mit γ -Linolensäure einen zusätzlichen muffigen Geruch auf. Die gaschromatografische Analyse ergab hingegen keine signifikante Erhöhung der Decatrienon-Konzentration in Kulturen mit α -Linolensäure im Vergleich zu den Kulturen ohne Supplementierung. Der muffige Geruch in den Kulturen mit γ -Linolensäure beruht vermutlich auf einer höheren Konzentration von 1-Octanol und 1-Octen-3-ol gegenüber nicht supplementierten Kulturen.

Als mögliche Ursache dafür, dass nur mit dem Linolensäure-Gemisch, nicht aber mit den Reinstoffen eine Erhöhung der Decatrienon-Konzentration erzielt wurde, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Decatrienol durch radikalischen Abbau aus Linolensäure entsteht. Als Ursache wurde dabei ein unterschiedlicher Gehalt an Linolensäure-Hydroperoxiden in dem Linolensäure-Gemisch der ersten Kultivierung gegenüber der α -Linolensäure der zweiten Kultivierung in Betracht gezogen. Bei Bestimmung des Hydroperoxid-Gehalts (siehe 2.7.2.3) nach Huber und Fröhle (1972) wurde in der α -Linolensäure nur 1/5 des Hydroperoxid-Gehalts des Linolensäure-Gemisches detektiert (siehe Abbildung 48). Dies festigte die Hypothese, dass die Bildung von Decatrienon durch Hydroperoxide beeinflusst wird.

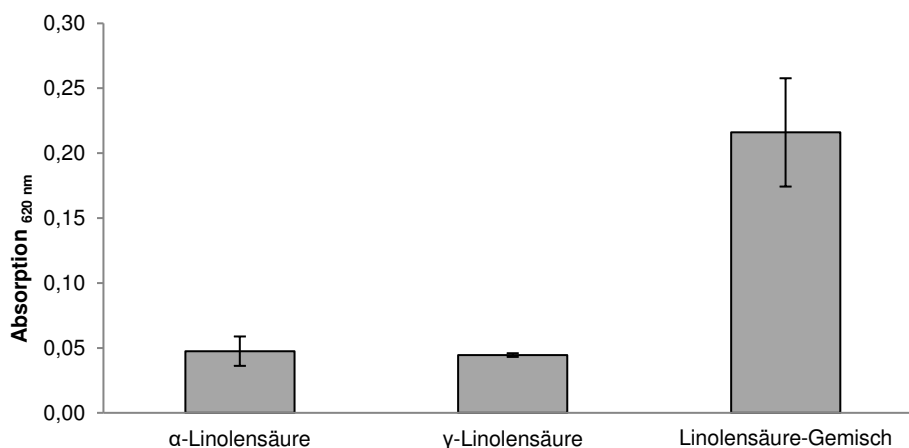


Abbildung 48: Absorption der Linolensäure-Lösungen bei 620 nm nach Inkubation mit Huber-Reagenz ($n = 2$).

Dementsprechend wurden erneut Kulturen mit Supplementierung des partiell oxidierten Linolensäure-Gemischs (500 μ M) angesetzt (siehe 2.7.2.4). Analog wurde in einem weiteren Ansatz Wasserstoffperoxid supplementiert, um einen eventuellen Effekt der Hydroperoxide zu bestätigen. Jedoch erfolgte keine Zunahme der Decatrienon/Decatrienol-Konzentration bei Linolensäure beziehungsweise H_2O_2 -Supplementierung. Auch bei zweimaliger Supplementierung mit Linolensäure erfolgte keine Erhöhung der Decatrienon-Konzentration. Diese Kultur entwickelte im Laufe der Kultivierung eine starke Trübung mit dennoch starkem Ananas-Geruch. Eine Kontamination wurde durch mikroskopische Kontrolle der Kultur ausgeschlossen. Die GC-Analyse zeigte im Vergleich zur Kultur in SNL ein verändertes Aromaspektrum, allerdings wurde keine erhöhte Konzentration an Decatrienon festgestellt.

3.3.1.4 Vergleich der Blindwerte der Linolensäure-Kultivierungen

Die in Kapitel 3.3.1.2 beschriebene Erhöhung der Decatrienon-Konzentration bei Supplementierung mit Linolensäure konnte nicht reproduziert werden. Um die Ursache dieses Phänomens aufzuklären, wurden die GC-FID-Chromatogramme der Blindwerte (Pbe in SNL ohne Supplementierung) der Kultivierungen mit Linolensäure-Gemisch (1. Kultivierung) und α -Linolensäure

(2. Kultivierung) verglichen. Dabei wurde ein unterschiedliches Aromaspektrum festgestellt, obwohl die zweite Kultivierung analog zur ersten durchgeführt wurde (siehe Abbildung 49). Da sich die Chromatogramme nach P/E-Extraktion bereits ohne Supplementierung stark unterschieden, schien die Decatrienon-Bildung durch einen unbekanntem externen Faktor beeinflussbar und im Blindwert der zweiten Inkubationsreihe bereits stark angeregt worden zu sein.

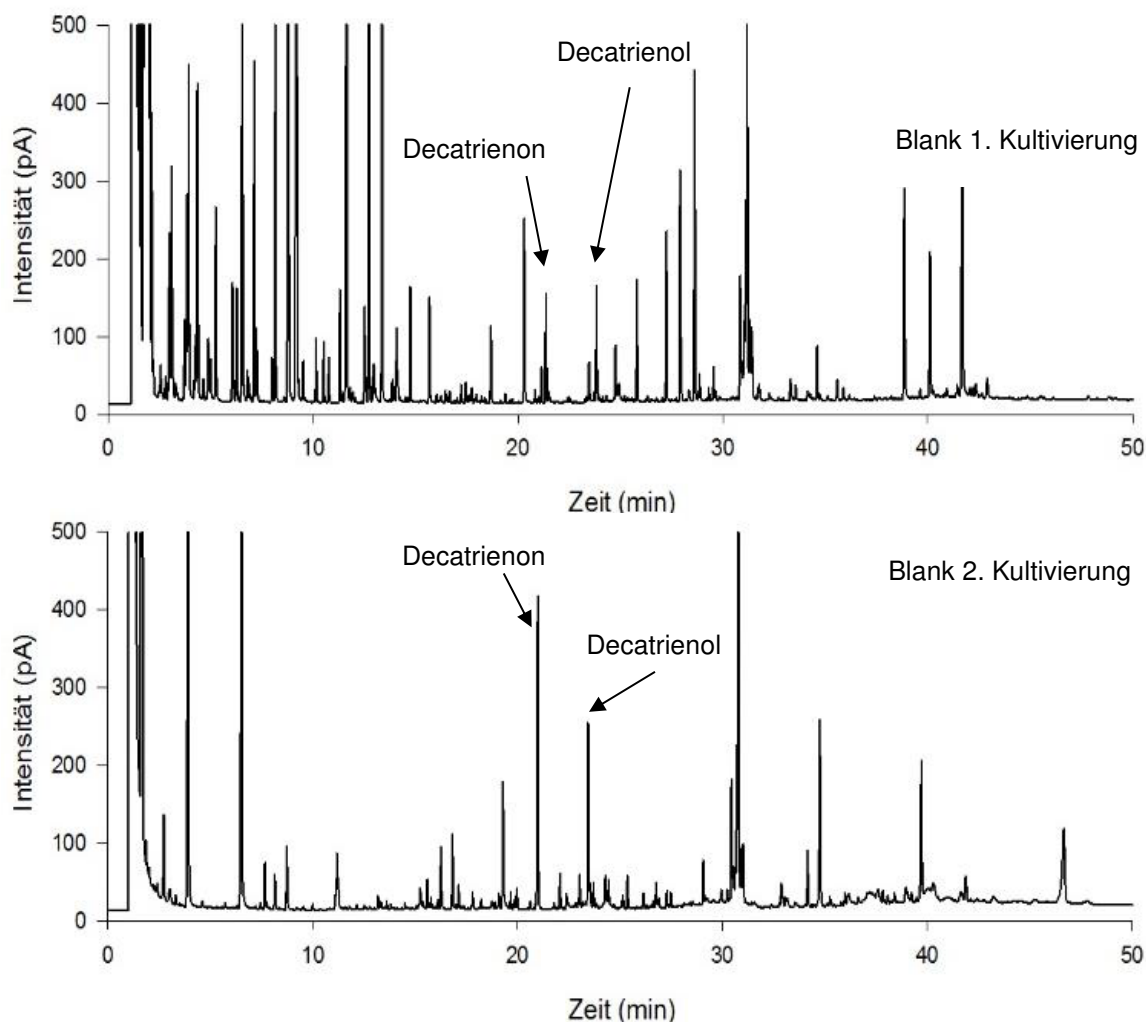


Abbildung 49: GC-FID Chromatogramme (CP-Wax 52 CB) der Blindwerte der Kultivierungen mit Linolensäure (Pbe in SNL ohne Supplementierung von Linolensäure). 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/ 230 °C (10 min); *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890, ODP3 (Gerstel).

3.3.1.5 Lichtinduktion

Die verschiedenen Aromaprofile der Pbe-Kulturen bei den vermeintlich gleichen Bedingungen lassen auf einen unbekanntem externen Einflussfaktor schließen. In der Literatur sind bereits verschiedene Einflüsse von Licht auf das Wachstum von Basidiomyceten und Auswirkungen auf einige Enzymaktivitäten bekannt. So hat zum Beispiel UV-A Licht einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum von *Nidula niveo-tomentosa* und die Synthese des Himbeerketons

(Taupp *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde von Ramírez *et al.* (2010) der Effekt unterschiedlicher Wellenlängen auf *Phanerochaete chrysosporium* untersucht. Dabei wurden ein hemmender Effekt von blauem und UV-Licht auf die Ligninperoxidase-Produktion und ein induzierender Effekt durch grünes Licht festgestellt. Zheng *et al.* (2009) fanden dagegen heraus, dass Tageslicht die Biosynthese von Polyphenolen in *Inonotus obliquus* inhibiert und im Gegensatz dazu Dunkelheit oder blaues und rotes Licht deren Bildung fördert. Ähnlich war auch ein Effekt von Licht auf die Bildung des Decatrienons denkbar. Deshalb wurde Pbe in einer Phytokammer mit Bestrahlung durch Leuchtstoffröhren oder durch LED-Bestrahlung (rot und blau) in einem 16/8-h hell/dunkel Rhythmus inkubiert (siehe 2.7.2.4). Weiterhin wurde eine Kultur ständig im Dunklen inkubiert. Um kulturbedingte Schwankungen auszugleichen, wurde eine Kultur unter Standardbedingungen mitgeführt. Während der Kultivierung erfolgte eine sensorische Evaluierung der Kulturen. Nach 8 Tagen Inkubation wurden die Kulturen geerntet, der Kulturüberstand extrahiert und anschließend gaschromatografisch analysiert.

Nach sechs Tagen entwickelte sich in allen Kulturen ein Geruch nach Ananas, wobei die Kultur in Dunkelheit den stärksten Geruch aufwies (siehe Tabelle 18). Im weiteren Kulturverlauf verschob sich der Aromaeindruck, sodass an Tag 8 die belichteten Kulturen einen stärkeren Ananas-Geruch aufwiesen. Dabei variierte das Wachstum der Kulturen deutlich. Die mit LEDs-bestrahlte Kultur wies deutlich größere, stärker abgegrenzte Pellets auf als die anderen drei Kulturen. Da es bei der Kultivierung mit roten und blauen LEDs zu einer Erwärmung der Schüttelplatte kam, ist der Effekt allerdings nicht eindeutig auf die Lichtverhältnisse zurückzuführen.

Tabelle 18: Stärke des Ananas-Geruchs in den Pbe-Kulturen unter variierenden Lichtbedingungen. - kein Ananas-Geruch, + schwacher Ananas-Geruch bis +++++ starker Ananas-Geruch.

| Kultur-tag | Ananas-Geruch | | | |
|------------|---------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Dunkelheit | Blaue und rote LEDs | Leuchtstoffröhren | Standardbedingungen |
| 3 | - | - | - | - |
| 6 | ++ | + | + | + |
| 8 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ |

Die gaschromatografische Auswertung ergab keine Erhöhung des Decatrienon-Gehalts in den belichteten Kulturen im Vergleich zu den Kulturen unter Standardbedingungen (siehe Abbildung 50). In der mit LEDs bestrahlten Kultur wurde sogar wesentlich weniger Decatrienon/Decatrienol detektiert. Der dennoch intensive Geruch muss demnach durch ein verändertes Aromaspektrum erklärt werden.

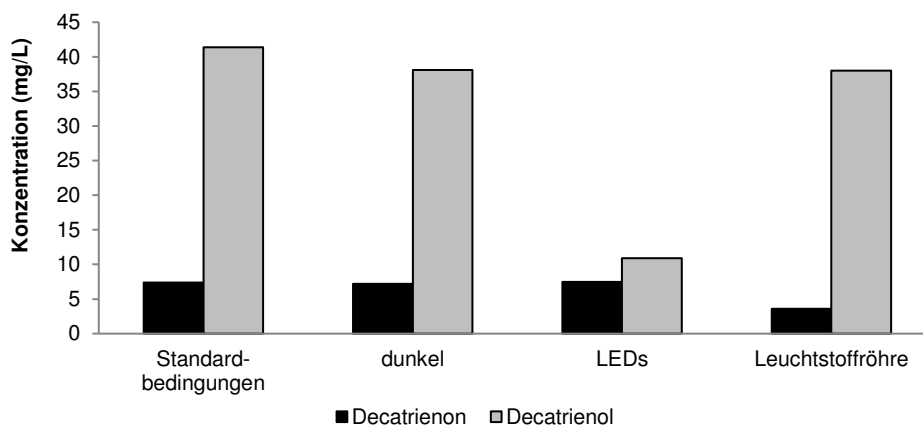


Abbildung 50: Konzentrationen (mg L^{-1}) an Decatrienon und Decatrienol in Pbe-Kulturen unter Standardbedingungen, im Dunklen, bei Belichtung mit LEDs und mit Leuchtstoffröhren.

Die Lichtinduktion bewirkte zwar eine Veränderung des Aromaspektrums, allerdings wurde nicht die erwünschte Induktion der Decatrienon-Produktion erzielt. Eine Anreicherung von Decatrienon durch Induktion mit Glucosinolaten, Linol- und Linolensäure sowie Licht wurde somit ausgeschlossen.

3.3.2 Polyketid-Stoffwechsel als möglicher Geneseweg

Da die Analyse des Fettsäurespektrums des Pbe-Myzels beziehungsweise des Kohlextraktes keine größeren Konzentrationen an ungeradzahigen Fettsäuren ergab, lag die Vermutung nahe, dass das Decatrienon nicht aus dem Fettsäurestoffwechsel, sondern aus einem anderen Stoffwechselweg stammt.

Ein der Fettsäuresynthese ähnlicher Stoffwechselweg ist der Polyketidweg. Es handelt sich dabei um einen vor allem in Pilzen und anderen Mikroorganismen aber auch in Tieren vorkommenden Stoffwechselweg. Dabei werden die Polyketide aus einer Startereinheit (meist Acetyl-Coenzym A) und mehreren Verlängerungseinheiten mit Hilfe von Polyketid-Synthasen aufgebaut. Durch eine Vielzahl an Modifizierungen wie Zyklisierungen, Methylierungen oder Oxigenierungen bilden Polyketide eine heterogene Stoffklasse mit oftmals aromaaktiven Verbindungen. Ein derartiger Syntheseweg ist für das Decatrienon daher ebenfalls denkbar.

In Pilzen wurden bisher allerdings hauptsächlich iterative Typ I und III Polyketid-Synthasen beschrieben, welche normalerweise nur Malonyl-Coenzym A-Verlängerungseinheiten nutzen. Au-

ßerdem wäre auch mit anderen Verlängerungseinheiten die Stellung der Ketogruppe zur Doppelbindung an C 5 im Decatrienon nicht erklärbar, da durch Acetyl-Coenzym A als Starter die Doppelbindung in genannter Position nicht möglich wäre. Dementsprechend scheint eine ungewöhnliche Startereinheit wahrscheinlich, wie sie zum Beispiel He *et al.* (2014) für L-Lactyl-S-ACP als Starter beschrieben haben. Für eine Polyketid-Synthese des Decatrienons kann formal beispielsweise Pyruvat als Startereinheit postuliert werden (siehe Abbildung 51).

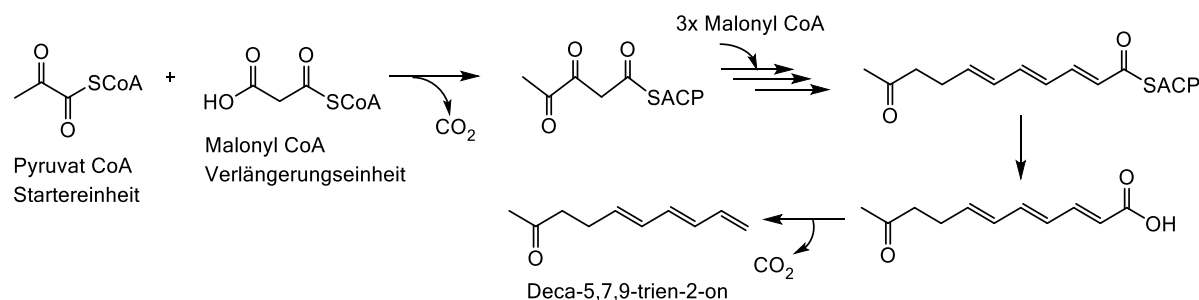


Abbildung 51: Postulierter Geneseweg des Decatrienons.

3.3.2.1 Supplementierung mit Einheiten des Polyketidsynthesewegs

Um die Decatrienon-Bildung über diesen postulierten Weg zu bestätigen, wurde nach sechs Tagen Vorinkubation, als ein erster leichter Ananas-Geruch wahrnehmbar war, Malonat beziehungsweise Pyruvat (8 mM) zur Pbe Hauptkultur zugegeben. Da, wie der Ananas-Geruch zeigt, die Decatrienon-Produktion zu diesem Zeitpunkt bereits im Gange war, wurde vor Supplementierung und nach 8, 16, 24 und 48 h Probe gezogen (siehe 2.7.4.1).

Die Supplementierung von Malonat beziehungsweise Pyruvat ergab jedoch keine signifikante Veränderung des Aromaprofils. Auch die Zugabe von Acetat (15 mM, siehe 2.7.4.2) als Ausgangssubstanz für diverse Biomoleküle wie Pyruvat und andere resultierte in keinem Anstieg der Decatrienon-Konzentration. Vermutlich ist die Supplementierung dieser möglichen Vorstufen zu unspezifisch, um einen Effekt festzustellen. Um im Weiteren Acetat als Baustein für die Biosynthese von Decatrienon zu belegen sind Isotopenmarkierungsversuche notwendig. Dazu müsste ^{13}C -markiertes Acetat eingesetzt und dieses im Decatrienon nachgewiesen werden.

3.3.2.2 Kultivierung mit Acetat und Induktion durch Hydroperoxide

In Kapitel 3.3.1.3 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Decatrienonproduktion mittels Hydro-peroxiden aus dem bereits teilweise oxidierten Linolensäure-Gemisch angeregt wurde. Dies hatte sich zunächst nicht bestätigt. Es wurde vermutet, dass zwar eine Induktion von Genen erfolgte, aber Vorstufen zur Bildung von Decatrienon fehlten. Daher wurde überprüft, ob die Kultivierung mit dem partiell oxidierten Linolensäure-Gemisch (100 μ M) als Induktion und einer gleichzeitigen Supplementierung von Acetat (15 mM) als möglichen Präkursor nach drei Tagen Vorinkubation zu einer Erhöhung der Decatrienon-Konzentration führte (siehe 2.7.4.3). Hierbei wurde jedoch ein gegenläufiger Effekt beobachtet. Das Wachstum der Kultur stagnierte bei Zugabe von Acetat. Die sensorische Überprüfung wies auch an Kultivierungstag 7 nur einen sehr schwachen Ananas-Geruch auf. Die GC-Analyse zeigte zwar ein verändertes Aromaspektrum, allerdings wurde weniger Decatrienon, wahrscheinlich aufgrund der geringeren Biomasse, gebildet.

Eine Induktion mit dem teilweise oxidierten Linolensäure-Gemisch sowie die Supplementierung mit Acetat führten nicht zu einer signifikanten Steigerung der Decatrienon-Konzentration. Daher wurde im weiteren Verlauf der Fokus auf die Identifizierung möglicher Präkursoren gelegt.

3.3.3 Identifizierung von Decatrienon-Derivaten

Im Rahmen der bisherigen Untersuchungen wurden bei der gaschromatografischen Analyse wiederholt nicht identifizierbare Substanzen detektiert. Diese wiesen ein dem Decatrienon nahezu identisches Massenspektrum auf, eluierten aber von einer polaren Säule etwa 10 min später (siehe Abbildung 52). Dabei handelte es sich um eine Gruppe von vier Peaks, welche innerhalb von einer Minute eluierten. Da diese nahezu identische Massenspektren besaßen und in einem sehr engen Zeitraum eluierten, lag die Vermutung nahe, dass es sich um *E/Z*-Isomere handelte. Um diese Substanzgruppe als mögliche Präkursoren des Decatrienons zu identifizieren, wurden weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Strukturen unternommen.

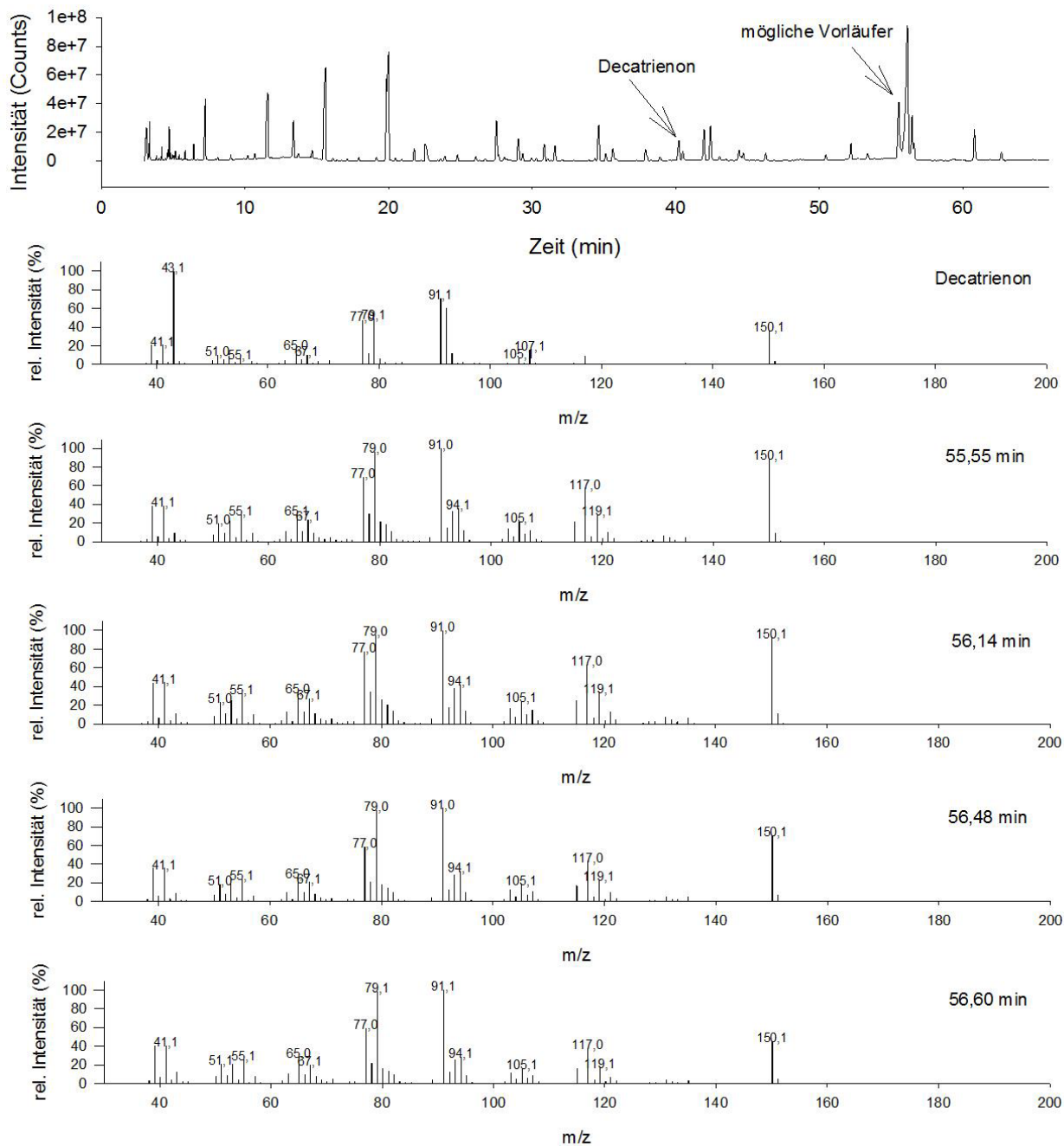


Abbildung 52: Oben: GC-MS-Chromatogramm (VF-WAXms) des P/E-Myzel-Extrakts von Pbe in SNL; 40 °C (3 min)// 3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); *on column*, 0,5 µL; Helium, 1,5 mL min⁻¹. Darunter: Massenspektrum von Decatrienon und von vier bei 55 - 56 min eluierenden unbekannt Substanzen.

3.3.3.1 Hydrolyse der potenziellen Präkursoren

Das Lyophilisat des Pbe-Myzels wies nach der Gefrierdrying und dem damit verbundenen niedrigen Druck immer noch einen starken Ananas-Geruch auf. Deshalb sollte das Myzel weiter untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den potenziellen Präkursoren um hydrolysierbare Substanzen handelte, wurde eine saure und basische Hydrolyse durchgeführt. Die Probe wurden jeweils vorher und nachher mittels GC vermessen (siehe 2.7.5.1). Dabei bewirkte die saure Hydrolyse kein Ansteigen der Decatrienon-Konzentration, aber die Peaks der potenziellen Präkursoren im Chromatogramm verschwanden (siehe Abbildung 53). Eine basische Hydrolyse der untersuchten Verbindungen konnte nicht nachgewiesen werden. Es handelte sich demnach um sauer hydrolysierbare Substanzen, welche allerdings nicht das Decatrienon freisetzen.

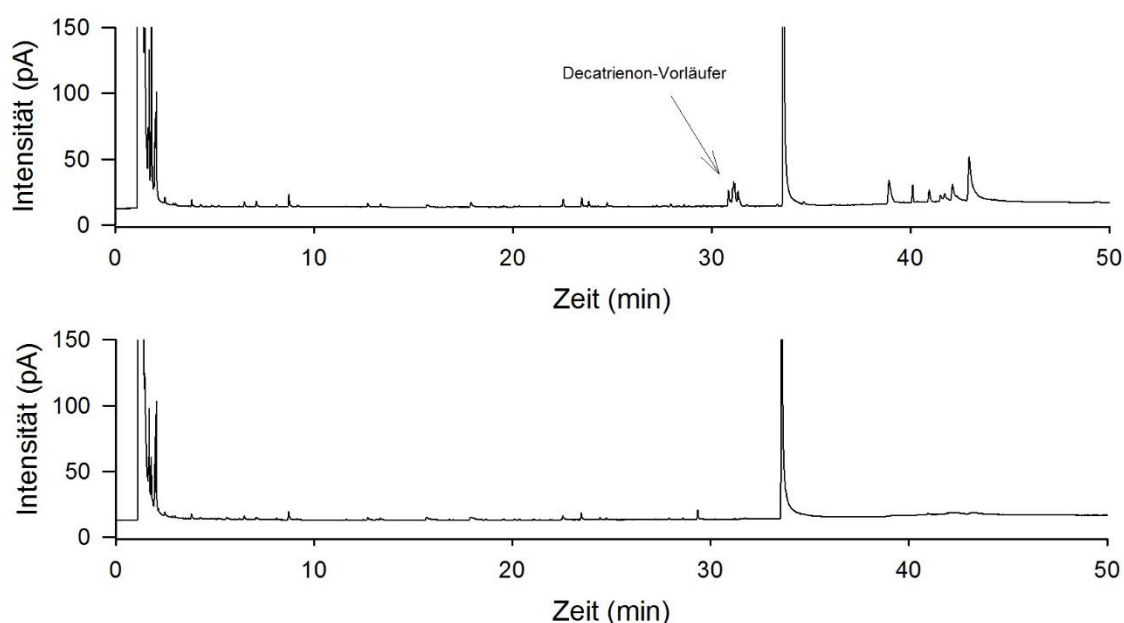


Abbildung 53: GC-FID Chromatogramme (DB-WAX) vor und nach der sauren Hydrolyse des Pbe-Myzels. 40 °C (3 min)//3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890.

3.3.3.2 Umkristallisieren des P/E-Extraktes von Pbe-Myzel

Zur weiteren Untersuchung des Lyophilisates wurde dieses mit P/E mittels Soxhlet extrahiert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Es entstand eine trübe Lösung, aus der nach längerem Stehen ein gelber Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde mehrmals umkristallisiert und die Kristalle getrocknet (siehe 2.7.5.1).

Ein Teil des Kristallisats wurde in P/E gelöst und mittels GC-FID vermessen. Das Chromatogramm wies zahlreiche tailende Peaks auf, welche wegen ihrer typischen Peakform vermutlich

auf Säuren zurückzuführen waren. Deshalb wurde die Probe getrocknet, mit BSTFA derivatisiert und mittels GC-MS analysiert (siehe Abbildung 54). Vier Peaks zwischen 8,7 und 9,3 min wurden als möglichen Derivate in Betracht gezogen. Diese eluierten 2 min später als ohne Silylierung und wiesen charakteristische Fragmentationen auf (m/z 91, m/z 117). Die potenziellen Derivate sind demnach silylierbar, wobei $[M-15]^+$ (hier m/z 207) charakteristisch für die BSTFA Silylierung ist.

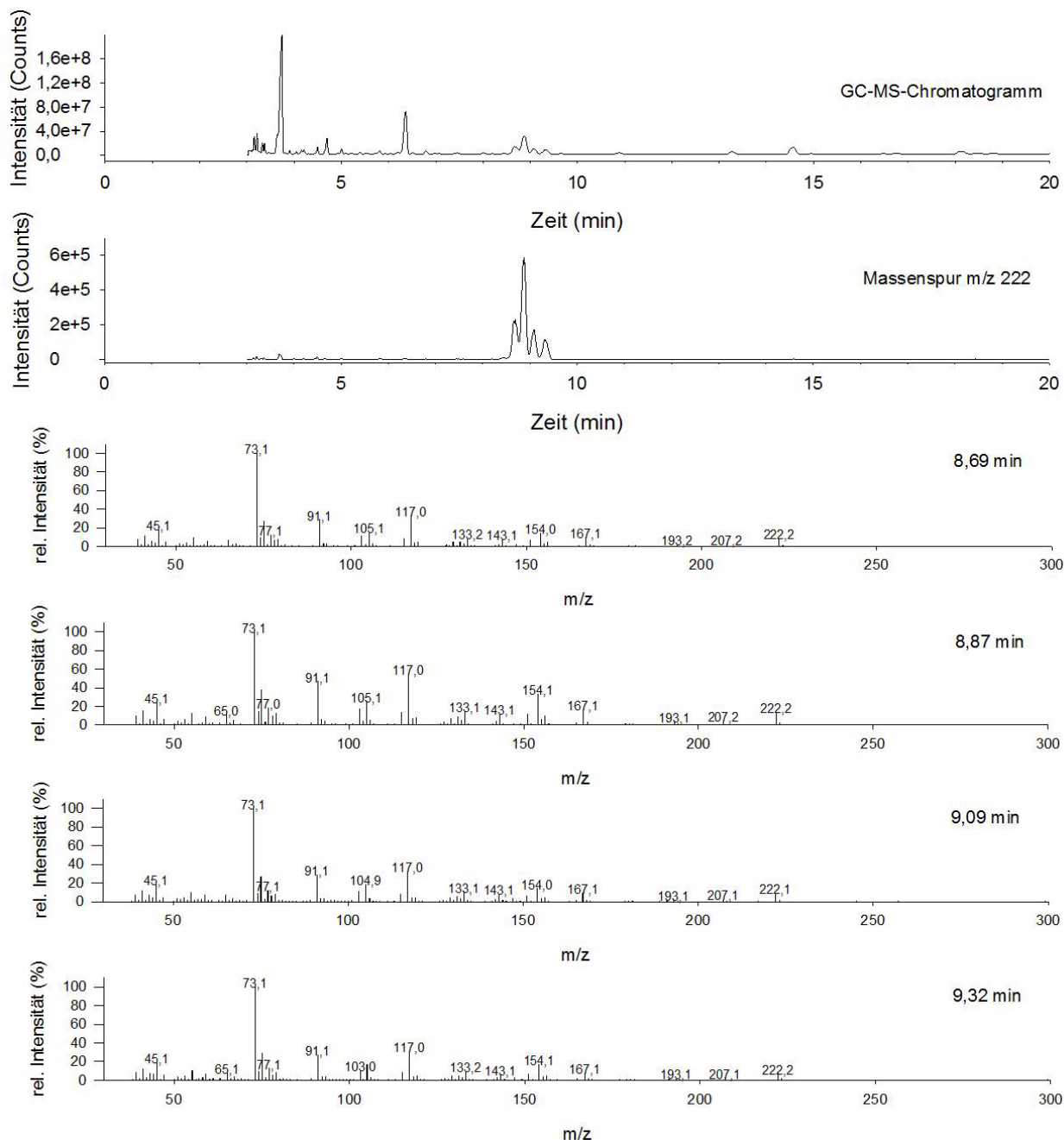


Abbildung 54: GC-MS-Chromatogramm (VF-5ms) des silylierten Pbe-Myzel-Extraktes (in BSTFA + 1 % TMCS für 15 min bei 80 °C) und Massenspur m/z 222. 100 °C (3 min)//25 °C min^{-1} /250 °C// 5 °C min^{-1} /325 °C (10 min); *on column*; Helium 1,5 mL min^{-1} ; Unten: Massenspektren unter den vier Peaks bei m/z 222.

Des Weiteren wurden LC-MS Messungen durchgeführt. Dazu wurde das Kristallisat des Pbe-Myzel-Extrakts in Methanol gelöst. In Wasser und Acetonitril erfolgte keine vollständige Lösung. Die Direktinjektion der methanolischen Lösung ergab nur Massen mit sehr geringen Intensitäten, woraus keine weiteren Schlüsse auf die Molekülmasse der gesuchten möglichen Derivate gezogen werden konnten. Um weitere Aussagen treffen zu können, erfolgte im Anschluss eine Reinigung der Substanzen.

3.3.3.3 Reinigung der Decatrienon-Derivate

Zur Reinigung der potenziellen Decatrienon-Derivate aus dem P/E-Extrakt des Kulturüberstandes wurde eine SPE mit einer unmodifizierten Kieselgelphase durchgeführt (siehe 2.7.5.4). Dabei eluierten die möglichen Derivate des Decatrienons wie das Decatrienon mit P/E (3:1, v/v). Allerdings sind in dieser Fraktion (Fraktion 2) neben dem Decatrienon und den potenziellen Derivaten noch einige weitere Peaks zu erkennen (siehe Abbildung 55, gestrichelt). Eine weitere Reinigung der Decatrienon-Derivate war demnach notwendig.

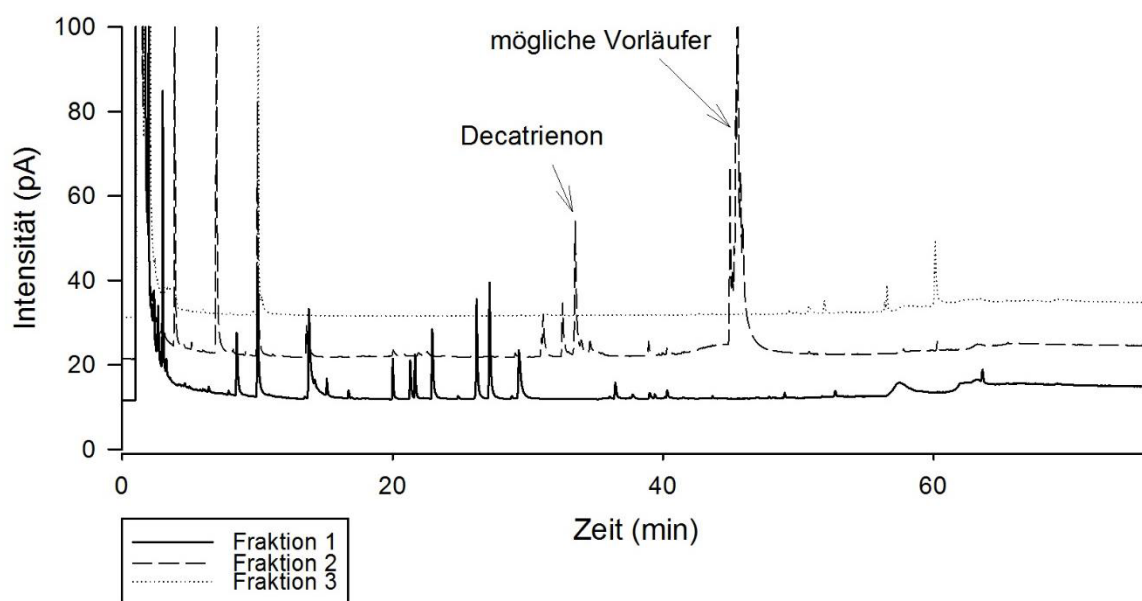


Abbildung 55: GC-FID-Chromatogramme der SPE-Fractionen (CP-WAX 52 CB). Fraktion 1: P/E 9:1, v/v (schwarz). Fraktion 2: P/E 3:1, v/v (schwarz gestrichelt). Fraktion 3: Diethylether (grau gepunktet). 40 °C (3 min)/3 °C min⁻¹/230 °C (10 min); *on column*, 1 µL; Trägergas H₂, Fluss: 2 mL min⁻¹; Agilent GC 7890.

Diese erfolgte mittels präparativer GC (siehe 2.7.5.5). Die postulierten Derivate eluierten erst sehr spät von einer polaren Säule (nach 45 min), sodass zunächst das Temperaturprogramm optimiert wurde. In dem verwendeten GC-System befanden sich Vor- und Hauptsäule im selben Ofen. Deshalb wurde eine Methode gewählt, bei der die Analyten auf der Vorsäule ausreichend früh eluierten, um auf der Hauptsäule noch detektiert zu werden (siehe Abbildung 56). Die entwickelte Methode führte zwar zur Reinigung der Derivate, allerdings waren dabei die Verluste

aufgrund von gerätespezifischen Problemen sehr hoch. Mittels dieser Methode wurde zu wenig Material für eine mögliche Identifizierung erzielt.

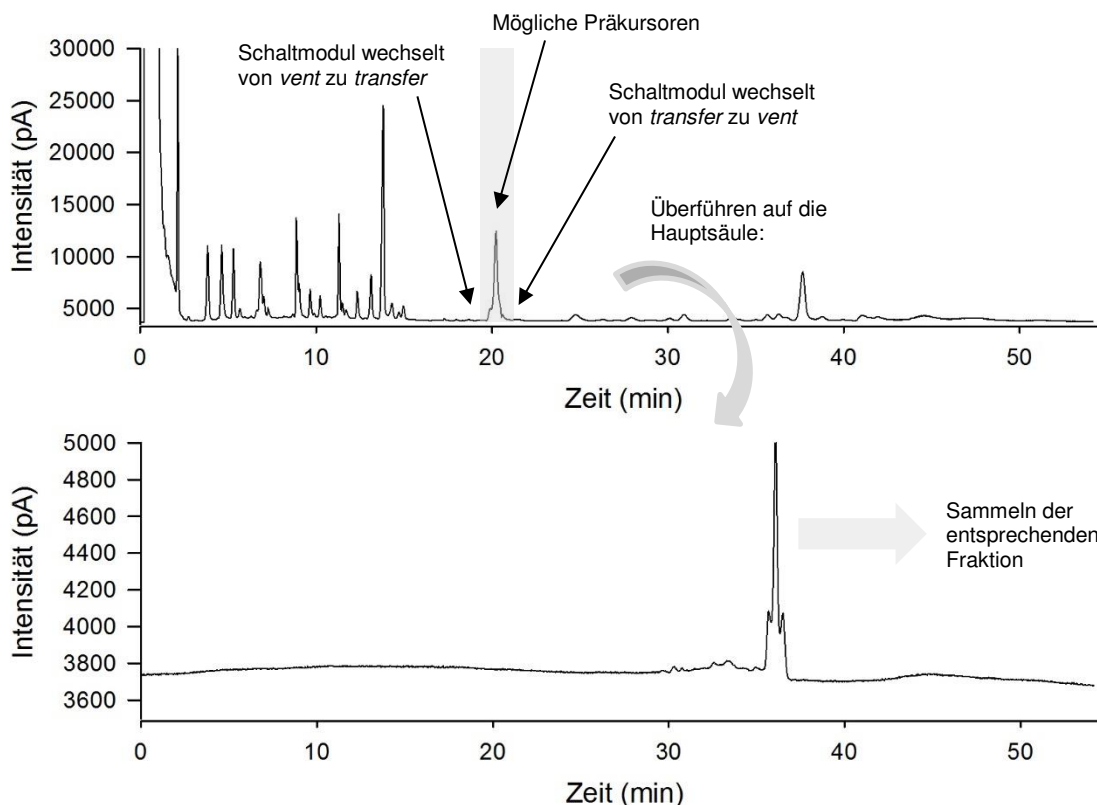


Abbildung 56: FID-Chromatogramme (Optima Wax 5 m x 0,53 m x 2 μ m/Optima Wax 25 m x 0,53 m x 2 μ m) der präparativen GC des P/E-Extraktes von Pbe-Kulturüberstand kultiviert mit EtOAc-Kohl-extrakt. Oben: Vorsäulenchromatogramm. Unten: Hauptsäulenchromatogramm.

Eine gute Alternative für weitere Arbeiten zur effektiveren Reinigung wäre eine präparative Reinigung mittels HPLC, da die möglichen Derivate einen hohen Siedepunkt aufweisen und somit wenig flüchtig sind.

3.3.3.4 Kultivierung mit fraktionellen Weißkohl-Extrakten

Da die Kultivierung von Pbe auf Kohlschnitt die Decatrienon-Konzentration positiv beeinflusste (Schimanski, 2014), sollten weitere Erkenntnisse durch Analyse des Weißkohls ermittelt werden. Dazu wurde der Weißkohl mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität fraktioniert und die Extrakte anschließend zu den Pbe-Kulturen gegeben (siehe 2.7.6.1 und 2.7.6.2). Dadurch sollte ermittelt werden, mit welchem Lösungsmittel die Präkursoren oder Induktoren extrahierbar sind.

Hierfür wurde der Weißkohl zerkleinert und gefriergetrocknet bevor er mittels Soxhlet zunächst mit Hexan, dann mit Dichlormethan und anschließend mit Ethylacetat extrahiert wurde. Zum Schluss erfolgte eine Extraktion mit Methanol/Essigsäure (19:1, v/v), um auch sehr polare, sauer extrahierbare Substanzen zu erfassen. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer

eingengt und das Lösungsmittel vor der Zugabe zum Kulturmedium mit Stickstoff abgeblasen. Es erfolgte eine Kultivierung unter sensorischer und gaschromatografischer Kontrolle.

Der sensorisch eindeutig stärkste Ananas-Geruch wurde in den Kulturen mit Kohlschnitt beziehungsweise EtOAc-Extrakt wahrgenommen. Mit dem sensorischen Eindruck korrelierte auch der relative Gehalt an Decatrienon-Derivaten (siehe Abbildung 57). Diese wurden als Summenparameter berechnet, da keine Basislinientrennung der Peaks erzielt wurde. Dies bekräftigt einen Zusammenhang zwischen den Substanzen. Es blieb allerdings weiter offen, ob es sich tatsächlich um Präkursoren, um weitere Metaboliten oder Induktoren handelt.

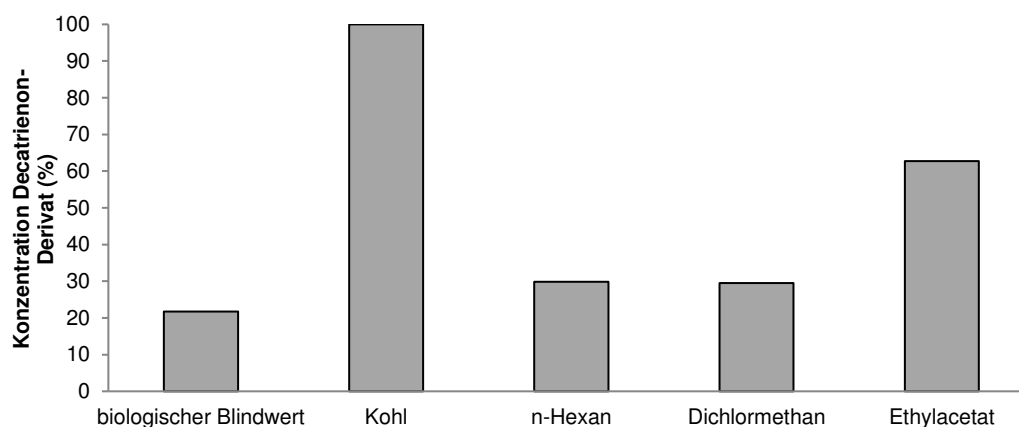


Abbildung 57: Relativer Gehalt an Decatrienon-Derivaten (% des Derivat-Gehaltes bei Kultivierung mit Kohlschnitt) an Tag 13 der Kultivierung nach Extraktion mit P/E und GC-FID-Analyse.

Weiterhin wurde die Kultur mit Kohlschnitt am Tag der Ernte geteilt und mittels Twister (PDMS/EG-Silikon) extrahiert. Die Messung erfolgte mittels TDS-GC-MS auf unpolare Säule. Die Analyse ergab, dass PDMS-Twister verglichen mit EG-Silikon-Twistern besser zur Extraktion des Decatrienons und der potenziellen Derivate geeignet war. Die Anwendung der Alternativmethode Twister im Vergleich zur klassischen Lösungsmittlextraktion war im Hinblick auf die Extraktion des Decatrienons und der Derivate auch erfolgreich (siehe Abbildung 58). Mit diesem Ansatz wurde außerdem nachgewiesen, dass eine Entstehung während des Aufarbeitungsprozesses ausgeschlossen werden kann.

Bei der TDS-GC-MS-Analyse wurden auch größere m/z als 150 (Decatrienon) gefunden. Um weitere Informationen über die möglichen Präkursoren zu erhalten, wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Die Produkt-Ionen-Analyse von m/z 218 und m/z 220 ergab jedoch keine entsprechende Fragmentierung mit m/z 150 (entsprechend Decatrienon/Präkursoren).

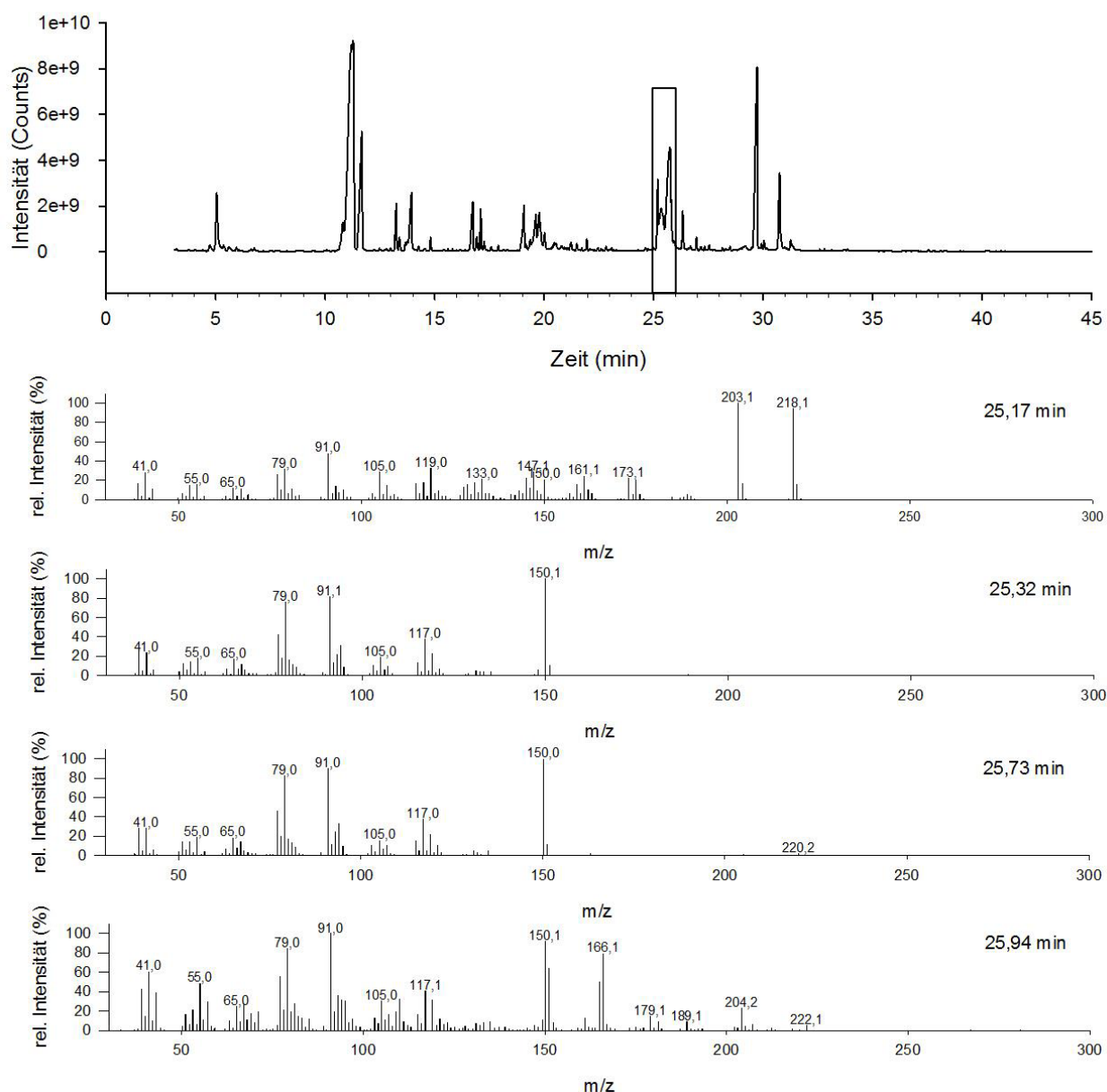


Abbildung 58: GC-MS-Chromatogramm (DB5-ms) der auf Kohlschnitt kultivierten Pbe-Kultur und Massenspektren der möglichen Decatrienon-Präkursoren. 40 °C (3 min)//5 °C min⁻¹/250 °C//25 °C min⁻¹/325 °C (10 min); TDS; Helium 1,5 mL min⁻¹.

3.3.3.5 GC-Analyse der fraktionellen Kohlextrakte

Der EtOAc-Kohlextrakt hatte bei Supplementierung während der Kultivierung von Pbe einen positiven Effekt auf die Bildung des Decatrienons und die Bildung der bereits diskutierten Decatrienon-Derivate. Um Hinweise auf eventuelle Präkursoren zu bekommen wurden der n-Hexan-, DCM- und EtOAc-Kohlextrakt getrocknet und mittels BSTFA + 1 % TMCS silyliert (siehe Abbildung 59).

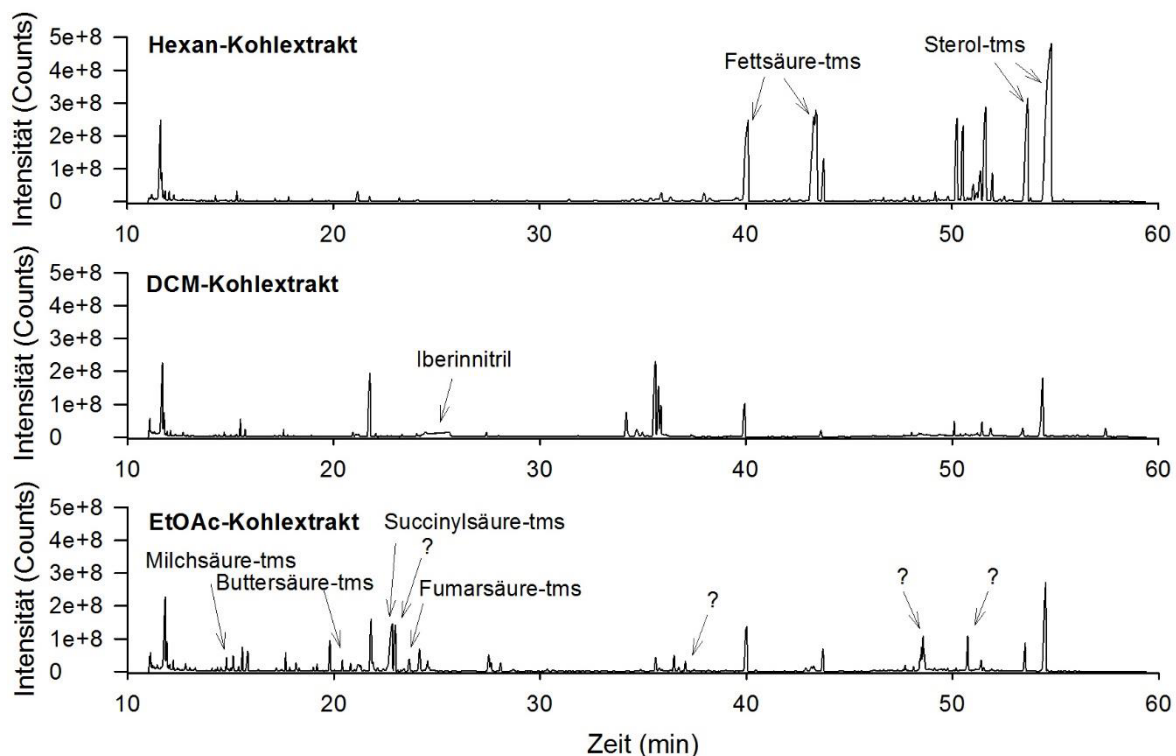


Abbildung 59: GC-MS-Chromatogramme (VF5-ms) der mit BSTFA + 1 % TMCS silylierten Kohlextrakte. 40 °C (3 min)/5 °C min⁻¹/250 °C/25 °C min⁻¹/325 °C (10 min); *on column*; Helium 1,5 mL min⁻¹.

Fettsäuren und Sterole als Induktoren beziehungsweise Präkursoren können nach Analyse der drei Extrakte ausgeschlossen werden. Diese lagen vor allem im Hexan-Extrakt vor, welcher keine Erhöhung der Decatrienon-Konzentration bewirkte. Im DCM-Kohlextrakt wurden das Glucosinolat Iberin (ohne Derivatisierung) und Iberinnitril (siehe Abbildung 59 und Abbildung 60) detektiert. Dies bestätigte die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1.1, in dem Glucosinolate als Induktoren ausgeschlossen wurden, da der DCM-Kohlextrakt keine Erhöhung der Decatrienon-Konzentration verursachte. Im EtOAc-Kohlextrakt wurden hauptsächlich kurzkettige Carbonsäuren identifiziert. Weiterhin gab es eine Reihe von nicht identifizierten Peaks. Hinweise auf mögliche Induktoren oder Präkursoren im EtOAc-Kohlextrakt wurden dabei nicht erhalten.

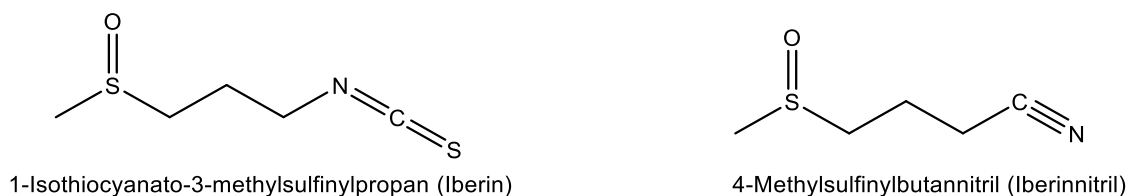


Abbildung 60: Strukturformeln von Iberin und Iberinnitril.

3.3.3.6 Kultivierung mit unterschiedlichen Mengen an EtOAc-Extrakt

Um festzustellen, ob es sich bei den im EtOAc-Extrakt enthaltenen Substanzen um Präkursoren oder Induktoren handelte, wurde Pbe mit verschiedenen Konzentrationen an EtOAc-Kohlextrakt supplementiert (siehe 2.7.6.2). Ein Anstieg des Decatrienons mit steigender Extrakt-Konzentration würde auf einen Präkursor hindeuten.

Der EtOAc-Kohlextrakt wurde auf 10 mL (aus 60 g lyophilisiertem Kohlschnitt) eingeeengt. Davon wurden Kulturen mit 1 mL, 2 mL und 3 mL Extrakt angesetzt. Ebenfalls wurden Kulturen mit 10 g, 20 g und 30 g lyophilisiertem Kohlschnitt kultiviert. Dadurch sollte getestet werden, ob die Decatrienon-Zunahme bei steigendem Kohlschnitt- und Kohlextrakt-Gehalt vergleichbar ist.

Die Konzentration an Decatrienon-Derivaten (angegeben als Summenparameter) stieg bei allen Ansätzen während der Kultivierung kontinuierlich an (siehe Abbildung 61). Genauso erfolgte die sensorische Wahrnehmung des Decatrienons (Ananas-Geruch) ab Tag 7 und steigerte sich in den darauffolgenden Tagen. An Tag 15 roch die Kultur mit der geringsten Konzentration an Kohlschnitt (Kohl1) bereits nicht mehr so stark nach Ananas und der pH-Wert stieg stark an, was auf eine fortgeschrittene Autolyse hindeutet.

Eine Quantifizierung des Decatrienons konnte im Kleinmaßstab (3 mL-Proben) nicht durchgeführt werden. Deshalb wurde für weitere kinetische Studien eine Kultivierung im 5 L-Reaktor und eine Quantifizierung des Decatrienons über die Abluft durchgeführt (siehe folgendes Kapitel 3.3.3.7).

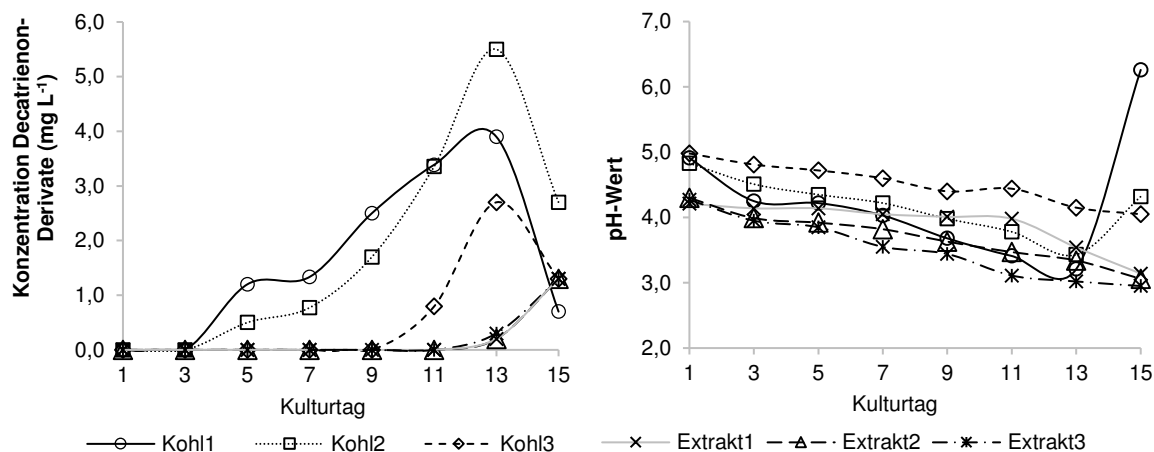


Abbildung 61: Links: Konzentration der Decatrienon-Derivate (mg L^{-1}) in 3 mL Probe im Kulturverlauf der Kultivierung mit *Piptoporus betulinus* in Minimalmedium (Pbe), mit Zusatz von 10 g, 20 g, beziehungsweise 30 g lyophilisiertem Kohlschnitt (Kohl1, Kohl2, Kohl3) und mit Zusatz von 1 mL, 2 mL beziehungsweise 3 mL EtOAc-Kohlextrakt (Extrakt1, Extrakt2, Extrakt3). Rechts: pH-Wert an den entsprechenden Kulturtagen.

Die Kurve der Kultur mit der höchsten Konzentration an Kohlschnitt (Kohl3) ist gegenüber den Kulturen mit weniger Kohlschnitt zeitlich leicht verschoben, sodass die Derivat-Konzentration

erst später ansteigt. Dies ist aufgrund der hohen Menge an Kohlschnitt und der damit verbundenen schlechteren Durchmischung auf ein langsames Wachstum zurückzuführen.

Die Ernte der Kulturen erfolgte an Tag 15, da hier die pH-Werte in allen Kulturen außer der Kohl1 Kultur so niedrig waren, dass eine weitere Kultivierung trotz noch steigender Decatrienon-Derivat-Konzentration in den Kulturen mit Extrakt nicht möglich war.

Die Konzentration an Decatrienon am Tag der Ernte (250 mL Kultur) stieg mit steigender EtOAc-Kohlextrakt-Konzentration (siehe Abbildung 62). Im Vergleich dazu stieg die Konzentration an Decatrienon-Derivaten mit steigender EtOAc-Kohlextrakt-Konzentration zunächst an (Extrakt 1 und Extrakt 2). Bei weiterer Erhöhung (Extrakt 3) nahm diese jedoch wieder ab.

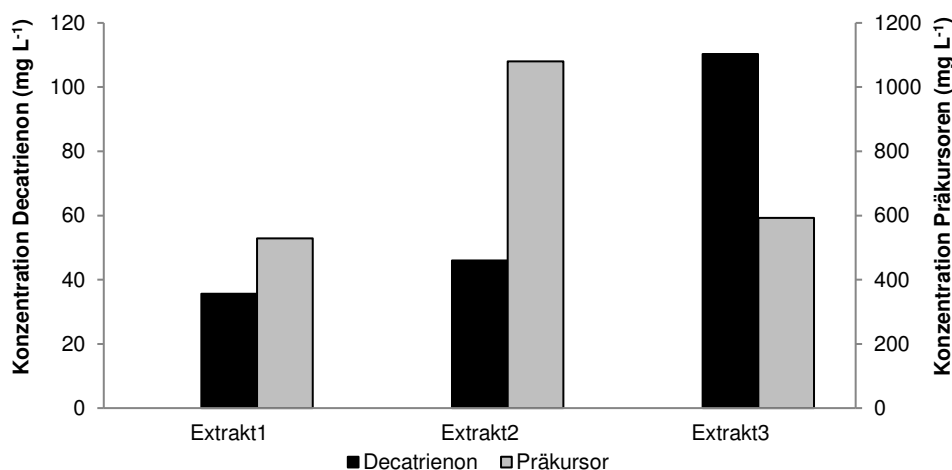


Abbildung 62: Konzentrationen an Decatrienon beziehungsweise Präkursoren (mg L⁻¹) in den Kulturen mit 1 mL, 2 mL beziehungsweise 3 mL Ethylacetat-Kohlextrakt (Extrakt 1, 2, 3).

Bei den Derivaten handelt es sich somit vermutlich um intermediär gebildete Präkursoren, welche dann zum Decatrienon abgebaut werden. Dies könnte in weiterführenden Studien durch eine Reinigung der Präkursoren und gezielte Dotierung des Mediums mit den Präkursoren bewiesen werden.

3.3.3.7 Kinetik der Decatrienon-Bildung in Abhängigkeit der möglichen Präkursoren

Um die Decatrienon-Bildung in Abhängigkeit der Präkursoren zu untersuchen, wurde Pbe auf Kohlschnitt im 5-L-Fermenter für zehn Tage kultiviert (siehe 2.7.6). Dabei wurde täglich zur Bestimmung der Präkursor-Konzentration 3 mL des Kulturüberstands mittels PDMS-Twister extrahiert und die Decatrienon-Konzentration mittels Tenax-Röhrchen aus der Abluft bestimmt. Dabei nahm mit dem Ansteigen der Präkursor-Konzentration an Tag 6 einen Tag später auch die Decatrienon-Konzentration zu (siehe Abbildung 63). Nach Tag 10 war eine weitere Kultivierung aufgrund des gestiegenen Drucks im Fermenter nicht möglich.

Sowohl die Präkursoren als auch das Decatrienon reicherten sich mit der Zeit an, bis sie eine Konzentration von 170 mg L⁻¹ für die Präkursoren beziehungsweise 65 mg L⁻¹ für Decatrienon

erreicht hatten. Auffällig ist, dass ein Konzentrationsanstieg erst an Tag sechs beziehungsweise sieben eintritt. Dies könnte dadurch begründet werden, dass zunächst durch Substanzen aus dem Kohlschnitt die Expression bestimmter Gene induziert wird, was eine Synthese der für die Decatrienonbildung erforderlichen Enzyme bedingt. Diese sorgen anschließend für eine erhöhte Produktion des Decatrienons. Dies würde die relativ lange Verzögerungszeit von 6 Tagen erklären, bis es zur Decatrienon-Produktion kommt. Als weitere Möglichkeit muss in Betracht gezogen werden, dass die Konzentration an Präkursoren durch verschiedene abbauende Stoffwechselwege verringert wird.

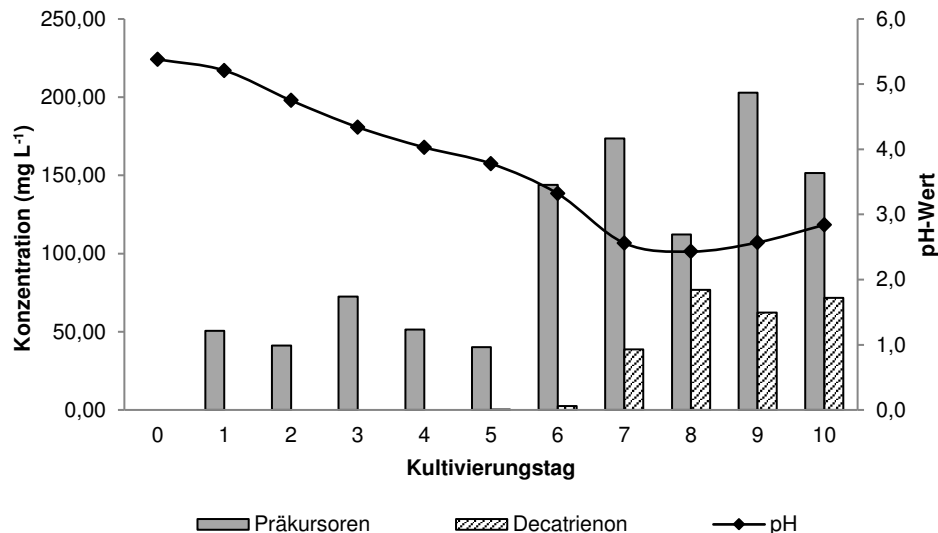


Abbildung 63: Konzentrationen an Präkursoren und Decatrienon (mg L^{-1}) sowie pH-Werte während des Kulturverlaufs in einem 5-L-Fermenter. Die Berechnung der Präkursor-Konzentration erfolgte dabei aus der PDMS-Twister-Extraktion von 3 mL Kulturüberstand, während die Decatrienonkonzentration mittels Tenax-Röhrchen aus der Abluft ($30 \text{ L}, 2 \text{ L min}^{-1}$) bestimmt wurde.

3.3.4 Fazit zur Decatrienon-Bildung

Die Kultivierung von Pbe auf Weißkohlschnitt bewirkte die Entwicklung eines starken Ananasgeruchs. Dies zeigt erneut, wie wichtig die Wahl des Nährmediums und der damit zur Verfügung gestellten Präkursoren, Induktoren oder Elicitoren zur Beeinflussung des Aromaprofils von Basidiomyceten ist. Zusammenfassend wurden vier Isomere als Präkursoren postuliert, welche dem Decatrienon sehr ähnliche Massenspektren aufwiesen. Sie sind silylierbar und sauer hydrolysierbar. Die Präkursoren sind nicht im Weißkohl selbst enthalten, sondern entstehen erst im Laufe der Kultivierung. Eine Anreicherung von Decatrienon sowie dessen Präkursoren durch Supplementierung von Glucosinolaten oder durch Lichtinduktion wurde ausgeschlossen. Durch Zugabe von Ethylacetat-Kohlextrakt zu Pbe-Kulturen wurde dagegen sowohl die Präkursorkonzentration als auch die Decatrienonkonzentration gesteigert. Es wurde vermutet, dass Substanzen aus dem Weißkohl eine Induktion von Schlüsselenzymen für die Decatrienonsynthese bewirken.

Zur Bildung von Decatrienon wurden im Wesentlichen zwei Hypothesen überprüft: Die Entstehung über den Fettsäureabbau und den Polyketid-Stoffwechsel. Für eine Entstehung aus dem Fettsäureabbau wurden keine Hinweise gefunden. Weiterhin konnte eine Bildung über den Polyketid-Stoffwechsel nicht bewiesen werden, da mögliche Präkursoren wie Acetat, Pyruvat oder Malonat in zahlreiche Stoffwechselwege einfließen. Zur endgültigen Klärung wäre eine Kultivierung mit ^{13}C -markierte Präkursoren, wie sie für andere Polyketid-Synthesen bereits beschrieben ist, sinnvoll (Schwenk *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weitere Studien. Zur vollständigen Identifizierung der Präkursoren sollte in Folgearbeiten eine präparative Reinigung mittels chromatografischer Methoden durchgeführt werden, um die Präkursoren dann mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zu identifizieren. Die Kenntnis der Strukturen der Präkursoren ist dann der Schlüssel für die Aufklärung des Biogenesewegs. Dies ist die Basis für eine Applikation in der Aromastoffindustrie. Ananas ist weltweit eine der beliebtesten tropischen Früchte. Aufgrund ihres angenehmen süßlichen Aromas wird Ananas als frische Frucht, Saft, Dosenfrucht und als Zutat in exotischen Lebensmittelzubereitungen konsumiert (Marostica und Pastore, 2007). In den letzten Jahrzehnten wurden mehr als 280 Aromastoffe als verantwortlich für den typischen Ananas-Geruch identifiziert, wobei hauptsächlich Ethyl- und Methylester zum Aromaeindruck beitragen. Tokitomo *et al.* (2005) ermittelten eine Modellmischung für den Geruch einer frischen Ananas durch Analyse der flüchtigen Substanzen und sensorische Experimente. Eine Mischung aus Ethyl-2-methylpropanoat, Methyl-2-methylbutanoat, Ethyl-2-methylbutanoat, 1-(*E*, *Z*)-3,5-Undecatrien, β -Damascenon und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon (HDF) simulierte dabei erfolgreich den Ananas-Geruch. Außerdem wurden Ethyl-2-methylbutanoat und HDF als Schlüsselaromastoffe für den Geruch von frischer Ananas bestimmt. Decatrienon alleine weist dagegen bereits in geringen Konzentrationen einen starken Ananas-Geruch auf. Die Kenntnis des Biogeneseweges wäre folglich essentiell für eine biotechnologische Herstellung von Decatrienon als ananasartigen Aromastoff.

4 Ausblick

Die biotechnologische Produktion von natürlichen Aromastoffen spielt auf Grund der Marktsituation, Verbrauchererwartung und wirtschaftlichen sowie toxikologischen Aspekten eine immer wichtigere Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche neue Möglichkeiten zur Produktion von Aromastoffen mittels Basidiomyceten dargelegt. Bis die identifizierten Aromastoffe beziehungsweise biotechnologischen Prozesse Anwendung in der Aromastoffindustrie finden können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Wolfiporia cocos* in der Lage ist, Furaneol® zu bilden. Da Furaneol® ein in der Lebensmittelindustrie viel eingesetzter Aromastoff ist (Schwab, 2013), ist dessen kostengünstige Synthese mittels biotechnologischer Verfahren von besonderem Interesse. In fortführenden Studien sollten Präkursoren von Furaneol® identifiziert werden, um im Anschluss geeignete Nebenströme zur Produktion von industriell relevanten Mengen an Furaneol® zu finden. Um Präkursoren zu identifizieren, könnten zunächst Bestandteile der Standardnährlösung in höheren Konzentrationen supplementiert werden. Bei einem Anstieg der Furaneol®-Konzentration sollte die verursachende Komponente weiter untersucht werden. Anschließend könnten Nebenströme, welche hohe Präkursor-Gehalte aufweisen, zur Kultivierung eingesetzt werden. Um die Rentabilität des Prozesses zu verbessern, sollten schließlich Untersuchungen zur *in-situ*-Produktabtrennung durchgeführt werden.

Außerdem wurde durch Einsatz von Rapsöl und Rapspresskuchen eine Veränderung des Aromaprofils von *Wolfiporia cocos* nachgewiesen. Die Verwendung von zusätzlichen Substraten neben dem Rapsöl führte zu weiteren Unterschieden im Aromaprofil. Die Substratkombinationen sollten demzufolge weiter variiert und optimiert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei Supplementierung von zwei Prozent Rapsöl dieses vollständig verbraucht wurde. Folglich könnte die eingesetzte Menge an Rapsöl weiter erhöht werden und zusätzlich beispielsweise durch ein stärkeres Schütteln eine bessere Emulgierung erzielt werden. Hiermit wären Nährstoffe aus dem Öl besser zugänglich, sodass eine stärkere Beeinflussung des Aromaprofils zu erwarten ist. Aromastoffe, die mit Nebenströmen der Lebensmittelindustrie als Substrate biotechnologisch hergestellt wurden, dürfen nach der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 als „natürlich“ gekennzeichnet werden. Dementsprechend dienen die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse als Grundlage für weitere Forschungen zur Etablierung neuer Herstellungsprozesse.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei Enzyme aus dem Lyophilisat des Myzels von *Pleurotus sapidus* als verantwortlich für dessen alkenspaltende Aktivität bestimmt. Eine Umsetzung von *trans*-Anethol zu *para*-Anisaldehyd oder von Piperin zu Piperonal mit der rekombinanten Lipoxygenase aus *Pleurotus sapidus* funktionierte nur in Anwesenheit von Linolsäure. Da sich die alkenspaltende Aktivität der Lipoxygenase als Co-Oxidation herausstellte, ist diese ungeeignet für die industrielle Anwendung. Als weiteres Enzym mit alkenspaltender Aktivität wurde eine

Peroxidase bestimmt. Zur Bestätigung dieser ist eine vollständige Aufklärung der Aminosäuresequenz nötig. Dafür könnten die in dieser Arbeit ermittelten Partialsequenzen zur Bestimmung der gesamten Gensequenz genutzt werden. Im weiteren Verlauf sollte außerdem getestet werden, ob es sich ebenfalls um eine Seitenaktivität handelt oder ob das Enzym für industrielle Applikationen einsetzbar ist. Ein effektiver Prozess zur Alkenspaltung würde neue Optionen zur Bildung von Aromastoffen eröffnen. Wie in Kapitel 3.2 erläutert, ist zum Beispiel die Nachfrage nach natürlichem Piperonal besonders groß. Die oxidative Spaltung von natürlichen Ausgangsstoffen wie beispielsweise dem Pfefferinhaltsstoff Piperin mittels basidiomycetischer Enzyme kann zur Produktion von Piperonal auf natürlichem Wege eingesetzt werden. Zusätzlich könnte das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Screening nach Basidiomyceten mit alkenspalten- den Enzymaktivitäten ausgedehnt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden mögliche Präkursoren für den nach Ananas riechenden Aromastoff (*5 E,7 E/Z*)-Deca-5,7,9-trien-2-on (Decatrienon) detektiert. Als nächste Schritte sollten die möglichen Präkursoren angereichert und gereinigt werden. Die Anreicherung kann dabei im Fermenter mit Kultivierung auf Weißkohl erreicht werden. Eine Reinigung der Präkursoren kann dann über eine Festphasenextraktion und anschließender präparativer Flüssigchromatografie erfolgen. Im Anschluss können die Kulturen von *Piptoporus betulinus* direkt mit diesen Substanzen supplementiert werden, um zu bestätigen, dass es sich um Präkursoren handelt. Ferner können die gereinigten und angereicherten Präkursoren mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) identifiziert werden und so einen Hinweis auf den Biogeneseweg des Decatrienons geben. Mit durch Ethylacetat extrahiertem Weißkohl wurde eine Erhöhung der Decatrienonbildung nachgewiesen. In fortführenden Arbeiten könnte der Extrakt weiter analysiert werden. Durch weitere Fraktionierung und anschließende Supplementierung der *Piptoporus betulinus*-Kulturen können zusätzliche Informationen über mögliche Präkursoren erzielt werden. Die Bildung von Decatrienon aus dem Polyketid-Stoffwechsel, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die eingesetzten Präkursoren Malonat, Pyruvat und Acetat sind an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt, sodass ihr Anteil speziell an der Decatrienonbildung nicht bestimmbar war. Es könnten ¹³C-markierte Präkursoren eingesetzt werden, um eine Inkorporation in das Decatrienon zu beweisen.

Darüber hinaus sollte die Konfiguration des Decatrienons und dessen Isomers mittels NMR bestätigt werden. Der Alkohol des Decatrienons sollte ebenfalls weiter analysiert werden. Zur Überprüfung der Struktur sollte das Decatrienon außerdem chemisch synthetisiert werden, um als Standardsubstanz für weitere Analysen zur Verfügung zu stehen. Da es sich bei Decatrienon um einen neuen Aromastoff handelt, muss dieser zuerst das Zulassungsverfahren der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit durchlaufen. Deswegen ist für eine Anwendung in der Lebensmittelindustrie neben der Aufklärung der Stereoisomerie ein wirtschaftlich rentabler Prozess Voraussetzung. Applikationsmöglichkeiten müssen daher nach den zuvor erläuterten Untersuchungen neu bewertet werden.

5 Anhang

5.1 Ergänzende Daten zur Umsetzung von Piperin mittels LOX_{Psa1}

Das Produktverhältnis von Piperonal zu (2 E)-3-(1,3-Benzodioxol-5yl)-2-Propenal (3,4-Methylenedioxyzimtaldehyd) war bei Umsetzung mit der rekombinante LOX_{Psa1} aus *E. coli* auch bei verschiedenen Substrat- und Linolsäurekonzentrationen kleiner eins (siehe Abbildung 64). Bei verschiedenen Reaktionstemperaturen wurde ebenfalls die Umsetzung von Piperonal zu 3,4-Methylenedioxyzimtaldehyd bevorzugt (siehe Abbildung 65).

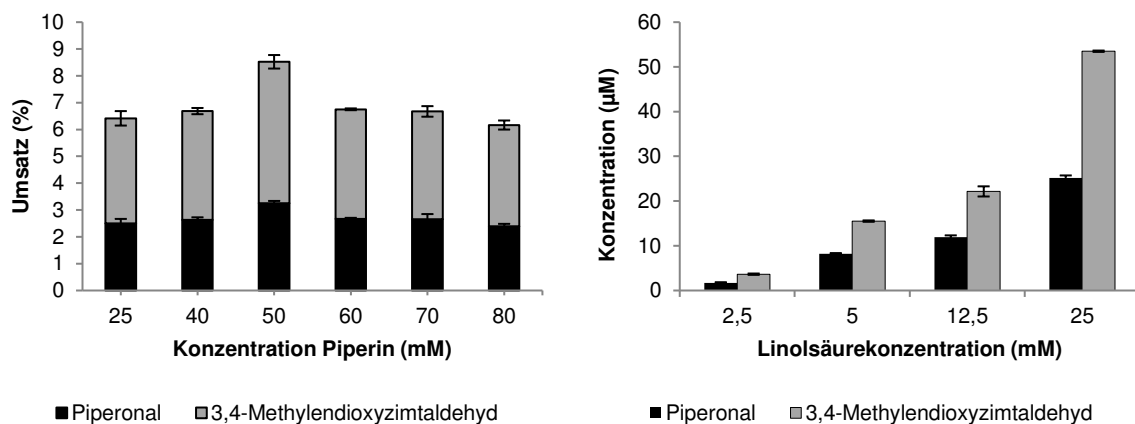


Abbildung 64: Umsatz (%) bei verschiedenen Piperinkonzentrationen (links) und Konzentrationen an Piperonal und 3,4-Methylenedioxyzimtaldehyd (µM) bei verschiedenen Linolsäurekonzentrationen (rechts).

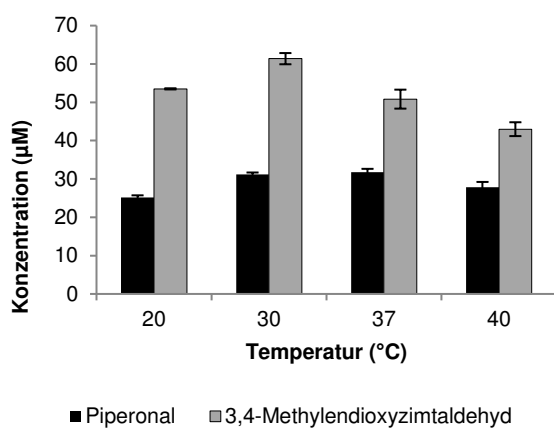


Abbildung 65: Konzentrationen an Piperonal und 3,4-Methylenedioxyzimtaldehyd (µM) bei verschiedenen Temperaturen.

5.2 Ergänzende Daten zur Proteinsequenzierung

5.2.1 Proteinsequenzierung nach der pIEF

Bei der Proteinsequenzierung der 67 kDa-Bande der SDS-PAGE der Fraktionen 2 - 4 der isoelektrischen Fokussierung wurden Homologien zu einem hypothetischen Protein (gi|646307541) aus *Pleurotus ostreatus* detektiert (siehe 3.2.3.2). In Abbildung 66 sind nähere Informationen zu entsprechendem Protein aufgeführt.

Protein View: gi|646307541

hypothetical protein PLEOSDRAFT_175905 [Pleurotus ostreatus PC15]

Database: NCBIInr
Score: 386
Nominal mass (M_r): 59293
Calculated pI: 5.17
Taxonomy: Pleurotus ostreatus PC15

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|646307541 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: 281474976711487.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 5%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MLSNKAFVGL VSLGATFLN LETSTELKWT DCYTQLQCAR LQVPLNYSDF
51  GGDAASIAIT RRPSPLAGTD GYKGPILIIP GPGGSGVEL VLENGALLSQ
101 VLGNFDFVS FDPFGVGRST PRASFFDTEA QRRFFDTSFG VINATSDGLA
151 RIWARAQITG ALATQHNQNN IFEHFNTEST ARDMLRIVEA HGRRNQAWG
201 FSYGTVLGAT FASLFPDRID RLVLDGVLDV ESYFATRWST SLLDTRKTLQ
251 AFFDSCFEGG FDLCPFYESS PEAISREKLD LTRTIFLRPV PVQTSISYGL
301 VDYERLRITI FQSLYTPYAT FVLAQGLAD LINGNGTVLY QILEQPVFDC
351 ACGSPAPLTS ISDGGTAIMC TDGAEVRDVT DELEPFVQGL LRDSQWGEVW
401 ARIRIGCSAW PKQEKHFPG PFLGNTSHPI LWIGNTADPV TPIAGARKMA
451 KGFPGSVVLV QDSFGHCSIA APSVCTIGFV SAYFMNGTLP DEGUVCPVVQ
501 PIFSGQPADI GGGFGPSLR AVGAQAGEKD GDLVQALARL RQNFKVSIFP

```

Abbildung 66: Hypothetische Protein gi|646307541 (Esterase/Lipase) aus *Pleurotus ostreatus*. Übereinstimmende Peptide unterstrichen.

5.2.2 Proteinsequenzierung nach der IEX

In Kapitel 3.2.5.2 wurden die Ergebnisse der Proteinsequenzierung der Banden der SDS-PAGE-Banden nach der IEX diskutiert. In Tabelle 19 sind weitere Homologien mit niedrigeren *Scores* angegeben.

Tabelle 19: Homologien der Partialsequenzen zu Proteinen aus der *Mascot* Suche.

| Bande Nr. | Molekülmasse (kDa) | Peptidsequenzen | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|-----------|--------------------|-----------------------------|--|-------|----------------------|
| 1 | 74 | TSTPEPTR VLLPAPFILGSTIR | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Asparaginase, gi 646312154 | 150 | 4 |
| 2 | 55 | AIAVEFVR AQHEIVLR | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , GMC Oxidoreduktase, gi 646308841 | 104 | 4 |
| | | ELGGVVDTEL EVVVSAGTIGTPK | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , GMC Oxidoreduktase, gi 646308829 | 57 | 4 |
| | | | Hypothetisches Protein aus <i>Capronia semimersa</i> , Methyltransferase gi 759293956 | 50 | 0 |
| 3 | 30 | ADYTLTFCP GPFASGFPVGCR | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Thaumatin-like Protein, gi 646311590 | 236 | 8 |
| | | | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Glycosidhydrolase, gi 646311592 | 189 | 5 |
| | | | Hypothetisches Protein aus <i>Cyphellophora europaea</i> , gi 671379836 | 49 | 6 |
| | | | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Asparaginase, gi 646312154 | 35 | 2 |

| Bande Nr. | Molekülmasse (kDa) | Peptidsequenzen | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|------------------|--------------------|-----------------|---|-------|----------------------|
| 4 | 23 | LFAVNVR | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Acetoin Reduktase, gi 646302281 | 204 | 19 |
| | | GLTQSAAQEY GK | | | |
| | | GIPEAACYSSTK | Hypothetisches Protein aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Oxidoreduktase, gi 646302280 | 75 | 13 |
| | | GVAIITGAAEGIGR | | | |
| LVSDGFDVAINDIPAK | | | | | |

Bei der Proteinsequenzierung der 55 kDa-Bande der SDS-PAGE der Fraktion 1 der IEX wurden Homologien zu einem hypothetischen Protein (gi|646308841) aus *Pleurotus ostreatus* detektiert (siehe 3.2.5.2). In Abbildung 67 sind nähere Informationen zu entsprechendem Protein aufgeführt.

Protein View: gi|646308841

hypothetical protein PLEODRAFT_154703 [Pleurotus ostreatus PC15]

Database: NCBIInr
 Score: 104
 Nominal mass (M_r): 69939
 Calculated pI: 7.86
 Taxonomy: [Pleurotus ostreatus PC15](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|646308841 against nr](#).

Search parameters

MS data file: 281474976711576.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Variable modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 4%

Matched peptides shown in ***bold red***.

```

  1 MLHQSYPLYT SHLAWLPLTS ASAFVYWRGI DLPLIFPSRL SRHNLRAARR
  51 MIHDTNRGVQ GPDWRGLRSS IATSSYDYV IIGGGTAGLA VANRLSEDPL
 101 VSIAVIEAGP NAEHLREVF I PGLFGSGQAL TILNWAYKTT PQPMLNRSRSL
 151 VVNAGRVLGG STTINAMLFP RAGRAQYDAW AELNRDASWG WDALLPFFRR
 201 SERVTPPDAF QVNAGSVIYV PEVHGSASDG RVKVGYPNIF FEQSTLWRQA
 251 AVAVGFPPGER DLASGDPHGV GVSPESIDVT NYTRCSAACA YYTPFASRPN
 301 FNVIINAIVT RIVWDTSPSG SHSNEGQRNL RAIARFVRA GSNRTESVTV
 351 RREVVSAGT IGTPRVFELS GIGNSSIIRA AGVNPVLELP SVGENLAGLL
 401 TSFPGSLGLP GPLNIFNDR ILPTLLQEA ANLSHFALF ANGNALLEKG
 451 IRAQHEIVLR SYADDVALPL ENSLFPGYAG AAADRPQRNY TIIMNVLYAP
 501 LSRGRTHITS SDIRTAPWVD PAYYMHPLDA ATHAAGINLA RKTLLTPPMD
 551 SIYLGEFEPG KDVTSQDIS SVLRAAIVSS DNHVIGTMAM MPKELGGVD
 601 TELRVYIGN VRVADASIIP IPVSAHTSST VYMIGERAAD LIKHSRSPL

```

Abbildung 67: Hypothetisches Protein gi|646308841 (GMC-Oxidoreduktase) aus *Pleurotus ostreatus*. Übereinstimmende Peptide unterstrichen.

Bei der Proteinsequenzierung der 23 kDa-Bande der SDS-PAGE der Fraktion 1 der IEX. wurden ebenfalls Homologien zu einem hypothetischen Protein (gi|646302281) aus *Pleurotus ostreatus* detektiert (siehe 3.2.5.2). In Abbildung 68 sind nähere Informationen zu entsprechendem Protein aufgeführt.

Protein View: gi|646302281

hypothetical protein PLEOSDRAFT_162527 [Pleurotus ostreatus PC15]

Database: NCBIInr
 Score: 204
 Nominal mass (M_r): 26313
 Calculated pI: 5.70
 Taxonomy: [Pleurotus ostreatus PC15](#)

Sequence similarity is available as an [NCBI BLAST search of gi|646302281 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: 281474976711581.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Variable modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 19%

Matched peptides shown in *bold red*.

```

1  MSEPSTKQVA IITGAEIG RGIALRUVSD GFDVAINDIP AKKSALEQLI
51 SEITSSTPRR AIAVPGDVSN DGDVRGIVDK AVQELGGLDV MIANAGIAVN
101 KPAAETTTDE WDRLEAVNVE GTFLCYKHAH DAMIKQGRGG IAEAACYSTT
151 KFAVRGLTQS AAQEYKFGI TVNAYAPGHI ETQFLGRFDG YQATKKGLKP
201 GEWTETLKST VAVGRNGTPT EIASLVSYLV SKDAHFITGQ SIIVDGGGIF
251 D

```

Abbildung 68: Hypothetisches Protein gi|646302281 (Acetoin-Reduktase) aus *Pleurotus ostreatus*. Übereinstimmende Peptide unterstrichen.

5.2.3 Proteinsequenzierung nach der Peroxidasefärbung

Bei der Proteinsequenzierung der 45 kDa-Bande (siehe Tabelle 20) wurden Homologien zu einer DyP-Peroxidase (gi|646301722) aus *Pleurotus ostreatus* detektiert (siehe 3.2.5.2). In Abbildung 69 sind nähere Informationen zu entsprechendem Protein aufgeführt.

Tabelle 20: Ergebnisse der *Mascot* Suche der 45 kDa-Bande nach der Peroxidasefärbung.

| | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|--------------|---|-------|----------------------|
| gi 646301722 | DyP-Peroxidase (<i>Pleurotus ostreatus</i>) | 55 | 6 |
| gi 628848451 | Adenosylhomocysteinase (<i>Coniophora puteana</i>) | 55 | 14 |
| gi 640916464 | Hypothetisches Protein (<i>Colletotrichum sublineola</i>) | 44 | 3 |
| gi 666865359 | Chitinsynthase (<i>Scedosporium apiospermum</i>) | 38 | 0 |
| gi 629720232 | 1-Phosphatidylinositol-3-phosphat-5-kinase (<i>Metarhizium robertsii</i>) | 34 | 0 |
| gi 557643717 | Aspartatpeptidase (<i>Pleurotus ostreatus</i>) | 30 | 6 |
| gi 353240127 | DyP-Peroxidase (<i>Piriformospora indica</i>) | 25 | 2 |

Protein View: gi|646301722

DyP-type peroxidase [Pleurotus ostreatus PC15]

Database: NCBIInr
Score: 55
Nominal mass (M_r): 54850
Calculated pI: 6.25
Taxonomy: Pleurotus ostreatus PC15

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|1925718801](#) from [synthetic construct](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|646301722 against nr](#).

Search parameters

MS data file: 281474976711625.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 6%

Matched peptides shown in *bold red*.

```

1  MTPAPPDL NNIQGDILGG LFKRTETYFF FDVTNVDQFK ANMAHFIPHI
51  KTSAGIHKR EAIKEHKRQK KPGLVPMAAV NVSFSHLGLQ KLGITDDLSD
101 NAFTTGQRKD AEILGDPGSK NGDAFTPAWE APFLKDHGV IFVAGDCHGS
151 VNKKLDEIKH IFGVGISHAS ISEVTHVRGD VRPGDVHAHE HFGFLDGISN
201 PAVEQFDQNP LPGQDFIRPG FILAKENGDS RAAARPDWAK DGSFLTERYL
251 FQMVFEFDDF LESNPIVLPG LSRKEGSELL GARIVGRWKS GAPIETPLK
301 DDPKLAADAQ RNNKFDGDS LVRGDQTKCF FAAMIRKIYF RNDLEGFPLK
351 ADIDNRRIIR RGIQFGPEVT SQEMHDKKTH HGRGLLFVCY SSSIDDGFHF
401 IQESWANAPN FPNNAVTSAG PIPPLDGVVP GFDAIIGQKV GGGIRQISGT
451 NPNDPTTNIIT LPDQDFVVPR GGEYFFSPSI TALKTKFAIG VASPAHNSQA
501 PISA

```

Abbildung 69: DyP-Peroxidase (gi|646301722) aus *Pleurotus ostreatus*. Übereinstimmende Peptide unterstrichen.

Bei der Proteinsequenzierung der 75 kDa Bande (siehe Tabelle 21) wurden Homologien zu einem hypothetischen Protein (gi|646308829) aus *Pleurotus ostreatus* detektiert (siehe 3.2.5.2). In Abbildung 70 sind nähere Informationen zu entsprechendem Protein aufgeführt.

Tabelle 21: Proteinsequenzierung der 75 kDa-Bande nach Peroxidasefärbung.

| | Homologien zu | Score | Sequenzabdeckung (%) |
|--------------|--|-------|----------------------|
| gi 646308829 | Hypothetisches Protein, GMC-Oxidoreduktase (<i>Pleurotus ostratus</i>) | 360 | 11 |
| gi 646306847 | Hypothetisches Protein (<i>Pleurotus ostratus</i>) | 181 | 16 |
| gi 295016067 | Esterase (<i>Pleurotus sapidus</i>) | 116 | 12 |
| gi 640916464 | Hypothetisches Protein (<i>Colletotrichum sublineola</i>) | 38 | 3 |
| gi 691791742 | Hypothetisches Protein (<i>Trametes cinnabarina</i>) | 36 | 2 |
| gi 407917206 | Aldo-/Ketoreduktase (<i>Macrophomina phaseolina</i>) | 32 | 3 |
| gi 646307541 | Hypothetisches Protein (<i>Pleurotus ostreatus</i>) | 29 | 1 |

Protein View: gi|646308841

hypothetical protein PLEOSDRAFT_154703 [*Pleurotus ostreatus* PC15]

Database: NCBIInr
 Score: 339
 Nominal mass (M_r): 69939
 Calculated pI: 7.86
 Taxonomy: [Pleurotus ostreatus PC15](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|646308841 against nr](#)

Search parameters

MS data file: 281474976711627.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Variable modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#), [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 15%

Matched peptides shown in ***bold red***.

```

1  MLHQSYFYL  SHLAWLPLTS  ASAFVYWRGI  DLPLIPPSRL  SRHNLRAGER
51  MIHDTNRGVQ  GPDWRGLRSS  IATSTYDYV  IIGGGTAGLA  VANRLSEDFL
101  VSIARVIEAGP  NAEHLREVPI  PGLPGSGQAL  TTLNWAYKTT  PQPMLNRRSL
151  VVNAGRVLGG  STTINAMLFP  RAGRACYDAW  AELNRDASWG  WDALLPFFRR
201  SERVTPPDAF  QVNAGSVTYV  FEVHGASDQ  RVKVGYPNIF  FEQSTLNRQA
251  AVAVGPFGER  DLASGDPHGV  GVSPEIDVT  NYTRCSAACA  YITPFASRFN
301  FNVTNATVT  RIWNTFSPG  SHSNEGQNL  RALRVEFVGA  GSNRTESVTV
351  RREVVVSAGT  IGTFRVPELS  GIGNSSIIRA  AGVNPVLELP  SVGENLAGLL
401  TSPPGSLGLP  GFLNIFNDR  ILPTLLQEA  ANLSHFALP  ANGNALLERG

```

Abbildung 70: Hypothetisches Protein (GMC-Oxidoreduktase) aus *Pleurotus ostreatus*. Übereinstimmende Peptide unterstrichen.

6 Literaturverzeichnis

- Aanen, D. K., Eggleton, P., Rouland-Lefèvre, C., Guldborg-Frøslev, T., Rosendahl, S., & Boomsma, J. J. (2002). The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14887-14892.
- Abraham, B. G., & Berger, R. G. (1994). Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *J Agr Food Chem*, 42(10), 2344-2348.
- Adam, W., Corma, A., Martinez, A., & Renz, M. (1996). The mechanism of the double bond cleavage in the titanium zeolite-catalyzed oxidation of *alpha*-methylstyrene by hydrogen peroxide: The *beta*-hydroperoxy alcohol as intermediate. *Chem. Ber.-Recl.*, 129(12), 1453-1455.
- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moller, C. R., Weichold, O., Hoch, U., Haring, D., & Schreier, P. (1999). Biotransformations with peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 63, 73-108.
- Akihisa, T., Nakamura, Y., Tokuda, H., Uchiyama, E., Suzuki, T., Kimura, Y., Uchikura, K., & Nishino, H. (2007). Triterpene Acids from *Poria cocos* and Their Anti-Tumor-Promoting Effects. *Journal of Natural Products*, 70(6), 948-953.
- Albertazzi, E., Cardillo, R., Servi, S., & Zucchi, G. (1994). Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. *Biotechnol Lett*, 16(5), 491-496.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 315-321.
- Äyräpää, T. (1965). The formation of phenethyl alcohol from ¹⁴C-labelled phenylalanine. *Journal of the Institute of Brewing*, 71(4), 341-347.
- Aziz, S., Wu, Z., & Robinson, D. S. (1999). Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β -carotene. *Food Chemistry*, 64(2), 227-230.

- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules*, *19*(9), 13541.
- Berger, R., Neuhäuser, K., & Drawert, F. (1986). Characterization of the odour principles of some basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. *Flavour and fragrance journal*, *1*(4- 5), 181-185.
- Bhatia, S. P., Wellington, G. A., Cocchiara, J., Lalko, J., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2011). Fragrance material review on 3-phenyl-1-propanol. *Food and Chemical Toxicology*, *49*, Supplement 2, S246-S251.
- Bicas, J. L., Molina, G., Cavalcante Barros, F. F., & Pastore, G. M. (2016). Production of Aroma Compounds by White Biotechnology *White Biotechnology for Sustainable Chemistry* (pp. 310-332): The Royal Society of Chemistry.
- Bilia, A. R., Flamini, G., Taglioli, V., Morelli, I., & Vincieri, F. F. (2002). GC–MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chemistry*, *76*(3), 307-310.
- Bohlin, C., Persson, P., Gorton, L., Lundquist, K., & Jönsson, L. J. (2005). Product profiles in enzymic and non-enzymic oxidations of the lignin model compound erythro-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *35*(4–6), 100-107.
- Bougioukou, D. J., & Smonou, I. (2002). Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of conjugated dienoic esters. *Tetrahedron Letters*, *43*(2), 339-342.
- Bourel, G., Nicaud, J.-M., Nthangeni, B., Santiago-Gomez, P., Belin, J.-M., & Husson, F. (2004). Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(4), 293-299.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248-254.
- Bugg, T. D. H., & Winfield, C. J. (1998). Enzymatic cleavage of aromatic rings: Mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*, *15*(5), 513-530.

- Burdock, G. A. (2001). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, Fourth Edition: Taylor & Francis.
- Chandra, P., Bajpai, V., Srivastva, M., Kumar, K. B. R., & Kumar, B. (2014). Metabolic profiling of *Piper* species by direct analysis using real time mass spectrometry combined with principal component analysis. *Anal. Methods*, 6(12), 4234-4239.
- Chauhan, N., Thackray, S. J., Rafice, S. A., Eaton, G., Lee, M., Efimov, I., Basran, J., Jenkins, P. R., Mowat, C. G., Chapman, S. K., & Raven, E. L. (2009). Reassessment of the Reaction Mechanism in the Heme Dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 131(12), 4186-4187.
- Chen, X., Tang, Q., Chen, Y., Wang, W., & Li, S. (2010). Simultaneous extraction of polysaccharides from *Poria cocos* by ultrasonic technique and its inhibitory activities against oxidative injury in rats with cervical cancer. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 409-413.
- Criegee, R. (1975). Mechanismus der Ozonolyse. *Angewandte Chemie*, 87(21), 765-771.
- Cristaldo, P. F., DeSouza, O., Krasulová, J., Jirosová, A., Kutalová, K. i., Lima, E. R., Obotník, J., & Sillam-Dussès, D. (2014). Mutual Use of Trail-Following Chemical Cues by a Termite Host and Its Inquiline. *PLoS ONE*, 9(1), e85315.
- de la Pena Moreno, F., Blanch, G. P., Flores, G., & Ruiz Del Castillo, M. L. (2010). Development of a method based on on-line reversed phase liquid chromatography and gas chromatography coupled by means of an adsorption-desorption interface for the analysis of selected chiral volatile compounds in methyl jasmonate treated strawberries. *J Chromatogr A*, 1217(7), 1083-1088.
- Dhakshinamoorthy, A., & Pitchumani, K. (2006). Clay-anchored non-heme iron–salen complex catalyzed cleavage of CC bond in aqueous medium. *Tetrahedron*, 62(42), 9911-9918.
- Drawert, F., Berger, R. G., & Neuhäuser, K. (1983). Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms 4. Characterization of the major principles of the odor of *Pleurotus euosmus*. *Eur J Appl Microbiol*, 18(2), 124-127.

- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027-1047.
- Eisele, N., Linke, D., Nimtz, M., & Berger, R. G. (2011). Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 46(9), 1840-1846.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(10), 1091-1096.
- Emura, M., Yaguchi, Y., Nakahashi, A., Sugimoto, D., Miura, N., & Monde, K. (2009). Stereochemical studies of odorous 2-substituted-3(2H)-furanones by vibrational circular dichroism. *J Agric Food Chem*, 57(21), 9909-9915.
- Epstein, W. W., Netz, D. F., & Seidel, J. L. (1993). Isolation of piperine from black pepper. *Journal of Chemical Education*, 70(7), 598.
- Etschmann, M. M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59(1), 1-8.
- Etschmann, M. M. W., Sell, D., & Schrader, J. (2005). Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng*, 92(5), 624-634.
- Flohe, L., Guenzler, W. A., & Loschen, G. (1979). The glutathione peroxidase reaction: a key to understand the selenium requirement of mammals. *American Chemical Society*, 263-286.
- Fraatz, M. A., Naeve, S., Hausherr, V., Zorn, H., & Blank, L. M. (2014). A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1(1), 1-8.
- Franke, S., Froehlich, K., Werner, S., Boehm, V., & Schoene, F. (2010). Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112(10), 1122-1129.

- Goossens, A., Häkkinen, S. T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A. M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inzé, D., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8595-8600.
- Hajnal, I., Faber, K., Schwab, H., Hall, M., & Steiner, K. (2015). Oxidative Alkene Cleavage Catalysed by Manganese-Dependent Cupin TM1459 from *Thermotoga maritima*. *Adv. Synth. Catal.*, *357*(14-15), 3309-3316.
- Hanssen, H. P., & Abraham, W. R. (1987). Odoriferous compounds from liquid cultures of *Gloeophyllum odoratum* and *Lentinellus cochleatus* (basidiomycotina). *Flavour and Fragrance Journal*, *2*(4), 171-174.
- Harrison, P. J., & Bugg, T. D. H. (2014). Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases: Reaction mechanisms, inhibition and biochemical roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *544*, 105-111.
- Hauck, T., Bruhlmann, F., & Schwab, W. (2003). Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*: identification of an intermediate. *Appl Environ Microbiol*, *69*(7), 3911-3918.
- Hauck, T., Landmann, C., Raab, T., Bruhlmann, F., & Schwab, W. (2002). Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate. *Carbohydr Res*, *337*(13), 1185-1191.
- He, H. Y., Yuan, H., Tang, M. C., & Tang, G. L. (2014). An unusual dehydratase acting on glycerate and a ketoreductase stereoselectively reducing alpha-ketone in polyketide starter unit biosynthesis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *53*(42), 11315-11319.
- Hodge, J. E. (1960). Novel reductones and methods of making them *U.S. Patent 2.936.308*.
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., & Jiang, W. (2010). Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. *Molecules*, *15*(11), 7558.

- Huber, W., & Fröhlike, E. (1972). A new spray-reagent for the detection and quantitative estimation of peroxides. *Chromatographia*, 5(4), 256-257.
- Ikediyi, C. O., & Snyder, H. E. (1977). Cooxidation of *beta*-carotene by an isoenzyme of soybean lipoxygenase. *J Agr Food Chem*, 25(1), 124-127.
- Iversen, S., & Jørgensen, M. (1995). Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnology Techniques*, 9(8), 573-576.
- Kjalke, M., Andersen, M. B., Schneider, P., Christensen, B., Schulein, M., & Welinder, K. G. (1992). Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et biophysica acta*, 1120(3), 248-256.
- Kloer, D. P., & Schulz, G. E. (2006). Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(19), 2291-2303.
- Krings, U., Hinz, M., & Berger, R. G. (1996). Degradation of [2H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *Journal of Biotechnology*, 51(2), 123-129.
- Krzyczkowski, W., Malinowska, E., & Herold, F. (2010). Erinacine A biosynthesis in submerged cultivation of *Herichium erinaceum*: quantification and improved cultivation. *Eng Life Sci*, 10.
- Kulshrestha, Y., & Husain, Q. (2007). Decolorization and degradation of acid dyes mediated by salt fractionated turnip (*Brassica rapa*) peroxidases. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(2), 255-267.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, S., & Lee, D. G. (2001). Heterogeneous permanganate oxidation of styrene and cinnamic acid derivatives: A simple and effective method for the preparation of benzaldehydes. *Synthesis-Stuttgart*(11), 1645-1648.

- Leonhardt, R.-H., Krings, U., Berger, R. G., & Linke, D. (2016). Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 1-9.
- Leuenberger, M. G., Engeloch-Jarret, C., & Woggon, W.-D. (2001). The Reaction Mechanism of the Enzyme-Catalyzed Central Cleavage of β -Carotene to Retinal. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(14), 2613-2617.
- Lewis-Ballester, A., Batabyal, D., Egawa, T., Lu, C., Lin, Y., Marti, M. A., Capece, L., Estrin, D. A., & Yeh, S.-R. (2009). Evidence for a ferryl intermediate in a heme-based dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17371-17376.
- Lim, S. S., Jang, J. M., Park, W. T., Uddin, M. R., Chae, S. C., Kim, H. H., & Park, S. U. (2013). Chemical composition of essential oils from flower and leaf of Korean mint, *Agastache rugosa*. *Asian J. Chem.*, 25(8), 4361-4363.
- Ling, K.-Q., & Sayre, L. M. (2005). Horseradish peroxidase-mediated aerobic and anaerobic oxidations of 3-alkylindoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(10), 3543-3551.
- Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H., & Berger, R. G. (2007). Laccase isolation by foam fractionation—New prospects of an old process. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 273-277.
- Liu, J.-J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K. M. (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports*, 29(5), 419-436.
- Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 335-353.
- Marostica, M. R., Jr., & Pastore, G. M. (2007). Tropical fruit flavour.
- Matsumura, F., Nishimoto, K., Ikeda, T., & Coppel, H. C. (1976). Influence of carbon sources on the production of the termite trail-following substance by *Gloeophyllum trabeum*. *J Chem Ecol*, 2(3), 299-305.

- Miyazawa, M., Matsuda, N., Tamura, N., & Ishikawa, R. (2008). Characteristic Flavor of Volatile Oil from Dried Fruiting Bodies of *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5), 420-423.
- Monzote, L., García, M., Montalvo, A. M., Scull, R., & Miranda, M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 168-173.
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Keith, I. U., David, L. A., & Douglas, M. J. (1993). Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron*, 49(4), 911-928.
- Mosciano, G., Fasano, M., Cassidy, J., Connelly, K., Mazeiko, P., Montenegro, A., Allen, B. B., Michalski, J., & Sadural, S. (1995). Organoleptic characteristics of flavor materials. *Perfum. Flavor.*, 20(3), 63-65.
- Münch, P., & Schieberle, P. (1998). Quantitative Studies on the Formation of Key Odorants in Thermally Treated Yeast Extracts Using Stable Isotope Dilution Assays. *J Agr Food Chem*, 46(11), 4695-4701.
- Mutti, F. G. (2012). Alkene cleavage catalyzed by heme and nonheme enzymes: reaction mechanisms and biocatalytic applications. *Bioinorg. Chem. Appl.*(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 626909, 626913 pp.
- Mutti, F. G., Lara, M., Kroutil, M., & Kroutil, W. (2010). Ostensible enzyme promiscuity: Alkene cleavage by peroxidases. *Chemistry - A European Journal*, 16(47), 14142-14148.
- Nasirullah, Werner, G., & Seher, A. (1984). Fatty Acid Composition of Lipids from Edible Parts and Seeds of Vegetables. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 86(7), 264-268.
- Nörenberg, S., Reichardt, B., Andelfinger, V., Eisenreich, W., & Engel, K.-H. (2013). Influence of the Stereochemistry on the Sensory Properties of 4-Mercapto-2-heptanol and Its Acetyl-Derivatives. *J Agr Food Chem*, 61(9), 2062-2069.
- Okumoto, H., Ohtsuka, K., & Banjoya, S. (2007). Use of the composite material RuO₂/BaTi₄O₉ as an environmentally benign solid catalyst for the oxidative cleavage of olefins. *Synlett*(20), 3201-3205.

- Opdyke, D. L. J. (1974). Monographs on fragrance raw materials. Heliotropin. *Food Cosmet. Toxicol.*, 12, Suppl., 907-908.
- Osbourn, A. E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8(10), 1821-1831.
- Pappo, R., Allen, D. S., Lemieux, R. U., & Johnson, W. S. (1956). Osmium tetroxide-catalyzed periodate oxidation of olefinic bonds. *J. Org. Chem.*, 21(4), 478-479.
- Plagemann, I., Krings, U., & Berger, R. G. (2014). Isolation and characterization of wild-type lipoxygenase LOX(Psa)1 from *Pleurotus sapidus*. *Z Naturforsch C*, 69(3-4), 149-154.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91-102.
- Rajagopalan, A., Schober, M., Emmerstorfer, A., Hammerer, L., Migglautsch, A., Seisser, B., Glueck, S. M., Niehaus, F., Eck, J., Pichler, H., Gruber, K., & Kroutil, W. (2013a). Enzymatic Aerobic Alkene Cleavage Catalyzed by a Mn³⁺-Dependent Proteinase A Homologue. *ChemBioChem*, 14(18), 2427-2430.
- Rajagopalan, A., Seisser, B., Mutti, F. G., Schober, M., & Kroutil, W. (2013b). Alkene cleavage by white-rot *Trametes hirsuta*: Inducing enzyme activity by a fungicide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 118-122.
- Ramírez, D. A., Muñoz, S. V., Atehortua, L., & Michel Jr, F. C. (2010). Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresource Technology*, 101(23), 9213-9220.
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E. A., Sun, H., LaButti, K. M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S. E., Pisabarro, A. G., Walton, J. D., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D. S., & Grigoriev, I. V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), 9923-9928.

- Roelfes, G., Lubben, M., Hage, R., Que, J. L., & Feringa, B. L. (2000). Catalytic Oxidation with a Non-Heme Iron Complex That Generates a Low-Spin Fe(III)OOH Intermediate. *Chemistry – A European Journal*, 6(12), 2152-2159.
- Roscher, R., Hilker, A., Gessner, M., Schindler, E., Schreier, P., & Schwab, W. (1997). L-Rhamnose: progenitor of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone formation by *Pichia capsulata*? *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 204(3), 198-201.
- Roth, K. (2015). Quadratisch, praktisch, natürlich? *Chemie in unserer Zeit*, 49(5), 336-344.
- Saifullina, N. A., & Kozhina, I. S. (1975). Composition of essential oils from flowers of *Filipendula ulmaria*, *F. denudata*, and *F. stepposa*. *Rastit. Resur.*, 11(4), 542-544.
- Santos, A. S., Pereira Jr, N., da Silva, I. M., Sarquis, M. I. M., & Antunes, O. A. C. (2004). Peroxidase catalyzed microbiological oxidation of isosafrol into piperonal. *Process Biochemistry*, 39(12), 2269-2275.
- Satar, R., & Husain, Q. (2009). Use of bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase together with redox mediators to decolorize disperse dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(2), 213-219.
- Schaffer, M., Groger, T., Putz, M., & Zimmermann, R. (2013). Forensic profiling of sassafras oils based on comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Forensic Sci. Int.*, 229(1-3), 108-115.
- Schiefner, A., Sinz, Q., Neumaier, I., Schwab, W., & Skerra, A. (2013). Structural basis for the enzymatic formation of the key strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone. *J Biol Chem*, 288(23), 16815-16826.
- Schimanski, S. (2014). Biotechnologische Erzeugung natürlicher Aromastoffe aus Submerskulturen von Asco- und Basidiomyceten. (Dissertation), Hannover, Technische Informationsbibliothek u. Universitätsbibliothek.
- Schimanski, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2013). Rapid analysis of volatiles in fat-containing matrices for monitoring bioprocesses. *Eur Food Res Technol*, 237(5), 739-746.

- Schindler, F., & Seipenbusch, R. (1990). Fungal flavour by fermentation. *Food Biotechnology*, 4(1), 77-85.
- Schrader, J. (2007). Microbial Flavour Production. In R. G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 507-574). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schreier, P., Drawert, F., & Heindze, I. (1981). The quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. VIII. Volatile constituents of fresh dill herb, *Anethum graveolens*, L. (*Umbelliferae*). *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 14(3), 150-152.
- Schwab, W. (2013). Natural 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Furaneol®). *Molecules*, 18(6), 6936.
- Schwab, W., & Roscher, R. (1997). 4-Hydroxy-3(2H)-furanones: Natural and Maillard products. *Recent Res. Dev. Phytochem.*, 1, 643-673.
- Schwenk, D., Nett, M., Dahse, H.-M., Horn, U., Blanchette, R. A., & Hoffmeister, D. (2014). Injury-Induced Biosynthesis of Methyl-Branched Polyene Pigments in a White-Rotting Basidiomycete. *J. Nat. Prod.*, 77(12), 2658-2663.
- Scognamiglio, J., Jones, L., Vitale, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2012). Fragrance material review on benzyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology*, 50, Supplement 2, S140-S160.
- Shen, T., Morlock, G., & Zorn, H. (2015). Production of cyathane type secondary metabolites by submerged cultures of *Hericium erinaceus* and evaluation of their antibacterial activity by direct bioautography. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2(1), 1-7.
- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M. P., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17(9), 745-752.
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., & Dawson, J. H. (1996). Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2841-2888.
- Sprecher, E. (1959). Über die Guttation bei Pilzen. *Planta*, 53(6), 565-574.

- Stark, D., Munch, T., Sonnleitner, B., Marison, I. W., & von Stockar, U. (2002). Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology progress*, 18(3), 514-523.
- Stiehm, T., & Baur, M. (2000). Verwendung von Piperonal als entzündungshemmender Zusatz zu Kosmetika und Arzneimitteln: Google Patents.
- Sun, Y. (2014). Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 131-134.
- Taupp, D. E., Nimtz, M., Berger, R. G., & Zorn, H. (2008). Stress response of *Nidula niveotomentosa* to UV-A light. *Mycologia*, 100(4), 529-538.
- Tokitomo, Y., Steinhaus, M., Buettner, A., & Schieberle, P. (2005). Odor-active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by quantitative and sensory evaluation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 69(7), 1323-1330.
- Travis, B. R., Narayan, R. S., & Borhan, B. (2002). Osmium tetroxide-promoted catalytic oxidative cleavage of olefins: An organometallic ozonolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 124(15), 3824-3825.
- Tuynman, A., Spelberg, J. L., Kooter, I. M., Schoemaker, H. E., & Wever, R. (2000). Enantioselective Epoxidation and Carbon–Carbon Bond Cleavage Catalyzed by *Coprinus cinereus* Peroxidase and Myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3025-3030.
- Tyrkov, A. G., & Akmaev, E. R. (2013). RU2493245C2.
- Valle, J. S., Vandenberghe, L. P. S., Santana, T. T., Almeida, P. H., Pereira, A. M., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Soccol, C. R. (2014). Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. *GMR, Genet. Mol. Res.*, 13(4), 8544-8551, 8548 pp.
- Van Ornum, S. G., Champeau, R. M., & Pariza, R. (2006). Ozonolysis Applications in Drug Synthesis. *Chemical Reviews*, 106(7), 2990-3001.

- Vanhulle, S., Radman, R., Parra, R., Cui, T., Bols, C.-M., Tron, T., Sannia, G., & Keshavarz, T. (2007). Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.*, *40*(7), 1712-1718.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, *8*.
- Voda, K., Boh, B., Vrtačnik, M., & Pohleven, F. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *51*(1), 51-59.
- Wang, J. Q., Cai, F., Wang, E., & He, L. N. (2007). Supercritical carbon dioxide and poly(ethylene glycol): an environmentally benign biphasic solvent system for aerobic oxidation of styrene. *Green Chem.*, *9*(8), 882-887.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, *111*(6), 1021-1058.
- Willhalm, B., Stoll, M., & Thomas, A. F. (1965). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one. *Chem. Ind. (London, U. K.)*(38), 1629-1630.
- Wolters, N., Schembecker, G., & Merz, J. (2015). Erinacine C: A novel approach to produce the secondary metabolite by submerged cultivation of *Hericium erinaceus*. *Fungal Biology*, *119*(12), 1334-1344.
- Wu, Z., Robinson, D. S., Hughes, R. K., Casey, R., Hardy, D., & West, S. I. (1999). Co-oxidation of β -Carotene Catalyzed by Soybean and Recombinant Pea Lipoyxygenases. *J Agr Food Chem*, *47*(12), 4899-4906.
- Wurzenberger, M., & Grosch, W. (1983). Determination of 1-octen-3-ol in mushrooms and in products containing mushrooms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, *176*(1), 16-19.

- Wurzenberger, M., & Grosch, W. (1984). Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*psalliota bispora*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 795(1), 163-165.
- Xing, D., Guan, B. T., Cai, G. X., Fang, Z., Yang, L. P., & Shi, Z. J. (2006). Gold(I)-catalyzed oxidative cleavage of a C-C double bond in water. *Organic Letters*, 8(4), 693-696.
- Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2007). Purification, characterization and gene cloning of isoeugenol-degrading enzyme from *Pseudomonas putida* IE27. *Archives of microbiology*, 187(6), 511-517.
- Yang, D., & Zhang, C. (2001). Ruthenium-catalyzed oxidative cleavage of olefins to aldehydes. *J. Org. Chem.*, 66(14), 4814-4818.
- Yu, W. S., Mei, Y., Kang, Y., Hua, Z. M., & Jin, Z. D. (2004). Improved procedure for the oxidative cleavage of olefins by OsO₄-NaIO₄. *Organic Letters*, 6(19), 3217-3219.
- Zelena, K., Hardebusch, B., Huelsdau, B., Berger, R. G., & Zorn, H. (2009). Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases. *J. Agric. Food Chem.*, 57(21), 9951-9955.
- Zhang, S., & Mueller, C. (2012). Comparative analysis of volatiles in traditionally cured Bourbon and Ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 60(42), 10433-10444.
- Zheng, W., Zhang, M., Zhao, Y., Miao, K., & Jiang, H. (2009). NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology*, 100(19), 4481-4487.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., & Berger, R. G. (2003). Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(4), 331-336.
- Zucca, P., Rescigno, A., Olianias, A., Maccioni, S., Sollai, F. A., & Sanjust, E. (2011). Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 216-222.

7 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname: Fuchs, Birgit Annemarie Johanna
Geburtsdatum/-ort: 23.03.1985 in Würzburg
Familienstand: Ledig

SCHULBILDUNG

1991 – 1995 Erich-Kästner Grundschule Alzenau
1995 – 1996 Karl-Amberg-Schule Alzenau
1996 – 2005 Spessart-Gymnasium Alzenau, Abschluss: Abitur

BERUFSAUSBILDUNG

2005 – 2007 Ausbildung zur staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistentin an der BBS – Naturwissenschaften in Ludwigshafen

STUDIUM

10.2007 - 07.2012 Studium der Lebensmittelchemie (Staatsexamen) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Thema der wissenschaftlichen Abschlussarbeit: *Enzymkinetische Charakterisierung der in Helix Pomatia enthaltenen β -Glucuronidase und Sulfatase anhand von 17β -Estradiol-Glucuroniden und Sulfaten mittels HPLC-UV*

seit 01.2013 Promotionsstudium am Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hannover
Thema der Dissertation: *Präkursoren, Induktoren, Elicitoren und das Volatilom von Basidiomyceten*

BISHERIGE TÄTIGKEITEN

- 07.2007 – 09.2007 ISEGA GmbH Aschaffenburg im mikrobiologischen Labor als Biologisch-technische Assistentin
- 01.2013 – 12.2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hannover

Liste der wissenschaftlichen Publikationen**Posterpräsentationen**

1. Fuchs, B.; Esparan, V.; Krings, U.; Berger R. G.: Basidiomycetous enzymes for flavour transformation reactions. Scale-up and scale-down of bioprocesses. DECHEMA 11. - 13. Mai 2015, Hamburg-Bergedorf.
2. Esparan, V.; Fuchs, B.; Krings, U.; Berger, R. G.: Natural flavour production via basidiomycetes. Bioflavour 2015 International Conference on Flavour and Fragrance Biotechnology. DECHEMA 9 – 11 September 2015, Frankfurt am Main.