

Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen

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

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemiker

Marco Alexander Fraatz

geboren am 15. März 1976, in Hamburg

2007

Referent:

Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent:

Prof. Dr. Holger Zorn

Tag der Promotion:

10.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis April 2007 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von *Prof. Dr. Dr. R. G. Berger* angefertigt.

Meinem Doktorvater *Prof. Dr. Dr. R. G. Berger* danke ich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine stetige Gesprächsbereitschaft, den gewährten Freiraum während der Bearbeitung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Mein besonderer Dank gilt außerdem *Prof. Dr. Holger Zorn* und *Dr. Ulrich Krings* für die konstruktiven Diskussionen und die vielen guten Tipps während der gesamten Promotion.

Ebenso danke ich:

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für die tolle Gemeinschaft und meinen Laborkolleg(inn)en *Dr. Darius Hapetta*, *Bärbel Hülsdau*, *Stephanie Kopp*, *Dr. Diana Linke* und *Dr. Manuela Scheibner* für das sehr gute Arbeitsklima,

Jennifer Hanning, *Meike Takenberg* und *Tanja Seemann* vom Institut für Lebensmittelchemie für die Durchführung der Arbeiten zur Optimierung der Nootkatonbiogenese,

Inge Reupke vom Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover für die Herstellung von Lyophilisaten,

Dr. Manfred Nimtz vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS,

Georg Müller für die Bereitstellung der Fotografien diverser Basidiomyceten,

der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF 119-ZN/3) für die finanzielle Förderung eines Teils dieser Arbeiten.

Aus ganzem Herzen danke ich *Sara Strüßmann*, ohne deren enorme Geduld, Verständnis und Liebe diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

für Karl Jonathan, Sara, Monika und Dieter

Zusammenfassung

Marasmius scorodoni, *Cystoderma carcharias*, *Cyathus striatus* und *Trametes versicolor* wurden bezüglich ihres Potenzials zur Oxyfunktionalisierung von α -Pinen untersucht. In einem Screening wurde die Bildung von (*E*)-Carveol, Myrtenol, (*Z*)-Verbenol, (*E*)-Pinocarveol, Myrtenal, (*E*)-Verbenol und Verbenon anhand dreier verschiedener Transformationssysteme (Submerskulturen, Kulturen mit erhöhter Biofeuchtmasse, Lyophilisate) miteinander verglichen. Außer bei der Transformation von α -Pinen mit *T. versicolor* wurden jeweils die höchsten Produktgehalte bei der Umsetzung mit Lyophilisaten erzielt.

Auch die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* zu (+)-Nootkaton ergab hohe molare Umsatzraten und gute Produktausbeuten. Je nach Substratdosierung wurden bis zu 320 mg L⁻¹ (11 mol%) beziehungsweise 266 mg L⁻¹ (45 mol%) (+)-Nootkaton synthetisiert.

Das Transformationssystem besteht aus mindestens drei Komponenten. Ein hitzelabiles Enzym war in geeigneten Puffern leicht löslich. Eine weitere lösliche Komponente war hitzestabil und ließ sich durch Ultrafiltration vom Enzym abtrennen. Bei der dritten Komponente handelte es sich um einen unlöslichen, ebenfalls hitzestabilen Cofaktor. Dieser konnte durch Detergenzien wie zum Beispiel ASB-C8Ø oder Natriumchololat vollständig ersetzt werden.

Das (+)-Valencen oxidierende Enzym wurde über drei chromatographische Stufen mittels FPLC gereinigt. Durch Vergleich aktiver und nicht aktiver Fraktionen nach SDS-PAGE kamen drei Proteinbanden (60, 63 und 66 kDa) als potenzielles Zielenzym in Betracht. Durch *de novo* Sequenzierung dieser Banden mittels der „Electrospray-tandem-Massenspektrometrie“ wurden für zwei Banden (63 und 66 kDa) Peptidsequenzen erhalten, die Homologien zu Lipoxygenasen aus *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* und *Gibberella moniliformis* aufwiesen. Peptidsequenzen einer Lipoxygenase aus Basidiomyceten waren bisher nicht bekannt. Mittels Inhibitorversuchen und Aktivitätsfärbungen wurde eine potenzielle Beteiligung von Cytochrom P450-Monooxygenasen, Laccasen, Peroxidasen, Lipoxygenasen und Dioxygenasen an der Oxyfunktionalisierung von (+)-Valencen untersucht. Die Mehrzahl der Befunde deutet auf eine Aktivität mit Dioxygenase-Charakter hin.

Das zur Anzucht von *P. sapidus* verwendete Vollmedium wurde im Hinblick auf die Kosten optimiert. Die Kohlenstoffquelle Glucose wurde unter Erhalt der Aktivität durch Palatinose™-Melasse ersetzt. Analog wurde die Stickstoffquelle L-Asparagin durch Ammoniumnitrat substituiert. Die Kosten des Mediums wurden durch diese Maßnahmen um circa 70% reduziert.

Schlagwörter: Basidiomyceten, Biotransformationen, Terpene

Abstract / Summary

Submerged cultures, high density cell cultures, and lyophilisates of four basidiomycetes (*Marasmius scorodoni*, *Cystoderma carcharias*, *Cyathus striatus*, and *Trametes versicolor*) were tested for their capability to oxidise α -pinene to *trans*-carveol, myrtenol, *cis*-verbenol, *trans*-pinocarveol, myrtenal, *trans*-verbenol, and verbenone. Product yields of up to 75 mg L⁻¹ with *T. versicolor* were accessible with freeze dried cultures.

Fungal lyophilisates of *Pleurotus sapidus* were successfully applied for the oxidation of (+)-valencene to (+)-nootkatone. Depending on substrate dosage high conversion rates (45 mol%) and (+)-nootkatone concentrations (up to 320 mg L⁻¹) were obtained.

The transformation system consisted of three components. One enzyme was soluble in conversion buffers and sensitive to heat. The second component was as well soluble, but heat-stable. It was possible to separate this cofactor from the enzyme by means of ultrafiltration. The third component was not soluble but again heat-stable. This constituent could be completely replaced by detergents such as ASB-C8Ø or sodium cholate.

The enzyme responsible for the oxidation of (+)-valencene was purified partially by a three-step FPLC procedure. By comparison of active and inactive FPLC fractions on Coomassie[®] stained SDS-PAGE gels three protein bands were assumed to be the possible target enzyme. Molecular masses of 60, 63, and 66 kDa were assigned to the respective bands. Electrospray-tandem mass spectroscopy analyses of the purified proteins yielded peptide sequences with homology to lipoxygenases from *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus*, and *Gibberella moniliformis*. Peptide sequences of lipoxygenases from basidiomycetes have not become known yet. Using inhibitor studies and activity stainings an oxidization of (+)-valencene by P450 monooxygenases, laccases, peroxidases, lipoxygenases, and dioxygenases was investigated. Analytical evidence suggests dioxygenase-type activity.

The culture medium of *P. sapidus* was optimised with regard to cost-efficiency. The carbon source glucose was replaced by palatinose molasses while maintaining the same level of enzyme activity. Similarly the organic nitrogen source L-asparagine was substituted by ammonium nitrate. The total costs of the resulting media was reduced by approximately 70%.

Keywords: basidiomycetes, biotransformations, terpenes

Veröffentlichungen

Fraatz, M.; Hardebusch, B.; Krings, U.; Berger, R. G.; Zorn, H. (2006) Oxyfunktionalisierung von α -Pinen, *Lebensmittelchemie* **60**, 63–64.

Fraatz, M. A.; Rinne, S.; Berger, R. G.; Zorn, H. (2007) Terpenoide Aromen aus nachwachsenden Rohstoffen, *Lebensmittelchemie*; im Druck.

Zorn, H.; Taupp, D. E.; Hülsdau, B.; Scheibner, M.; Fraatz, M. A.; Berger, R. G. (2007) "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma. Proceedings of the 8th Wartburg-Symposium, Eisenach; im Druck.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen.....	1
1.2 Terpenoide.....	2
1.3 Biotechnologische Transformation von Terpenen	5
1.4 Zielsetzung	7
2 Ergebnisse	8
2.1 Biotransformation des Monoterpens α-Pinen	8
2.1.1 Experimentelles Design.....	8
2.1.2 Identifizierung der Transformationsprodukte	11
2.1.3 Transformation mit Submerskulturen	12
2.1.4 Transformation mit konzentrierter Biofeuchtmasse	13
2.1.5 Blindwerte.....	14
2.1.6 Transformation mit Lyophilisaten.....	15
2.1.7 Blindwerte.....	16
2.1.8 Vergleich der Biotransformationssysteme	17
2.2 Umsetzung des Sesquiterpens (+)-Valencen	20
2.2.1 Transformation mit Eisen(II)-sulfat	20
2.2.2 Überprüfung der Substratqualität	23
2.2.3 Transformation mit Lipoxygenase	25
2.3 Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen.....	26
2.3.1 Variation der Rehydratisierungszeit.....	28
2.3.2 Puffer, Pufferstärke.....	29
2.3.2.1 Einfluss Puffer und pH-Wert.....	29
2.3.2.2 Einfluss Pufferstärke	30
2.3.2.3 Einfluss von Natriumchlorid auf die Transformationsaktivität	31
2.3.3 Einfluss der Valencendosierung auf die Produktausbeute	32
2.3.4 Einfluss von Inhibitoren und anderen Zusätzen auf die Transformationsaktivität ..	33
2.3.5 Kompartimentierung des Transformationssystems	34
2.3.5.1 Separation nach Rehydratisierung.....	34
2.3.5.2 Optimierung der Rückstandsmenge.....	38
2.3.5.3 Ultrafiltration nach Separation	39
2.3.6 Ersatz der im Zentrifugationsrückstand verbleibenden Komponente	43
2.3.7 Ersatz der im Filtrat befindlichen Komponente.....	47
2.3.8 Reversible Inhibierung.....	47
2.3.9 Lagerstabilität	48
2.3.10 Einfluss der Sauerstoffsättigung und von Deuteriumoxid auf die Produktausbeuten	50
2.3.11 Weitere Charakterisierung des Transformationssystems.....	53

2.4 Enzymreinigung	55
2.4.1 Proteinpräzipitation.....	55
2.4.2 SDS-PAGE nach Proteinpräzipitation (Silberfärbung).....	56
2.4.3 FPLC – Ionenaustauschchromatographie (IEX DEAE HiPrep FF).....	57
2.4.3.1 Verwendung eines linearen Gradientens	57
2.4.3.2 Verwendung eines Stufengradienten	59
2.4.4 FPLC – Ionenaustauschchromatographie (IEX SP FF).....	61
2.4.5 FPLC – Gelfiltration (GF Superdex 200)	63
2.4.6 Gelfiltration nach Proteinpräzipitation.....	65
2.4.7 Reinigung über drei chromatographische Stufen (IEX, IEX, GF)	67
2.4.8 SDS-PAGE nach dreistufiger Reinigung mittels FPLC (Silberfärbung).....	70
2.4.9 SDS-PAGE nach dreistufiger Reinigung mittels FPLC (Hämefärbung)	71
2.4.10 Isoelektrische Fokussierung nach dreistufiger Reinigung (IEF)	72
2.5 Peptidsequenzen	73
2.6 Optimierung der Nootkatonbiogenese	75
2.6.1 Optimierung des Transformationssystems	75
2.6.1.1 Auswahl der Substratqualität.....	75
2.6.1.2 Kinetik der Nootkatonbiogenese	76
2.6.2 Optimierung der Kulturführung	76
2.6.2.1 Kinetik der Enzym- und Biomassenbildung.....	76
2.6.2.2 Reduzierung der Glucosekonzentration in SNL-H.....	78
2.6.2.3 Einsatz von Melasse als Ersatz für Glucose in der Nährlösung	79
2.6.2.4 Einsatz von Ammoniumnitrat als Ersatz für L-Asparagin in der Nährlösung.....	82
2.6.2.5 Adaption der Vorkulturen mit (+)-Valencen bei der Verwendung des Hauptkulturmediums NL-MA	84
3 Diskussion	85
3.1 Enzymatische Katalyse	85
3.2 Biotransformation von Terpenen	86
3.3 Biotransformation des Monoterpens α-Pinen	87
3.3.1 Autoxidation.....	87
3.3.2 Submerskulturen	88
3.3.3 Kulturen mit erhöhter Biofeuchtmasse	89
3.3.4 Lyophilisate.....	90
3.4 Transformation des Sesquiterpens (+)-Valencen	92
3.4.1 Chemosynthese von (+)-Nootkaton.....	92
3.4.2 Biosynthese von (+)-Nootkaton	95
3.4.2.1 Transformation mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	98
3.4.2.2 Charakterisierung des Transformationssystems.....	99
3.4.2.3 Enzymreinigung.....	105
3.4.2.4 Enzymsysteme	105
3.5 Optimierung der Nootkatonbiogenese	119
3.5.1 Optimierung der Medienzusammensetzung.....	120

4 Ausblick	122
5 Material und Methoden	123
5.1 Verwendete Mikroorganismen	123
5.2 Chemikalien	123
5.2.1 Referenzverbindungen und Substrate	123
5.2.2 Bestandteile der Nährlösungen	124
5.2.3 Sonstige Chemikalien	124
5.2.4 Lösungsmittel	125
5.2.5 Gase	126
5.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel	126
5.3.1.1 Rührkesselreaktor	126
5.4 Kultivierung der Basidiomyceten	127
5.4.1 Nährlösungen	127
5.4.2 SNL-H-Agar	127
5.4.3 Kulturführung (Transformation von α -Pinen)	128
5.4.3.1 Stammkultivierung	128
5.4.3.2 Homogenisierung der Kulturen	128
5.4.3.3 Vorkulturen	128
5.4.3.4 Anzucht und Ernte von Biomasse	128
5.4.3.5 Submerskulturen und Biokonzentrate mit vermindertem Glucosegehalt	128
5.4.3.6 Herstellung von Lyophilisaten	128
5.4.4 Kulturführung (Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung)	129
5.4.4.1 Anzucht von Biomasse	129
5.4.4.2 Herstellung von Lyophilisaten	129
5.4.4.3 Anzucht von Laccase-haltigen Kulturen	129
5.4.5 Kulturführung (Transformation von (+)-Valencen: Optimierung)	129
5.4.5.1 Vorkulturen	130
5.4.5.2 Adaption von <i>Pleurotus sapidus</i> an (+)-Valencen	130
5.4.5.3 Anzucht von Biofeuchtmasse in Schüttelkolben (500 mL)	130
5.4.5.4 Anzucht von Biomasse in Schüttelkolben (300 mL)	130
5.4.5.5 Ernte der Hauptkulturen zur Herstellung von Lyophilisaten	130
5.4.5.6 Ernte der Hauptkulturen zur Herstellung von Lyophilisaten	130
5.4.5.7 Herstellung von Lyophilisaten	130
5.5 Bestimmung von Kulturparametern	131
5.5.1 Biofeuchtmasse nach Kultivierung im Rührkesselreaktor	131
5.5.2 Biofeuchtmasse nach Kultivierung im Schüttelkolben	131
5.5.3 Trockenmasse nach Gefriertrocknung	131
5.5.4 Glucosegehalt - Photometrisch (UV)	131
5.5.5 pH-Wert	131
5.5.6 Laccase-Aktivität (VIS)	131
5.5.7 Überprüfung auf Kontamination	131

5.6 Transformationen	132
5.6.1 Transformation von α -Pinen	132
5.6.1.1 Submerskulturen und Biokonzentrate	132
5.6.1.2 Lyophilisate.....	132
5.6.1.3 Blindwerte.....	132
5.6.2 Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung	132
5.6.2.1 Transformation mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	132
5.6.2.2 Transformation mit vorheriger Rehydratisierung der Lyophilisate	132
5.6.2.3 Transformation mit separierten Komponenten oder Enzymlösungen.....	132
5.6.2.4 Inkubation von (+)-Valencen	133
5.6.2.5 Blindwerte.....	133
5.6.2.6 Rehydratisierung von Lyophilisat	133
5.6.2.7 Hitzeinaktivierung	133
5.6.2.8 Separation des Lyophilisats durch Zentrifugation	133
5.6.2.9 Rekombination von separiertem Lyophilisat	133
5.6.2.10 Rekombination von Enzymlösungen mit Rückstand.....	134
5.6.2.11 Supplementierung von Konzentraten mit Spurenelementen	134
5.6.2.12 Ultrafiltration	134
5.6.2.13 Gewinnung von Filtrat	134
5.6.2.14 Anreicherung von Sauerstoff.....	134
5.6.2.15 Abreicherung von Sauerstoff.....	134
5.6.3 Transformation von (+)-Valencen: Optimierung	135
5.6.3.1 Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	135
5.6.3.2 Blindwerte.....	135
5.7 Probenvorbereitungen	135
5.7.1 Kapillargaschromatographie (GC).....	135
5.7.1.1 Extraktion der Submerskulturen und Biokonzentrate (Transformation von α -Pinen) .	135
5.7.1.2 Extraktion der Lyophilisate (Transformation von α -Pinen).....	135
5.7.1.3 Extraktion der Blindwerte (Inkubation von α -Pinen).....	136
5.7.1.4 Mikroextraktion der Lyophilisate (Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung).....	136
5.7.1.5 Mikroextraktion der Lyophilisate (Transformation von (+)-Valencen: Optimierung)....	136
5.7.2 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	136
5.8 Enzymreinigung über mehrere chromatographische Stufen	136
5.8.1 Dreistufenreinigung mittels FPLC	136
5.8.2 Dreistufenreinigung mittels FPLC für SDS-PAGE	137
5.8.3 Dreistufenreinigung mittels FPLC für IEF	137
5.9 Weitere Methoden	138
5.9.1 UV/VIS-Spektroskopie.....	138
5.9.2 Reduktion von Valencenhydroperoxiden.....	138
5.9.3 Vakuumdestillation von (+)-Valencen	138
5.9.4 Proteinpräzipitation.....	138
5.9.4.1 Präzipitation (1,5 mL separierter Überstand)	138
5.9.4.2 Präzipitation (15 mL separierter Überstand)	139

5.10 Chromatographie	139
5.10.1 Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (LC)	139
5.10.2 Kapillargaschromatographie (HRGC)	139
5.10.2.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)	139
5.10.2.2 HRGC mit Kaltaufgabesystem und Flammenionisationsdetektor (FID)	140
5.10.2.3 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)	140
5.10.2.4 Berechnung der Kováts-Indizes	140
5.10.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	141
5.10.4 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	141
5.10.4.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)	141
5.10.4.2 Gelfiltrationschromatographie (GF)	143
5.11 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	143
5.11.1 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen	143
5.11.2 SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen	145
5.11.3 Coomassiefärbung	145
5.11.4 Silberfärbung	145
5.11.5 Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung)	146
5.12 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	147
5.12.1 Coomassiefärbung	147
5.12.2 Silberfärbung	147
5.12.3 Aktivitätsfärbung für Laccasen	147
5.13 Entsorgungshinweise	147
5.13.1 Biologisches Material	147
5.13.2 Lösungsmittel und Chemikalien	148
6 Literaturverzeichnis	149
7 Anhang	163
Lebenslauf	166

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASB-C8Ø	4-n-Octylbenzylamidopropyldimethylammoniumsulfobetain
BGBI	Bundesgesetzblatt
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BIS-TRIS	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCA	<i>Cystoderma carcharias</i>
CSTR	<i>Cyathus striatus</i>
CV	Säulenvolumen
d	Tage
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DEAE	Diethylaminoethyl
DHBT	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
DMOP	2,6-Dimethoxyphenol
DP-3	Summenparameter Trisaccharid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Erwartungswert („ <i>expectation value</i> “)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
ESI	„ <i>electro spray ionisation</i> “
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FF	„ <i>fast flow</i> “
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
GC	Gaschromatographie
GF	Gelfiltration
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGC	hochauflösende Gaschromatographie („ <i>high resolution gas chromatography</i> “)
IEX	Ionenaustauschchromatographie
KAS	Kaltaufgabesystem
KI	Retentionsindex nach Kováts
LC	Flüssigkeitschromatographie („ <i>liquid chromatography</i> “)
MOPS	4-[N-Morpholino]butansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MSC	<i>Marasmius scorodoni</i>
MWCO	Molekulargewichtsgrenze („ <i>molecular weight cut off</i> “)
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
NDGA	Nordihydroguajarsäure
NL	Nährlösung
NL-G ₁₅	modifizierte Standardnährlösung mit 15 g L ⁻¹ Glucose
NL-M	modifizierte Standardnährlösung mit Ersatz der Glucose durch Melasse
NL-MA	modifizierte Standardnährlösung mit Ersatz der Glucose durch Melasse und Ersatz des L-Asparagins durch Ammoniumnitrat
NMR	Kernspinresonanz („ <i>nuclear magnetic resonance</i> “)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBO	Piperonylbutoxid
PET	Polyethylenterephthalat
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
redest.	redestilliert

Abkürzung	Bedeutung
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNL-H	Standardnährlösung mit Hefeextrakt
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVE	<i>Trametes versicolor</i>
U	Enzymeinheit („ <i>units</i> “)
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
Vh	Voltstunden
w/v	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
WAG	Landwirtschaftliche Universität, Wageningen, NL

1 Einleitung

Bereits 3.000 Jahre vor Christus fanden biotechnologisch hergestellte Produkte schriftliche Erwähnung: „»Iß Brot, Engidu, die Zierde des Lebens! Trink Wein, Engidu, die Sitte des Landes!« Da aß Engidu Brot, bis er satt war, Da trank er Wein, sieben Becher.“ (Ranke 2006). Schon bei den hier genannten Lebensmitteln Brot und Wein wurden Hefen, also Pilze, als Biokatalysatoren eingesetzt. Nicht nur biotechnologisch gewonnene Nahrungsmittel, sondern auch Geruchsstoffe spielen in der Geschichte der Menschheit eine wichtige Rolle. Weihrauch und Myrrhe gehören zu den ältesten bekannten Duftstoffen und wurden schon in babylonischen Tempeln den Göttern gewidmet (Ohloff 1994). Auch Gewürze und Gewürzextrakte werden seit Urzeiten zur Aromatisierung von Speisen verwendet. In Europa zeugen davon zum Beispiel Funde aus neolithischen Gräbern und Höhlen. Heutzutage werden Duft- und Aromastoffe in einer Vielzahl von Produkten eingesetzt: Parfüms, Kosmetika, Wasch- und Reinigungsmittel, Arzneimittel sowie viele Lebensmittel sind ohne einen Zusatz von Geruchs- oder Geschmacksstoffen kaum noch vorstellbar. Nach Berechnungen des Deutschen Verbandes der Aromenindustrie e. V. werden allein in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr und Person 137 kg aromatisierte Lebensmittel verzehrt. Bei einer angenommenen Gesamtbevölkerung (BRD) von 81 Millionen Menschen ergibt sich daraus ein jährlicher Verzehr von 11.100.000 t. Von den darin enthaltenen Aromastoffen¹ (1.220 t) sind über 70% natürlichen Ursprungs – mit steigender Tendenz². Aufgrund knapper Ressourcen und der oft unwirtschaftlichen Gewinnung dieser Aromen resultiert daraus ein Bedarf an sogenannten „Bioflavours“. Darunter werden biotechnologisch gewonnene, natürliche Aromastoffe³ verstanden, die zum Beispiel durch Oxyfunktionalisierung von Terpenen synthetisiert werden können.

1.1 Vorkommen und Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen

Terpene⁴ stellen mit bisher über 23.000 bekannten Verbindungen die größte Gruppe natürlicher Substanzen dar (Sacchettini und Poulter 1997; Dewick 2002). Sie sind hauptsächlich pflanzlicher und seltener tierischer Herkunft. Die Biosynthese von Terpenen ist

¹ Aromen sind „Erzeugnisse [...], die dazu bestimmt sind, Lebensmitteln einen besonderen Geruch oder Geschmack zu verleihen“ (Aromenverordnung, §1 Abs. 1).

² <http://www.aromenhaus.de/fakten/verzehr.html>; zuletzt aktualisiert 29.06.2001; Abruf der Seite 06.04.2007

³ Natürliche Aromastoffe sind „chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische [...], enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft“ (Aromenverordnung, Anlage 1, Punkt 1 zu § 1 Abs. 1 und § 4 Abs. 1 Nr. 3a).

⁴ Unter Terpenen werden in dieser Arbeit die reinen Kohlenwasserstoffe verstanden.

beträchtlich. Geschätzt wird, dass jährlich allein 127×10^6 t Kohlenstoff in Form flüchtiger Monoterpene von Bäumen emittiert werden (Guenther *et al.* 1995). Das Grundgerüst der Terpene $[(C_5H_8)_n]$ ist von Isopreneinheiten abgeleitet. Durch Wiederholungen des Isoprengrundgerüsts, Cyclisierungen und Umlagerungen entsteht die enorme Diversität dieser Verbindungsklasse. Zu der Gruppe der Terpene zählen unter anderem die aus zwei Isopreneinheiten aufgebauten Monoterpene (C10) und die aus drei Isopreneinheiten aufgebauten Sesquiterpene (C15), zu deren Biosynthese fast alle höheren Lebewesen befähigt sind. Terpene mit vier Isopreneinheiten (C20) heißen Diterpene, mit sechs (C30) Triterpene und Verbindungen mit acht Isopreneinheiten (C40) werden Tetraterpene genannt. Terpene mit mehr als 40 Kohlenstoffatomen werden als Polyterpene bezeichnet und können aus bis zu 100.000 Isopreneinheiten aufgebaut sein (McGarvey und Croteau 1995). Isopren tritt jedoch als Vorstufe der Terpenbiosynthese nicht direkt in Erscheinung. Die Biosynthese verläuft über den sogenannten Mevalonsäure-Weg mit Isopentenylidiphosphat, beziehungsweise dessen Isomer (3,3-Dimethylallyl)diphosphat als Grundbausteine (Lynen 1967). Alternativ ist die Biosynthese auch über Carbonylphosphat (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat), einen Mevalonat-unabhängigen Mechanismus, möglich (Rohmer 1999). Das bicyclische Monoterpen α -Pinen (**11**, Abbildung 1.1) wird aus Geranylphosphat (C10) über das α -Terpinyl- und Pinylyl-Kation gebildet (Croteau *et al.* 1989). Die Biosynthese von (+)-Valencen verläuft über Farnesylidiphosphat (C15). Das entsprechende Gen wurde kürzlich isoliert und heterolog überexprimiert (Sharon-Asa *et al.* 2003).

1.2 Terpenoide

Durch Oxyfunktionalisierung von Terpenen werden Terpenoide erhalten. Mono- und Sesquiterpenoide sind häufig die Schlüsselaromastoffe pflanzlicher etherischer Öle und wichtige Aromastoffe für Lebensmittel, Parfüms und andere Kosmetika. Dabei zeigen vor allem die einfach oxidierten Verbindungen eine große Vielfalt an Geruchseindrücken, wohingegen die reinen Terpenkohlenwasserstoffe eher unauffällige, weniger bedeutende Geruchsqualitäten aufweisen (Ohloff 1994).

Beide Stereoisomere des Monoterpens α -Pinen riechen herb und terpenähnlich, wobei (+)- α -Pinen eine leicht minzige Note aufweist, (-)- α -Pinen hingegen nach Nadelbäumen riecht (van der Werf *et al.* 1997). Durch mikrobielle Oxidation von α -Pinen sind eine Vielzahl vor allem sensorisch interessanter Verbindungen zugänglich. Bis auf die Dirole besitzen alle in Abbildung 1.1 gezeigten Produkte charakteristische sensorische Eigenschaften und sind direkt oder in Form ihrer Derivate wichtige Aroma- und Riechstoffe (Bauer *et al.* 2001). Die allylische Oxidation von α -Pinen führt unter anderem zu Verbenol (**10**), welches zu Verbenon (**9**) weiter oxidiert werden kann. (*E*)-Verbenol kommt unter anderem im Weihrauchbaum (*Boswellia sacra*) vor. Verbenon zeigt eine minzig-mentholische Note und wird als hochpreisiger natürlicher Duft- und Aromastoff gehandelt. Beide Verbindungen stellen häufig die Haupttransformationsprodukte der Biotransformation von α -Pinen dar (2.1, 3.3).

Bei Myrtenol (**15**) und Myrtenal (**14**) handelt es sich um zwei weitere mögliche Transformationsprodukte von α -Pinen, die durch allylische Oxidation gebildet werden. Myrtenal wird als würzig mit süß-zimtger Note beschrieben. (*E*)-Pinocarveol wird unter anderem in Eukalyptusölen (*Eucalyptus* sp.) gefunden und Carveole (**6**) werden in Minz- und Kümmelaromen verwendet.

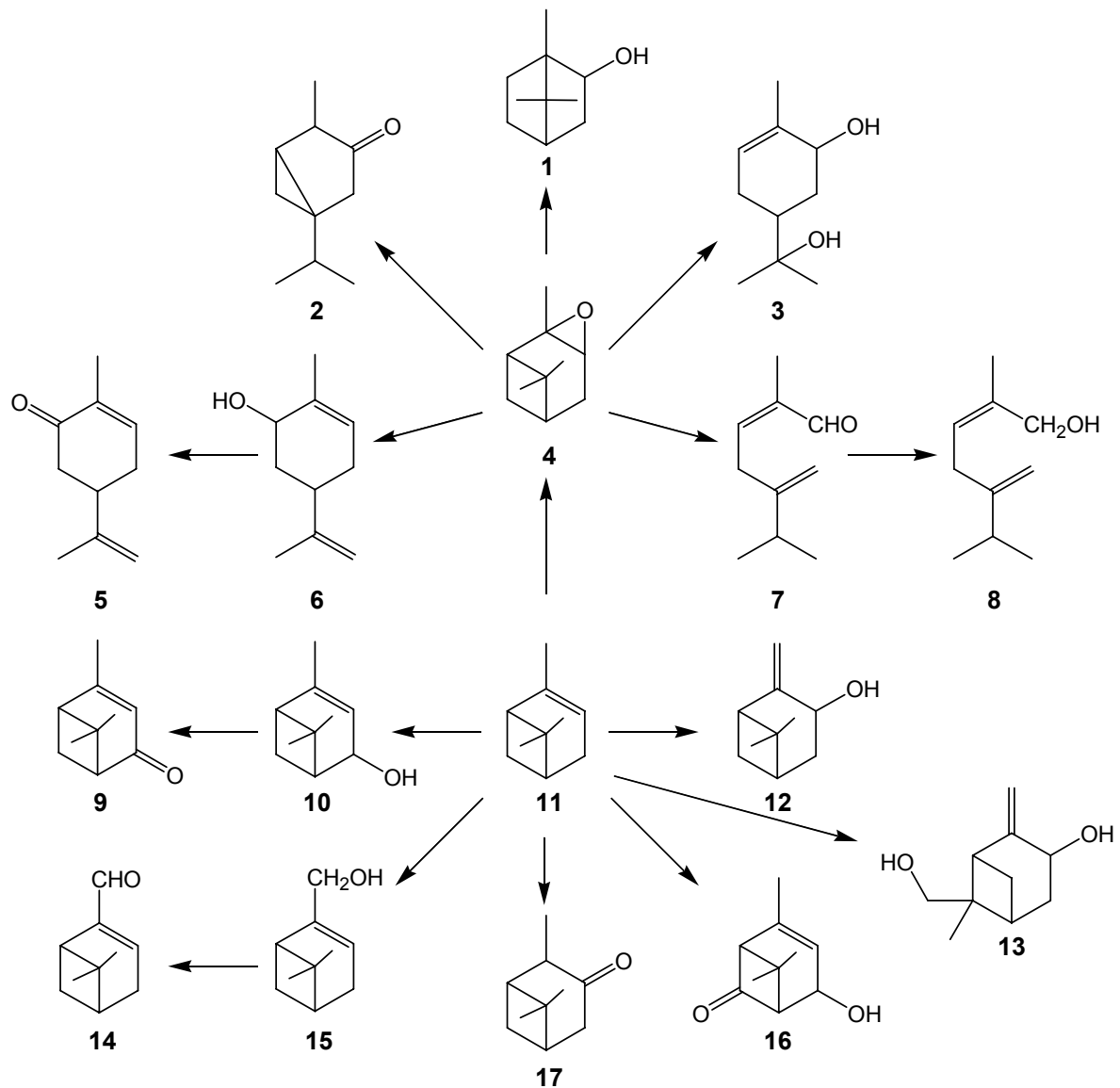


Abbildung 1.1: Oxidationsprodukte von α -Pinen (modifiziert nach Busmann und Berger 1994; Trudgill 1994; Berger et al. 2000; Farooq et al. 2002);
 Borneol (**1**), Thujon (**2**), Sobrerol (**3**), α -Pinenepoxid (**4**), Carvon (**5**), Carveol (**6**), Isonovalal (**7**),
 Isonovalol (**8**), Verbenon (**9**), Verbenol (**10**), α -Pinen (**11**), Pinocarveol (**12**),
 9-Hydroxypinocarveol (**13**), Myrtenal (**14**), Myrtenol (**15**), 4-Hydroxy- α -pinen-6-on (**16**),
 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]-heptan-3-on (**17**)

Das bicyclische Sesquiterpen Valencen (**18**, Abbildung 1.2) wurde 1965 von Hunter und Brogden erstmals als Bestandteil von Citrusölen erwähnt. Nach Limonen und Myrcen ist Valencen einer der Hauptbestandteile von Essenzölen der Valencia-Orangen (*Citrus sinensis*). Im Öl überreifer Früchte, welches eine der besten natürlichen Quellen darstellt, wurden bis zu 1,5% Valencen nachgewiesen (Moshonas und Shaw 1979). Das Vorkommen von Valencen in Orangen- und Grapefruitölen unterscheidet diese von den meisten übrigen Citrusölen. Jedoch identifizierten Njoroge *et al.* (2006) Valencen als Minorkomponente auch in der Sesquiterpenfraktion von Mandarinenschalen (*Citrus reticulata*). Valencen ist darüber hinaus als ein Bestandteil von Olivenölen (*Olea europaea*) nachgewiesen worden (Flamini *et al.* 2003). Der Geruch von (+)-Valencen wird als grün und ölig beschrieben.

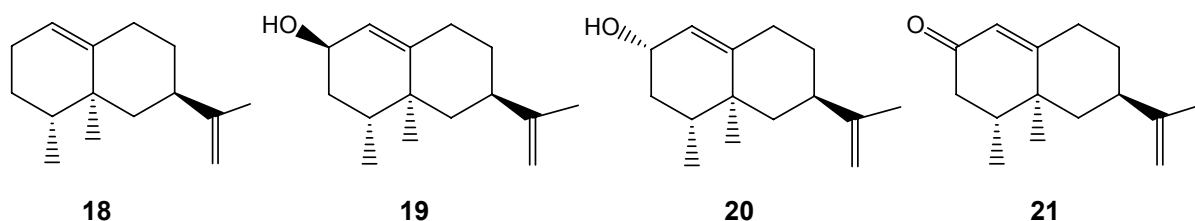


Abbildung 1.2: (+)-Valencen (**18**), α -Nootkatol (**19**), β -Nootkatol (**20**) und (+)-Nootkaton (**21**)

Aus (+)-Valencen kann durch Oxyfunktionalisierung das Sesquiterpen-Keton (+)-Nootkaton (**21**) gebildet werden. Nootkaton wurde 1962 erstmals von Erdtman und Hirose aus dem Kernholz der Nootka-Scheinzypresse (*Chamaecyparis nootkatensis*) isoliert. (+)-Nootkaton ist neben *p*-Menth-1-en-8-thiol Träger des typischen Grapefruitgeruchs (Wong 1989), schmeckt bitter und besitzt einen niedrigen Geruchsschwellenwert von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ Wasser (Haring *et al.* 1972). Es kommt als typischer Aromastoff vor allem in der Schale und im Saft von Grapefruits (*Citrus paradisi*) (MacLeod und Buiges 1964) und Pomelos (*Citrus grandis*) (Sawamura und Kuriyama 1988; Ortuño *et al.* 1995) vor. In den Schalenölen anderer Citrusfrüchte kann (+)-Nootkaton nur in Spuren nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde (+)-Nootkaton auch im etherischen Öl des Vetiver Grases (*Vetiveria zizanioides*) identifiziert (Andersen 1970). Die Einsatzgebiete von (+)-Nootkaton sind vielfältig. In jüngster Zeit werden zum Beispiel von der Lebensmittelindustrie immer häufiger Grapefruitaromen in Getränken und anderen Lebensmitteln verwendet. Darüber hinaus ist (+)-Nootkaton für die Parfümindustrie interessant, da neben Bergamotte-, Zitronen- und Orangenölen vor allem Grapefruitakkorde einer Duftkomposition Frische und Entfaltungskraft verleihen. Allerdings ist (+)-Nootkaton trotz seiner hohen Halbdauer oft zu teuer (Kraft *et al.* 2000). Das synthetische Isomer (-)-Nootkaton weist im Gegensatz zu (+)-Nootkaton nur einen holzig-würzigen Geruch auf, und der Geruchsschwellenwert ist in wässrigen Medien um den Faktor 1.000 höher (Haring *et al.* 1972; Fisher und Scott 1997).

Neben (+)-Nootkaton können aus (+)-Valencen durch Hydroxylierung die beiden stereoisomeren Sesquiterpen-Alkohole α - und β -Nootkatol (**19**, **20**) dargestellt werden. Nootkatol wurde erstmals von Shoji *et al.* (1984) aus *Alpinia oxyphylla* isoliert und beschrieben. Nootkatole wurden außerdem in weiteren Pflanzen, zum Beispiel Grapefruits (del Río *et al.* 1992) und Scheinzypressen (Kelsey *et al.* 2005), identifiziert. α - und β -Nootkatol weisen einen deutlich höheren Geruchsschwellenwert als (+)-Nootkaton auf, wobei α -Nootkatol säuerlich, nach Grapefruit riecht, β -Nootkatol hingegen leicht süßlich (Kaspera 2004).

Die Einsatzgebiete von Terpenoiden beschränken sich bei weitem nicht nur auf die Verwendung als Aroma- und Duftstoffe. So wurde der Einsatz zur Therapie diverser Krankheiten – zum Beispiel Krebs (Crowell 1999) – diskutiert und antimikrobielle Eigenschaften beschrieben (Sikkema *et al.* 1995). Ebenso sind neuropharmakologische Wirkungen bekannt: Carvon (**5**) und (+)-Nootkaton wirken beispielsweise als Acetylcholinesterasehemmer (Miyazawa *et al.* 1997; Miyazawa *et al.* 2001). Die Rolle von (+)-Nootkaton wurde auch bei der Verbesserung der Wirkung bestimmter Medikamente bei gleichzeitiger Gabe von Grapefruitsaft diskutiert (Tassaneeyakul *et al.* 2000).

Daneben werden Terpenoide als Repellentien gegen Insekten eingesetzt. Die Mehrzahl der insektizid wirkenden Terpenoide gehört zu den Monoterpenoiden (Zhu *et al.* 2003). Auch den Hauptprodukten der Biotransformation von α -Pinen, Verbenol und Verbenon, wird aufgrund ihrer Wirkung als natürliche Insektenpheromone ein hohes Anwendungspotenzial als umweltverträgliche Pestizide nachgesagt. Für das etherische Öl des Vetiver Grases wurde hingegen gezeigt, dass das Sesquiterpenoid (+)-Nootkaton für dessen insektizide Wirkung verantwortlich ist (Zhu *et al.* 2001). Terpenoide wie Verbenol und Verbenon dienen darüber hinaus als wertvolle Ausgangssubstanzen zur Synthese einer Vielzahl hoch interessanter Verbindungen (Trudgill 1994). Schließlich können Terpene auch als Ersatz für chlorierte Lösungsmittel zum Beispiel bei der Reinigung von elektronischen Komponenten und Kabeln in der Metall verarbeitenden Industrie erfolgreich eingesetzt werden (Brown *et al.* 1992).

1.3 Biotechnologische Transformation von Terpenen

Terpenoide kommen in der Natur hauptsächlich in komplex zusammengesetzten etherischen Ölen vor. Deren Anteil in Pflanzen beträgt oft nur zwischen $\leq 0,1\%$ und 5% (Schrader und Berger 2001). Aufgrund der Beliebtheit als Aromastoffe und neuer, erweiterter Anwendungsgebiete (1.2) besteht in den letzten Jahren aber ein erhöhter Bedarf an Terpenoiden auf dem Weltmarkt. Ein preiswerter, natürlicher Biosyntheseweg ist wünschenswert, da die herkömmliche Extraktion aus natürlichen Quellen häufig kostenintensiv und somit unwirtschaftlich ist.

Um den Bedarf an gewünschten Terpenoiden decken zu können, werden deshalb neben der Extraktion aus natürlichen Quellen auch Chemosynthesen eingesetzt.⁵ Die Industrie hat nun ein gesteigertes Interesse daran, diese chemischen Synthesen durch umweltschonende biotechnologische Prozesse zu ersetzen, benötigt jedoch preisgünstige, in großen Mengen verfügbare Substrate.

Durch Neben- und Abfallströme insbesondere der Holz- und Lebensmittelindustrie stehen nahezu unlimitierte Substratmengen zur Verfügung, welche biokatalytisch oxidiert werden können. Zum Beispiel fallen im Rahmen der Kiefernholzproduktion jährlich etwa 160.000 t α -Pinen als Nebenprodukt an. Davon werden bisher aber nur circa 25% zur chemischen Synthese von Aroma- und Duftstoffen eingesetzt, der überwiegende Rest geht als Lösungsmittel in die Lack- und Farbenindustrie (Ohloff 1994). Die Attraktivität des α -Pinsens als preiswertes, natürliches Ausgangsmaterial zur Synthese hochwertiger Verbindungen wurde früh erkannt und die mikrobielle Konversion und Degradation des Pinsens schon in den 60er Jahren untersucht (Bhattacharyya *et al.* 1960). Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich ausgehend von dem bei der Produktion von Orangensaft in großen Mengen anfallenden (+)-Valencen. Durch biotechnologische Prozesse ist es möglich, einen natürlichen Zugang zu (+)-Nootkaton zu eröffnen.

Die prinzipielle Eignung der Biokatalyse zur selektiven Oxyfunktionalisierung von Terpenen wurde mittlerweile mit einer Vielzahl mikrobieller Modelle belegt (Schrader und Berger 2001): Zur Transformation von Terpenen wurden bereits gereinigte Enzyme, Zellextrakte oder Ganzzellsysteme von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, Mikroalgen, filamentösen Pilzen und Pflanzen eingesetzt. Die isolierten Enzyme können entweder gelöst oder immobilisiert vorliegen (de Carvalho und da Fonseca 2006). Der Prozess der Enzymreinigung ist jedoch häufig kompliziert und zeitaufwändig. Ganzzellsysteme weisen diese Nachteile in der Regel nicht auf, und die Umsetzungen können sowohl durch vitale als auch durch nicht vitale Zellen katalysiert werden. Ein weiterer Vorteil der Ganzzellsysteme besteht darin, dass die Enzyme im Transformationssystem durch Zellwände beziehungsweise -membranen vor Scherkräften geschützt sind, und Cofaktoren bei vitalen Zellen zum Teil *in vivo* regeneriert werden können. Auch sind mehrere enzymkatalysierte Reaktionsschritte innerhalb desselben Transformationssystems möglich. Die Komplexität des Systems kann jedoch auch zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Die durch weiter gehende Metabolisierung entstehenden Produkte müssen dann zum Teil wieder aufwändig abgetrennt werden. Von den in den letzten zehn Jahren in der Literatur erwähnten Mikroorganismen zur Produktion und Biotransformation von Terpenen waren nahezu drei Viertel Bakterien (41%) und Pilze (33%) (de Carvalho und da Fonseca 2006).

⁵ Über 80% der weltweit eingesetzten Duft- und Aromastoffe, darunter eine Vielzahl von Terpenoiden, wurden bisher durch Chemosynthese gewonnen (Luckner 1990).

Filamentöse Pilze kommen aufgrund ihrer biologischen Funktion als Destruenten ubiquitär in der Natur vor und besetzen ökologische Nischen wie den Erdboden, lebende Pflanzen und organisches Material unterschiedlichster Art und Herkunft. Die Fähigkeit der Pilze, ihren Stoffwechsel auf wechselnde Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen einzustellen, basiert auf einem großen Arsenal an intra- und extrazellulären Enzymen. So produzieren zum Beispiel Weißfäulepilze wie *Trametes versicolor* eine Reihe von Cellulasen, Hemicellulasen, Mangan- und Lignin-Peroxidasen sowie Laccasen (Oviedo *et al.* 2003). Durch das Ausschleusen der Enzyme in die Umgebung werden meist Makromoleküle oxidativ aufgeschlossen, deren Abbauprodukte dann der Ernährung der heterotrophen Pilze dienen.

1.4 Zielsetzung

Aufgrund ihres vielfältigen Arsenal an Enzymen, der guten Anpassungsfähigkeit und des breiten Spektrums an gebildeten Sekundärstoffen sind Basidiomyceten besonders zur Transformation von Terpenen geeignet. Ein weiterer Vorteil von Basidiomyceten ist, dass zahlreiche Vertreter eine lange Anwendungshistorie als Speise- und Würzpilze sowie in der Volksmedizin aufweisen. Ausgewählte Basidiomyceten wurden daher in der vorliegenden Arbeit gezielt als Biokatalysatoren zur Oxidation von α -Pinen und (+)-Valencen eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit ist zweigeteilt. Der erste Teil beinhaltet ein Screening von ausgewählten Basidiomyceten zur Oxyfunktionalisierung von α -Pinen (2.1). Durch Identifizierung und Quantifizierung aromarelevanter Oxidationsprodukte sollten drei verschiedene Transformationsmethoden miteinander verglichen werden.

Aufbauend auf vorherigen Arbeiten (Kaspera 2004) sollte im zweiten Teil die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* näher charakterisiert und optimiert werden (2.2 - 2.6). Dabei wurden folgende Ziele angestrebt:

- verbessertes Verständnis des Transformationssystems,
- Lokalisierung der Enzymaktivität und Entwicklung einer Reinigungsstrategie,
- Identifizierung des an der Reaktion beteiligten Enzyms,
- Optimierung des Kulturmediums sowie weiterer Transformationsparameter.

2 Ergebnisse

2.1 Biotransformation des Monoterpens α -Pinen

2.1.1 Experimentelles Design

Mit *Marasmius scorodoni*, *Cystoderma carcharias*, *Cyathus striatus* und *Trametes versicolor* wurden vier oxidasestarke Basidiomyceten bezüglich ihres Potenzials zur Oxyfunktionalisierung von α -Pinen untersucht (Abbildung 2.1). Die ausgesuchten Mikroorganismen sind alle für ihre Fähigkeit, Terpene zu transformieren, bekannt (Veddeler 2004; Onken und Berger 1999). So wurde *Cystoderma carcharias* zum Beispiel erfolgreich zur Biotransformation des Monoterpen-Alkohols Citronellol eingesetzt, wobei erstmals die mikrobiologische Bildung von Rosenoxid beschrieben wurde (Onken und Berger 1999).



Abbildung 2.1: Fruchtkörper von *Marasmius scorodoni* (A), *Cystoderma carcharias* (B), *Cyathus striatus* (C) und *Trametes versicolor* (D) (Fotos von Georg Müller, www.pilzepilze.de)

Im Screening wurde die Bildung der identifizierten Transformationsprodukte (2.1.2, Abbildung 2.3) (*E*-Carveol (**25**), Myrtenol (**15**), (*Z*)-Verbenol (**23**), (*E*-Pinocarveol (**22**), Myrtenal (**14**), (*E*-Verbenol (**24**) und Verbenon (**9**) anhand von drei verschiedenen Transformationssystemen miteinander verglichen: Zum einen die klassische Submerskultur, zum anderen eine Methode mit erhöhter Biofeuchtmasse (Biokonzentrat) sowie die Transformation mit lyophilisiertem Pilzmyzel (Abbildung 2.2).

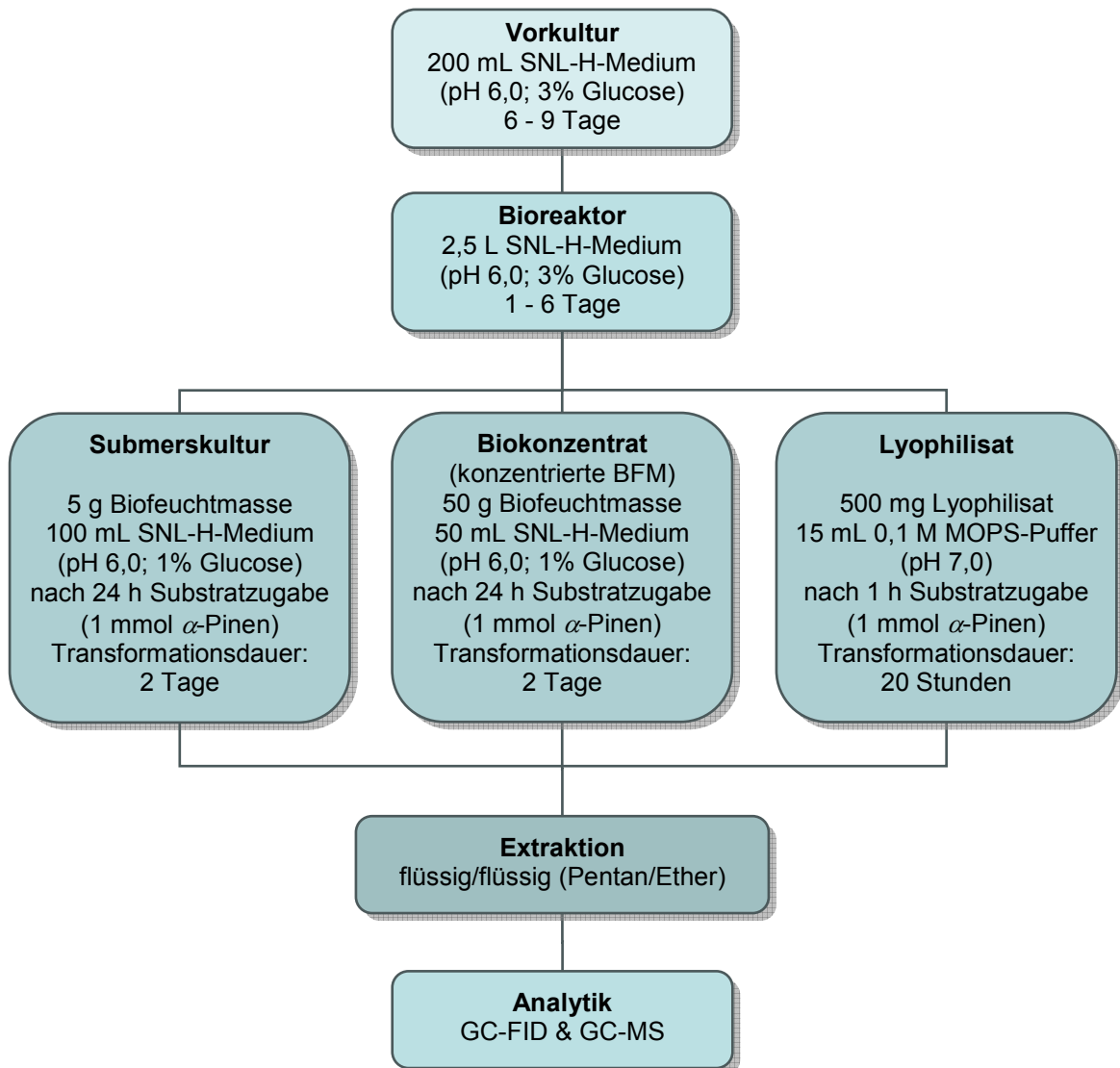


Abbildung 2.2: Experimentelles Design zur Biotransformation von α -Pinen durch Basidiomyceten;
BFM = Biofeuchtmasse

Die Anzucht der benötigten Biomasse erfolgte in einem 3,5-L-Rührkesselreaktor (5.4.3.4), um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Transformationssysteme untereinander zu ermöglichen. Dazu wurde der Reaktor mit einer zuvor homogenisierten, je nach Organismus 6 bis 9 Tage alten Vorkultur inokuliert. Nach 1 bis 6 Tagen wurde die Biomasse geerntet. Die Dauer der Kultivierung wurde abhängig vom jeweiligen Organismus visuell bestimmt. Die erhaltene Biofeuchtmasse wurde anschließend direkt zur Transformation in Submerskultur und als Biokonzentrat (5.6.1.1) eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Teil des Pilzmyzels gefriergetrocknet und das Lyophilisat für die Biotransformation (5.6.1.2) verwendet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Dauer der Kultivierungen für Vorkultur (VK) und Bioreaktor (BR) sowie Ausbeuten an Biofeuchtmasse (BFM) und an Lyophilisat bezogen auf die eingesetzte Biofeuchtmasse (Lyo)

Organismus	Kulturdauer VK / d	Kulturdauer BR / d	BFM / g	Lyo / %
<i>M. scorodoni</i>	7	4	216,8	4,2
<i>C. carcharias</i>	6	1	201,3	4,2
<i>C. striatus</i>	9	6	246,8	4,6
<i>T. versicolor</i>	6	4	270,1	4,0

2.1.2 Identifizierung der Transformationsprodukte

Die Identifizierung der Transformationsprodukte (Tabelle 2.2) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion gaschromatographisch mittels GC-FID (Abbildung 2.3) und GC-MS auf polaren Trennphasen (5.10.2.1, 5.10.2.3). Durch Vergleich der Massenspektren der einzelnen Probenpeaks mit den Spektren von Referenzsubstanzen sowie einen Abgleich der Kováts-Indizes (5.10.2.4) wurde auf bestimmte Substanzen geschlossen. (*E*)-Verbenol lag nicht als Referenzsubstanz vor, wurde aber nach semipräparativer Gaschromatographie mittels NMR-Spektroskopie identifiziert (Rinne 2007).

Tabelle 2.2: Identifizierte Transformationsprodukte von α -Pinen; MS = Referenz-Massenspektrum; KI = Kováts-Index, Ref = Referenzsubstanz, Lit = Literatur, ^a = Schieberle und Grosch 1989, ^b = Chung *et al.* 1993, ^c = Lee *et al.* 2005, ^d = Rinne 2007

Substanz	Identifizierung	KI (CW 20 M)	KI Ref (CW 20 M)	KI Lit (CW 20 M)
Myrtenal	MS, KI, Ref	1584	1585	1596 ^a
(<i>E</i>)-Pinocarveol	MS, KI, Ref	1626	1627	1632 ^b
(<i>Z</i>)-Verbenol	MS, KI, Ref	1634	1637	–
(<i>E</i>)-Verbenol	MS, KI, NMR ^d	1660	–	1675 ^c
Verbenon	MS, KI, Ref	1663	1659	1695 ^c
Myrtenol	MS, KI, Ref	1768	1770	1789 ^c
(<i>E</i>)-Carveol	MS, KI, Ref	1816	1815	1833 ^c

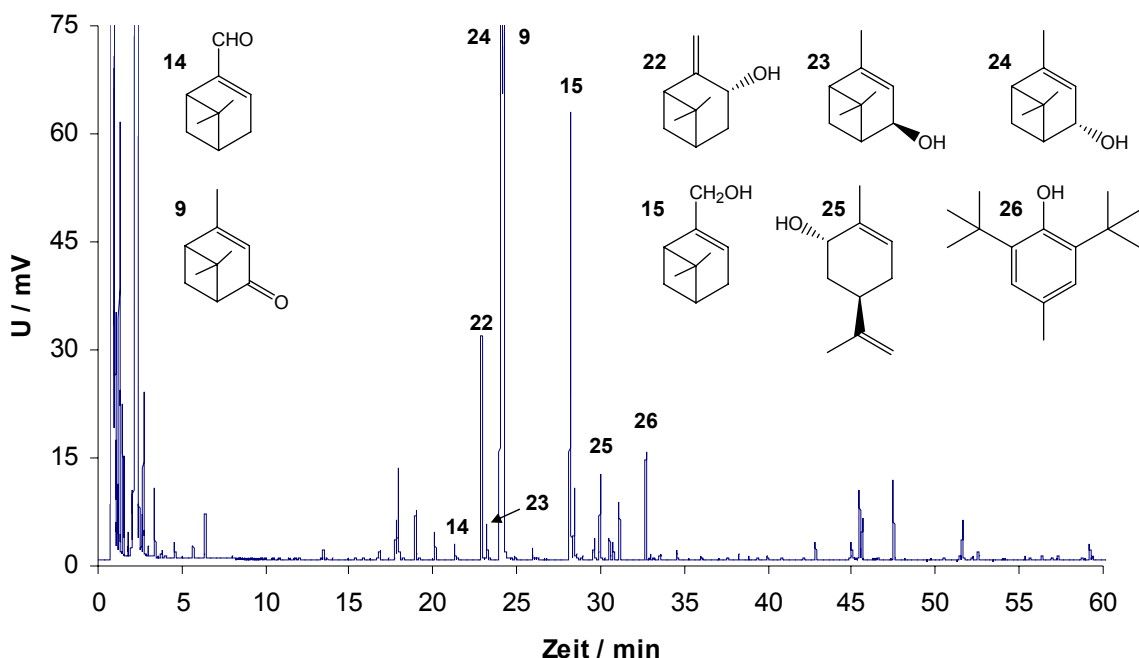


Abbildung 2.3: GC-Chromatogramm der Biotransformation von α -Pinen mit Submerskulturen von *Marasmius scorodionius*; Myrtenal (14), (*E*)-Pinocarveol (22), (*Z*)-Verbenol (23), (*E*)-Verbenol (24), Verbenon (9), Myrtenol (15), (*E*)-Carveol (25), BHT (26) (interner Standard)

2.1.3 Transformation mit Submerskulturen

Bei der Transformation von α -Pinen mit Submerskulturen (5.4.3.5) wurde 1 mmol α -Pinen zu 100 mL Kultur dosiert, für 48 Stunden transformiert (5.6.1.1) und anschließend extrahiert (5.7.1.1). Quantifiziert wurde mittels GC-FID (5.10.2.1) über den internen Standard BHT (**26**).

Als Hauptprodukte wurden bei allen vier Organismen (*E*)-Verbenol und Verbenon identifiziert (Abbildung 2.4). Die höchsten Gehalte wurden dabei mit *Cyathus striatus* und *Trametes versicolor* mit 15 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol und Verbenon in Summe erzielt. *Marasmius scorodonius* synthetisierte 14 mg L⁻¹, während *Cystoderma carcharias* mit 8 mg L⁻¹ deutlich weniger (*E*)-Verbenol und Verbenon bildete. Bei *C. carcharias* wurde im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Basidiomyceten keine Bildung von (*E*)-Pinocarveol und (*E*)-Carveol beobachtet. Abgesehen von (*E*)-Verbenol und Verbenon betragen die Gehalte der identifizierten Transformationsprodukte maximal 2 mg L⁻¹.

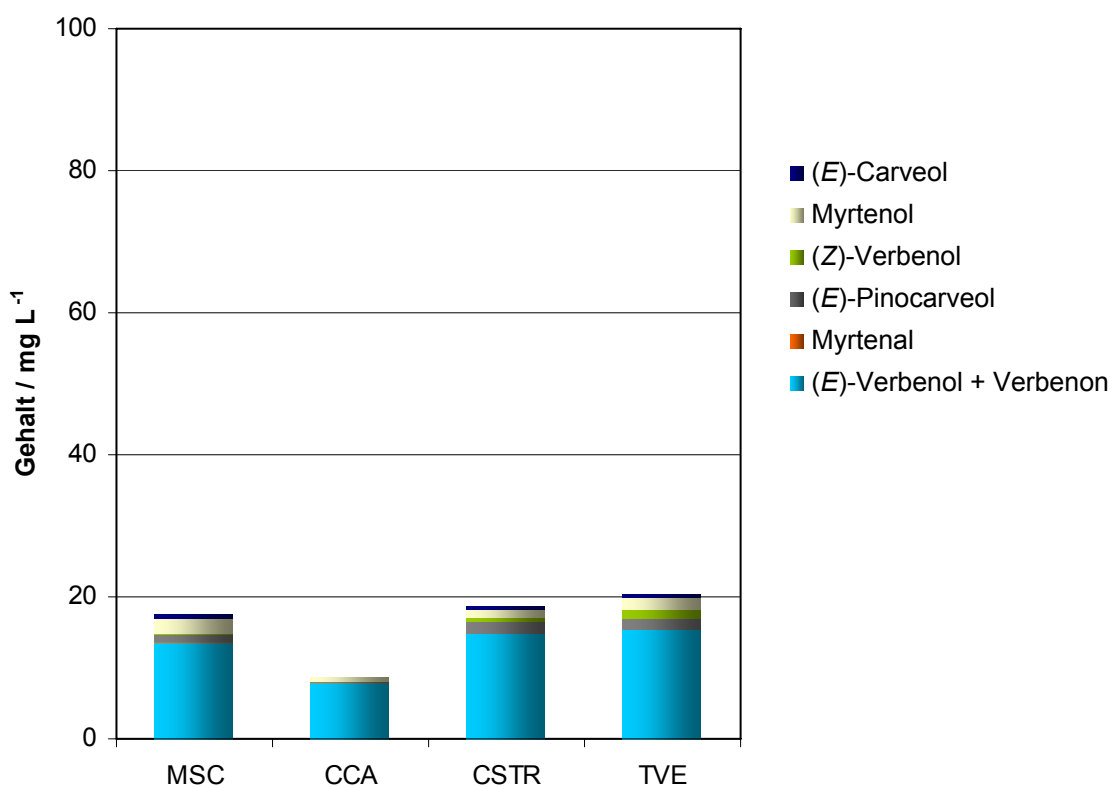


Abbildung 2.4: Biotransformation von α -Pinen mit Submerskulturen in SNL-H nach 48-stündiger Umsetzung; MSC = *Marasmius scorodonius*, CCA = *Cystoderma carcharias*, CSTR = *Cyathus striatus*, TVE = *Trametes versicolor*

2.1.4 Transformation mit konzentrierter Biofeuchtmasse

Bei der Transformation von α -Pinen mit konzentrierter Biofeuchtmasse (5.6.1.1) wurde 1 mmol α -Pinen zu 50 g Biofeuchtmasse in 50 mL Kulturmedium dosiert, für 48 Stunden transformiert (5.6.1.1) und anschließend extrahiert (5.7.1.1). Quantifiziert wurde mittels GC-FID (5.10.2.1) über den internen Standard BHT.

Als Hauptprodukte wurden bei allen vier Organismen (*E*)-Verbenol und Verbenon identifiziert (Abbildung 2.5). Die höchsten Gehalte wurden nach Transformation von α -Pinen mit *Trametes versicolor* quantifiziert (Σ 85 mg L⁻¹), jedoch mit stark schwankenden Ergebnissen der Doppelbestimmung (Anhang Tabelle 7.1). Die Gehalte nach Transformation mit *Marasmius scorodonius* und *Cyathus striatus* lagen mit 31 mg L⁻¹ und 29 mg L⁻¹ nahe beieinander. *Cystoderma carcharias* bildete mit 15 mg L⁻¹ deutlich weniger (*E*)-Verbenol und Verbenon. Auch wurde bei *C. carcharias* im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Basidiomyceten keine Bildung (*E*)-Pinocarveol und (*E*)-Carveol nachgewiesen. Die Gehalte an (*Z*)-Verbenol und Myrtenol waren mit je 0,2 mg L⁻¹ ebenfalls sehr gering. *M. scorodonius* erzielte mit 11 mg L⁻¹ Myrtenol einen deutlich höheren Gehalt als die anderen Kulturen. Myrtenal wurde in keinem der Transformationsansätze nachgewiesen. Alle weiteren identifizierten Produkte lagen im Bereich von 0,1 bis 5 mg L⁻¹.

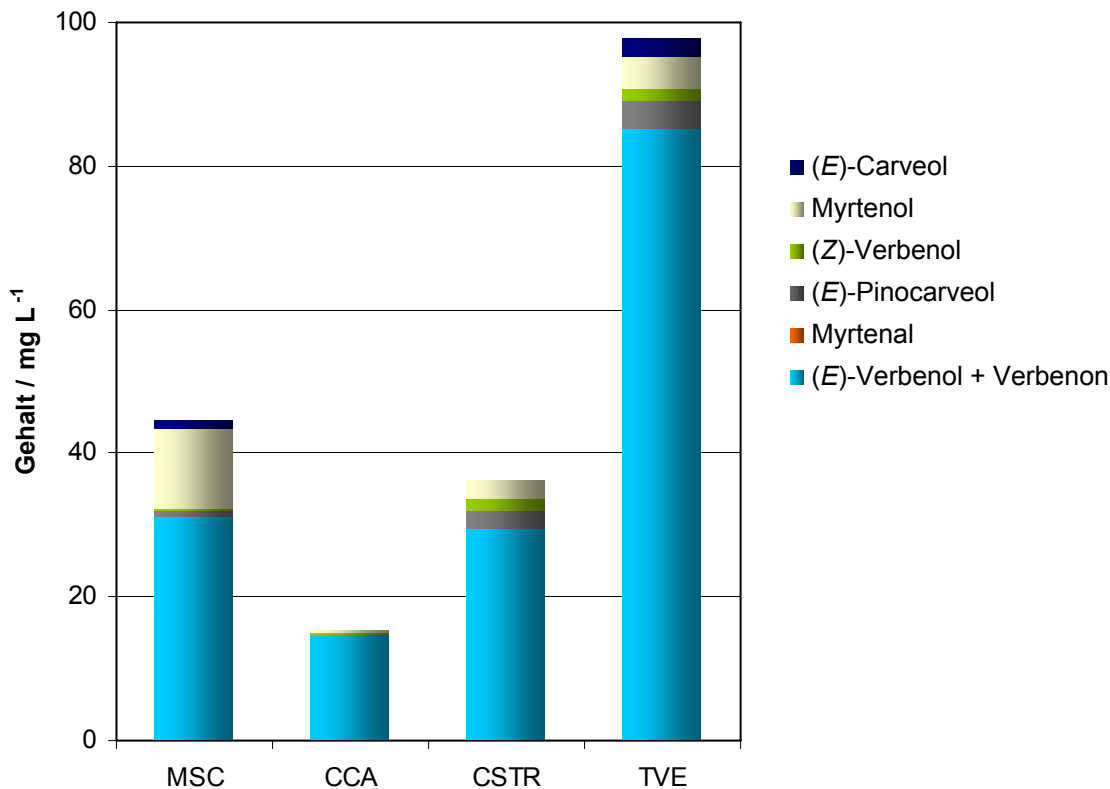


Abbildung 2.5: Biotransformation von α -Pinen mit konzentrierter Biofeuchtmasse in SNL-H nach 48-stündiger Umsetzung; MSC = *Marasmius scorodonius*, CCA = *Cystoderma carcharias*, CSTR = *Cyathus striatus*, TVE = *Trametes versicolor*

2.1.5 Blindwerte

Parallel zu den Transformationen mit Submerskultur und konzentrierten Biomassen wurden chemische Blindwerte mitgeführt. Dazu wurde 1 mmol α -Pinen zu 100 mL Standardnährmedium dosiert und für 48 Stunden transformiert (5.6.1.3). Anschließend wurde der Reaktionsansatz extrahiert (5.7.1.3). Quantifiziert wurde mittels GC-FID (5.10.2.1) über den internen Standard BHT.

Durch Autoxidation von α -Pinen wurden nur geringe Mengen der untersuchten Zielverbindungen gebildet (Abbildung 2.6). Als Hauptprodukte wurden 6 bis 8 mg L⁻¹ (*E*)-Verbenol und Verbenon in Summe nachgewiesen. Zusätzlich wurden Gehalte von maximal 0,8 mg L⁻¹ (*E*)-Pinocarveol und 1 mg L⁻¹ Myrtenol ermittelt. Alle anderen Autoxidationsprodukte erreichten Konzentrationen von höchstens 0,4 mg L⁻¹.

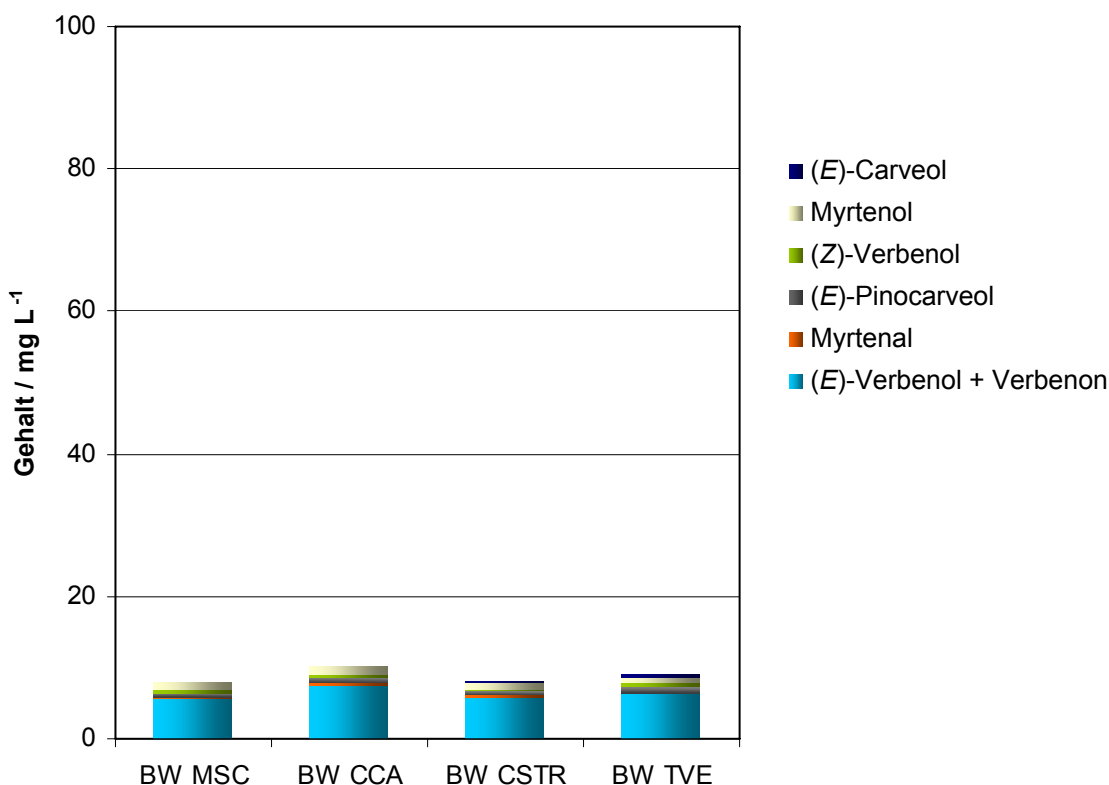


Abbildung 2.6: Blindwerte ohne Biofeuchtmasse für die Transformationen von α -Pinen mit Submerskulturen und Biokonzentraten in SNL-H nach 48-stündiger Umsetzung; BW = Blindwert, MSC = Marasmius scorodoni, CCA = Cystoderma carcharias, CSTR = Cyathus striatus, TVE = Trametes versicolor

2.1.6 Transformation mit Lyophilisaten

Bei der Transformation von α -Pinen mit Lyophilisaten (5.4.3.6) wurde 1 mmol α -Pinen zu 0,5 g Lyophilisat in 15 mL MOPS-Puffer dosiert, 20 Stunden transformiert (5.6.1.2) und anschließend extrahiert (5.7.1.2). Quantifiziert wurde mittels GC-FID (5.10.2.1) über den internen Standard BHT.

Als Hauptprodukte wurden (*E*)-Verbenol und Verbenon aus α -Pinen gebildet (*Marasmius scorodonius*: Σ 57 mg L⁻¹, *Cystoderma carcharias*: Σ 32 mg L⁻¹, *Cyathus striatus*: Σ 40 mg L⁻¹, *Trametes versicolor*: Σ 75 mg L⁻¹, Abbildung 2.7). Der Gehalt an Myrtenal betrug nach Transformation mit Lyophilisaten aus *M. scorodonius*, *C. striatus* und *T. versicolor* 2 mg L⁻¹, für *C. carcharias* 3 mg L⁻¹. Höher war die Konzentration an (*E*)-Pinocarveol (*M. scorodonius*: 9 mg L⁻¹, *C. striatus*: 6 mg L⁻¹ und *T. versicolor*: 8 mg L⁻¹). Ein ähnliches Bild ergab sich für Myrtenol: Der Gehalt betrug für die Transformation mit Lyophilisaten 6 mg L⁻¹, lediglich die Ausbeute für *C. carcharias* lag bei 4 mg L⁻¹. Die übrigen Transformationsprodukte erreichten Konzentrationen zwischen 1 und 3 mg L⁻¹.

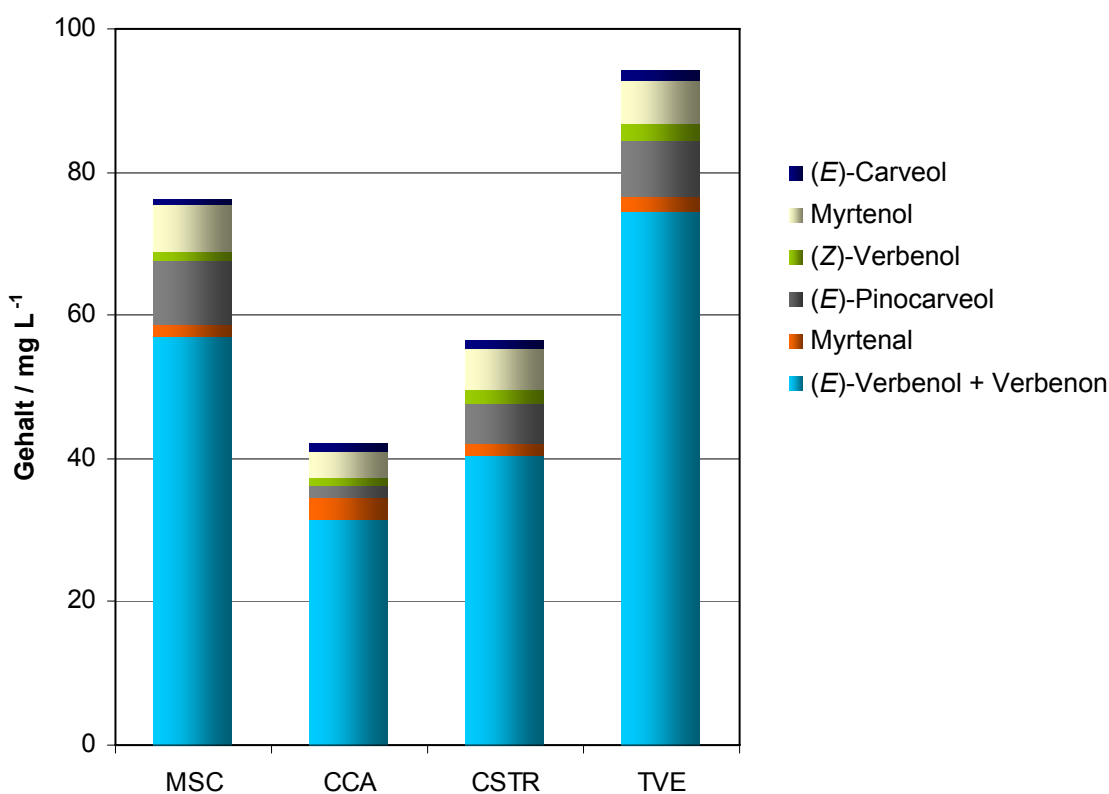


Abbildung 2.7: Biotransformation von α -Pinen mit Lyophilisaten in MOPS-Puffer nach 20-stündiger Umsetzung; MSC = *Marasmius scorodonius*, CCA = *Cystoderma carcharias*, CSTR = *Cyathus striatus*, TVE = *Trametes versicolor*

2.1.7 Blindwerte

Zusätzlich zu den unter 2.1.5 genannten Kontrollwerten wurden analog zu den Transformationen mit Lyophilisaten chemische Blindwerte mitgeführt. Dazu wurde 1 mmol α -Pinen zu 15 mL MOPS-Puffer dosiert, 20 Stunden inkubiert (5.6.1.3) und anschließend extrahiert (5.7.1.3). Quantifiziert wurde mittels GC-FID (5.10.2.1) über den internen Standard BHT.

Durch Autoxidation von α -Pinen wurden im Vergleich zu den Umsetzungen mit Lyophilisaten nur geringe Gehalte der untersuchten Zielverbindungen gebildet (Abbildung 2.8). Die Gehalte der autoxidativ in MOPS-Puffer gebildeten Zielprodukte waren im Vergleich zu den Kontrollwerten für die Submerskulturen und Biokonzentrate (2.1.5) ungefähr um den Faktor 2 höher. Als Hauptprodukte wurden erneut (*E*)-Verbenol und Verbenon nachgewiesen (Σ 11 bis 13 mg L⁻¹). Die Konzentration an (*E*)-Pinocarveol und Myrtenol betrug 2 mg L⁻¹. Die anderen Autoxidationsprodukte erreichten Konzentrationen von maximal 1 mg L⁻¹.

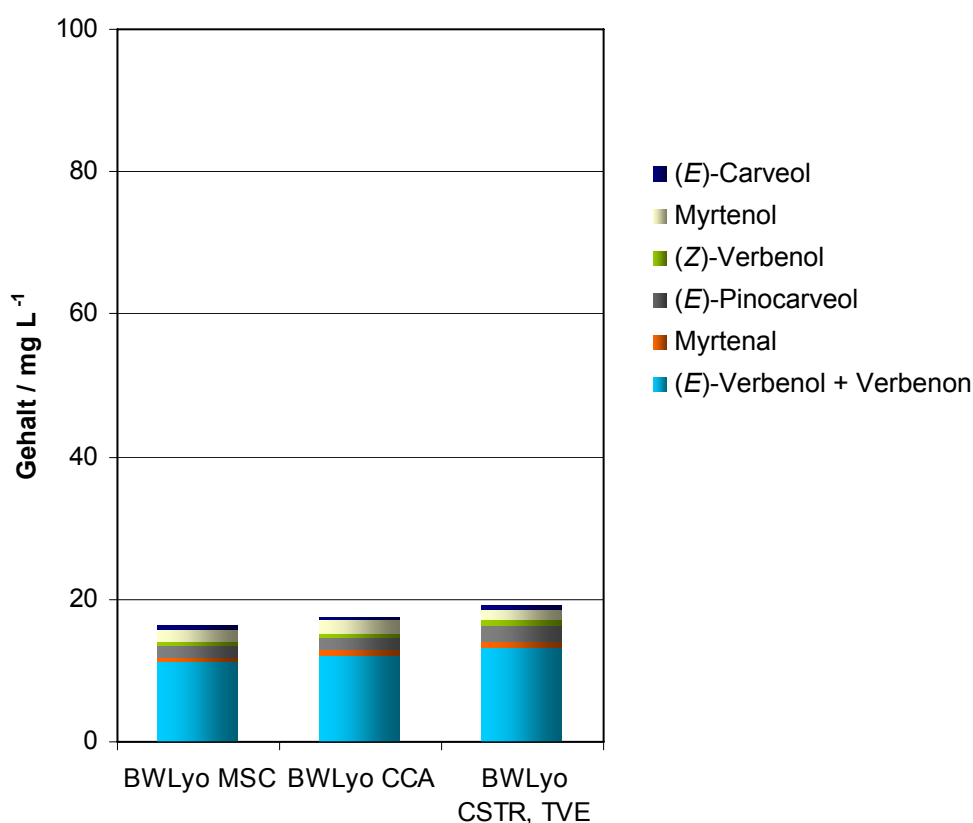


Abbildung 2.8: Blindwerte ohne Lyophilisate für die Transformationen von α -Pinen in MOPS-Puffer nach 20-stündiger Umsetzung; BWLy = Blindwert, MSC = Marasmius scorodionius, CCA = Cystoderma carcharias, CSTR = Cyathus striatus, TVE = Trametes versicolor

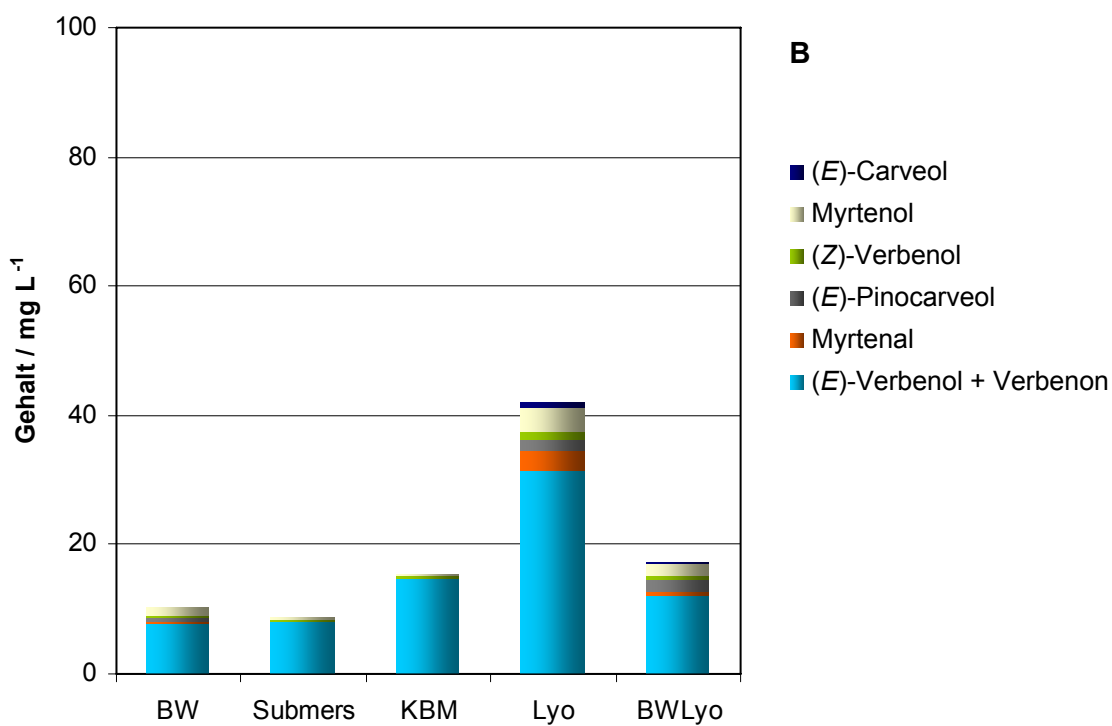
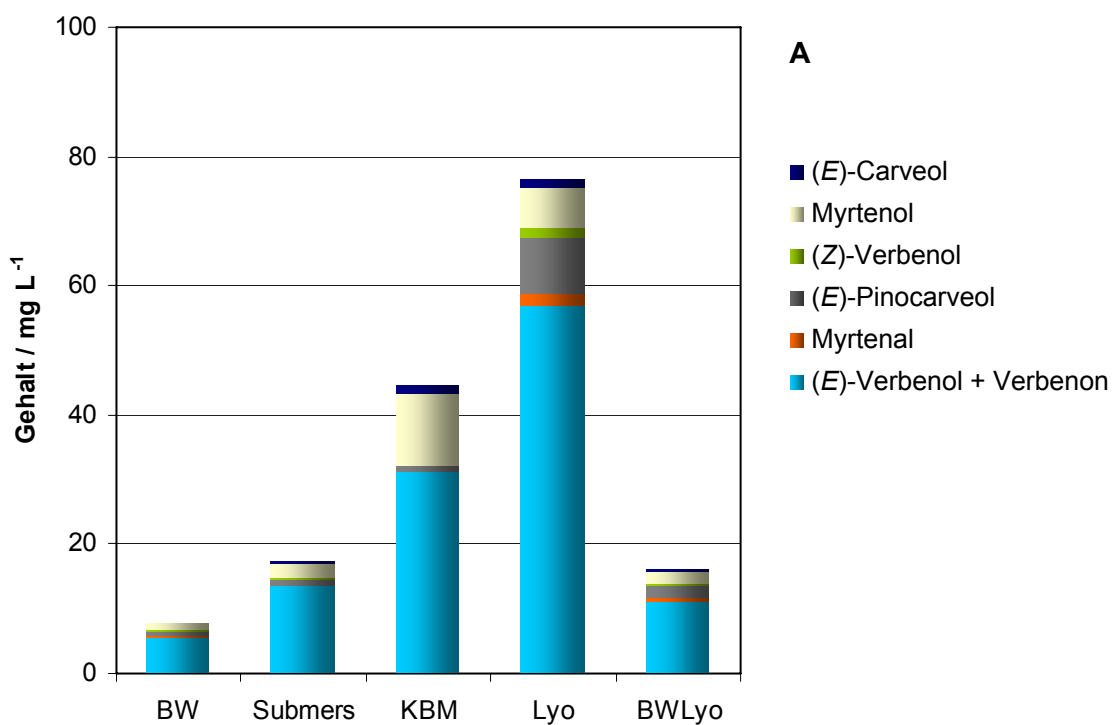
2.1.8 Vergleich der Biotransformationssysteme

Verglichen mit den chemischen Blindwerten (2.1.5) wurde bei der Transformation mit Submerskulturen von *Marasmius scorodonius* (2.1.3) nach 48 Stunden Transformation 8 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon und 1 mg L⁻¹ mehr Myrtenol gebildet (Abbildung 2.9 A). Signifikant höhere Produktmengen wurden bei der Transformation mit konzentrierter Biofeuchtmasse (2.1.4) ebenfalls nur für (*E*)-Verbenol und Verbenon (Steigerung Σ um 26 mg L⁻¹) und Myrtenol (Steigerung um 10 mg L⁻¹) beobachtet. Verglichen mit den entsprechenden Blindwerten wurde bei der Transformation mit Lyophilisaten von *M. scorodonius* (2.1.6) in Summe 46 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon gebildet. Die höchsten Produktausbeuten wurden demnach durch Transformation mit Lyophilisaten von *M. scorodonius* erzielt. Nur Myrtenol wurde durch den Einsatz von Biokonzentraten im Vergleich zu Lyophilisaten in höherer Ausbeute gebildet.

Bei der Transformation von α -Pinen mit *Cystoderma carcharias* wurden nur bei der Umsetzung mit Lyophilisaten (2.1.6) im Vergleich zu den Kontrollwerten (2.1.7) signifikant höhere Produktkonzentrationen gemessen (Steigerung Σ (*E*)-Verbenol und Verbenon um 20 mg L⁻¹, Abbildung 2.9 B).

Die Ergebnisse der Transformation mit Submerskulturen und Biokonzentraten von *Cyathus striatus* ähnelten denen der Transformationen mit *Marasmius scorodonius*. Mit Submerskulturen (2.1.3) wurden in Summe 9 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon gebildet, die Steigerung mit konzentrierten Kulturen (2.1.4) betrug 24 mg L⁻¹ (Abbildung 2.9 C). Bei der Transformation mit Lyophilisaten von *Cyathus striatus* (2.1.6) wurden im Vergleich zu den Kontrollwerten (2.1.7) in Summe 27 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon gebildet.

Trametes versicolor zeigte unter den untersuchten Mikroorganismen bei allen drei untersuchten Transformationssystemen die höchste Aktivität (Abbildung 2.9 D). Verglichen mit den chemischen Blindwerten (2.1.5) wurde bei der Transformation mit Submerskulturen (2.1.3) in Summe 9 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon gebildet. Deutlich höhere Gehalte wurden bei der Transformation von α -Pinen mit konzentrierter Biofeuchtmasse (2.1.4) erzielt (Steigerung in Summe um 79 mg L⁻¹). Bei der Transformation mit Lyophilisaten von *T. versicolor* (2.1.6) wurden, verglichen mit den chemischen Blindwerten (2.1.7), in Summe 61 mg L⁻¹ mehr (*E*)-Verbenol und Verbenon gebildet.



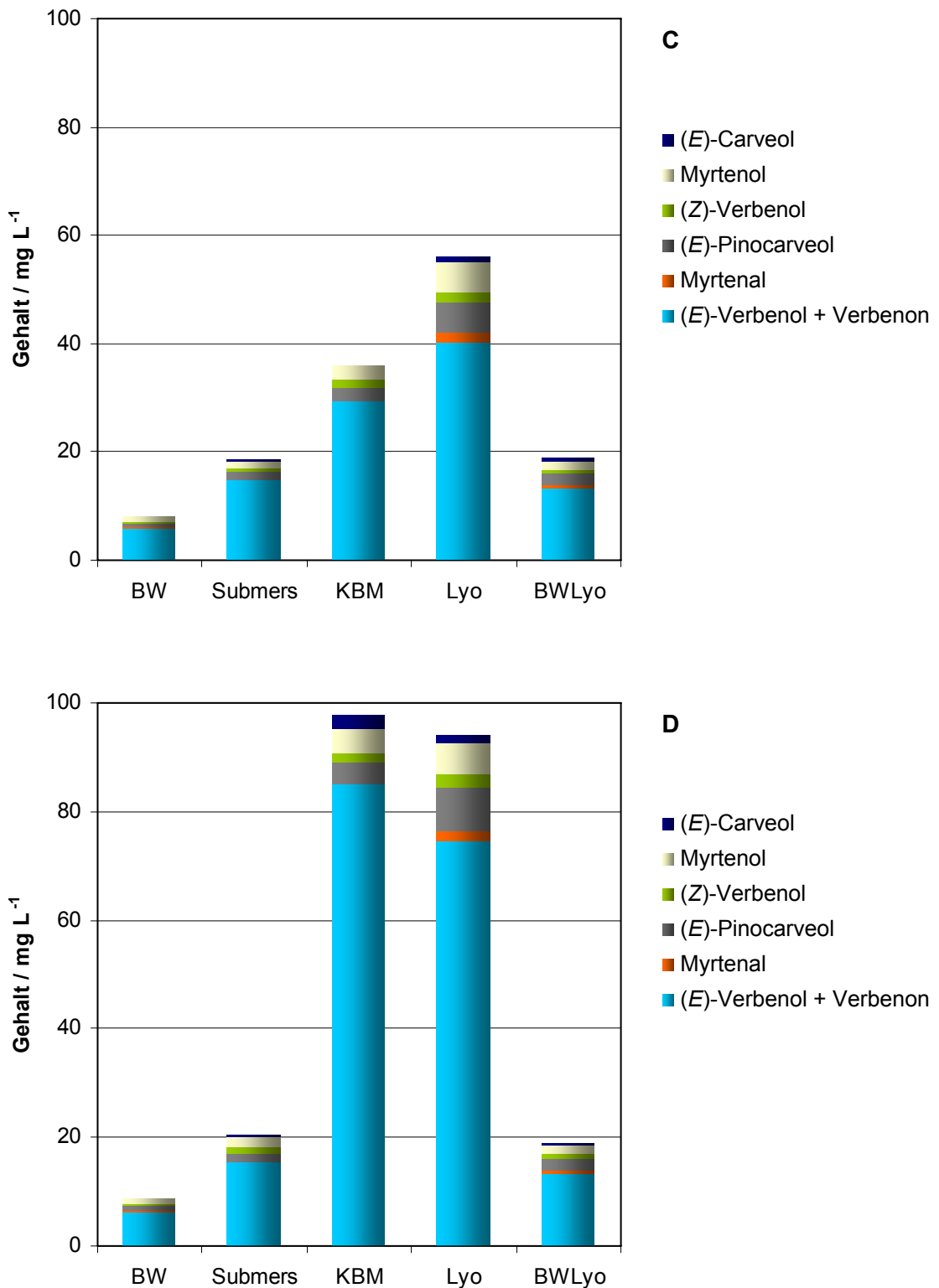


Abbildung 2.9: Vergleich der Transformationssysteme bei der Biotransformation von α -Pinen mit *Marasmius scorodoni* (A), *Cystoderma carcharias* (B), *Cyathus striatus* (C) und *Trametes versicolor* (D) nach 48-stündiger Umsetzung; BW = Blindwert für Transformation mit Submers- und konzentrierten Kulturen, Submers = Submerskultur, KBM = Kulturen mit konzentrierter Biomasse, Lyo = Lyophilisat, BWLyo = Blindwert für Transformation mit Lyophilisaten

2.2 Umsetzung des Sesquiterpens (+)-Valencen

2.2.1 Transformation mit Eisen(II)-sulfat

Neben enzymatisch katalysierten Umsetzungen sind ebenfalls metallkatalysierte Transformationen von Valencen bekannt (Willershausen und Graf 1991a). Exemplarisch wurde die Katalyse mit Eisen(II)-sulfat näher untersucht (5.6.2.4).

Sowohl in Puffer als auch in Wasser wurde eine Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch Eisen(II)-Ionen beobachtet (Abbildung 2.10): Quantifiziert wurden bis zu 54 mg L^{-1} (+)-Nootkaton (9,1 mol%). In den Blindwerten (2,7 mM (+)-Valencen) waren hingegen keine Transformationsprodukte nachweisbar ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$).

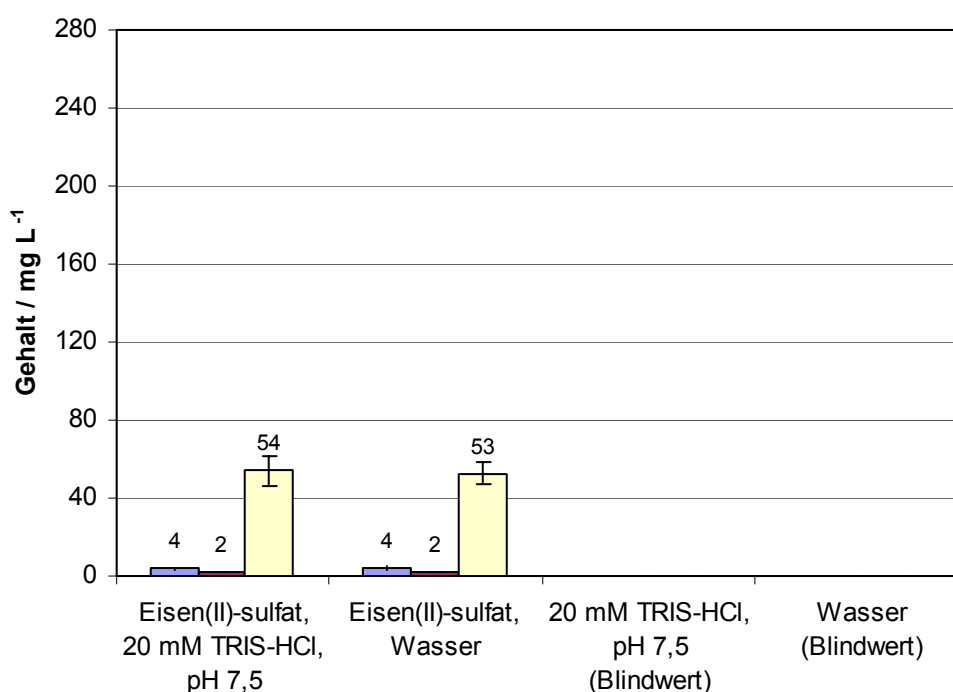


Abbildung 2.10: Metallkatalysierte Umsetzung von (+)-Valencen im Vergleich zu den entsprechenden Blindwerten; Transformation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit $4,5 \text{ mg FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (11 mM) in $1,5 \text{ mL}$ Puffer bzw. E-Pure-Wasser für 24 Stunden;

Blindwert: analog, jedoch keine Zugabe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Der Einfluss der Eisen(II)-Ionenkonzentration bei gleichbleibender Valencendosierung auf die Produktbildung wurde untersucht. Dazu wurde (+)-Valencen mit 0,01 bis 11 mM Eisen(II)-sulfat transformiert (5.6.2.4).

Die Gehalte von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol betragen bei 11 mM Eisen(II)-sulfat in Summe 78 mg L^{-1} beziehungsweise 60 mg L^{-1} bei 1 mM Eisen(II)-sulfat (Abbildung 2.11). Bei einer Konzentration von 0,1 mM wurden nach 24-stündiger Inkubation lediglich 13 mg L^{-1} nachgewiesen. Bei $10 \mu\text{M}$ Eisen(II)-sulfat war β -Nootkatol nicht mehr quantifizierbar, die Summe aus α -Nootkatol und (+)-Nootkatol betrug 5 mg L^{-1} .

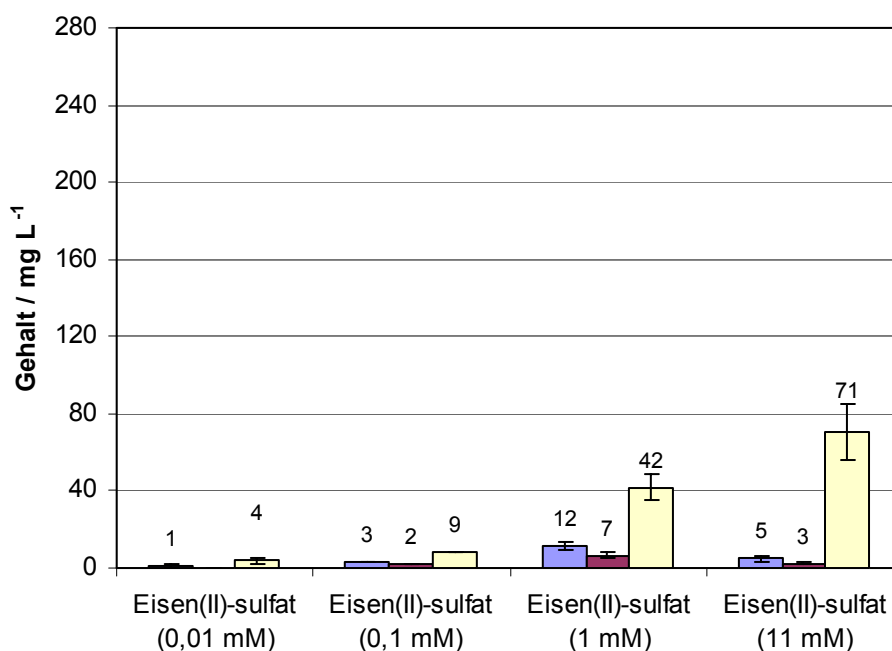


Abbildung 2.11: Ergebnisse der metallkatalysierten Transformation von (+)-Valencen in Abhängigkeit vom Eisen(II)-Gehalt; Inkubation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,01 mM - 11 mM) in $1,5 \text{ mL}$ 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Die analoge Umsetzung von (+)-Valencen mit einer 11 mM Eisen(II)-sulfatlösung, die vorher für 30 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert wurde, führte zu 41 mg L^{-1} (+)-Nootkatol ($\Sigma 45 \text{ mg L}^{-1}$).

(+)-Valencen wurde mit Eisen(II)-sulfat in Gegenwart verschiedener Zusätze inkubiert (5.6.2.4; Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Relative Nootkatonausbeuten nach Inkubation von (+)-Valencen mit Eisen(II)-sulfat in Gegenwart verschiedener Zusätze bezogen auf die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton einer entsprechenden Inkubation ohne Zusatz; Inkubation von 1 μ L (+)-Valencen mit $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden

Zusatz	Konzentration / mM	Aktivität / %
DABCO	0,1	44
DABCO	10	74
Histidin	1	116
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	10	6
KI	2.000	7
NaBr	2.000	89
NaCl	2.000	115
NaF	500	31
NDGA	1	0
Phenanthrolin	0,1	100
Phenanthrolin	10	111
Phenanthrolin	33	59

Kaliumhexacyanoferrat(III), Kaliumiodid und NDGA inhibierten die Umsetzung nahezu beziehungsweise vollständig.

2.2.2 Überprüfung der Substratqualität

Die Reinheit des für die Transformation verwendeten 90-prozentigen (+)-Valencens wurde mit Hilfe der Gas- und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie überprüft. Dazu wurde der Valencenstandard mittels GC-FID auf einer polaren (5.10.2.2) und einer unpolaren Trennphase (5.10.2.1) auf signifikante Verunreinigungen hin untersucht. Zusätzlich wurde die Substratqualität mit Hilfe der GC-MS auf einer polaren Säule (5.10.2.3) beurteilt.

Signifikante Verunreinigungen wurden nicht festgestellt: Es waren keine Valencenhydroperoxide oder andere Oxidationsprodukte nachweisbar (Abbildung 2.12).

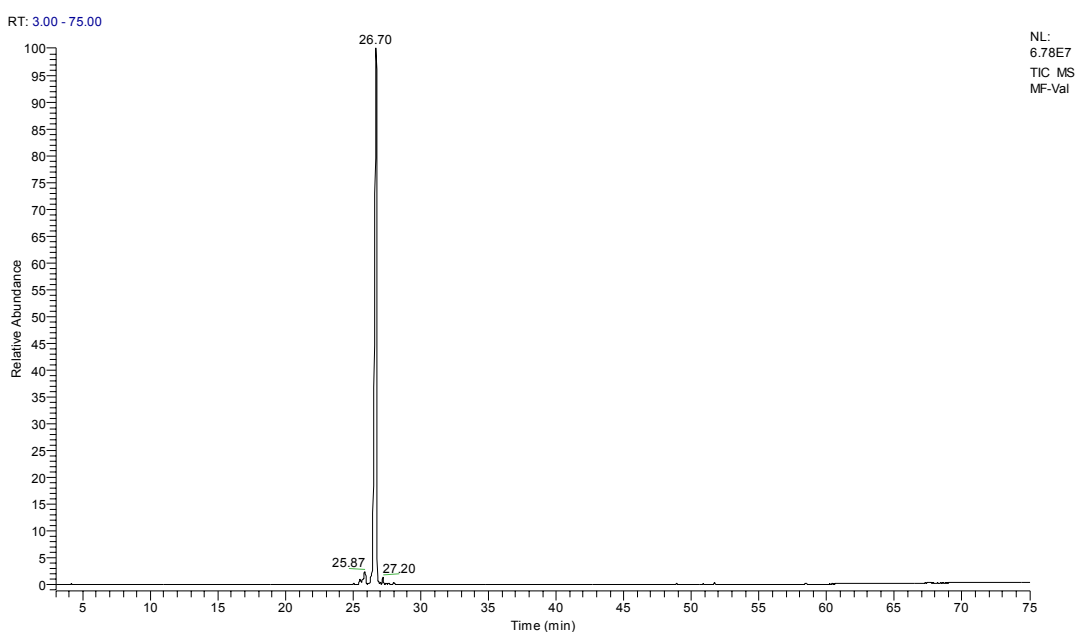


Abbildung 2.12: GC-MS-Chromatogramm des zur Transformation eingesetzten (+)-Valencens ($\geq 90\%$)

Außerdem wurde die Qualität des verwendeten (+)-Valencens ($\geq 90\%$) mittels HPLC-UV auf einer RP18-Phase bei 210, 215 und 220 nm untersucht (5.10.3): Hinweise auf Verunreinigungen mit Hydroperoxiden oder anderen Oxidationsprodukten wurden nicht gefunden.

(+)-Valencen wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (5.10.1) und anschließend gaschromatographisch untersucht (5.10.2.2). Das chromatographische Bild entsprach dem einer nicht gereinigten Substratprobe: Es waren keine Valencenhydroperoxide oder andere Oxidationsprodukte nachweisbar.

Alternativ wurde eine Vakuumdestillation von (+)-Valencen ($\geq 70\%$) durchgeführt (5.9.3) und anschließend sowohl die 70-prozentige Qualität als auch das destillierte (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* transformiert (5.6.2.1). Die Ergebnisse der Transformation sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Produktausbeuten nach Transformation von nicht destilliertem und destilliertem (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden;
s = Standardabweichung

	(+)-Valencen, nicht destilliert		(+)-Valencen, destilliert	
	Gehalt / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	Gehalt / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹
α -Nootkatol	37	1,3	44	1,1
β -Nootkatol	6,0	0,86	7,9	0,16
(+)-Nootkaton	131	7,0	152	3,9
Summe	175		204	

Im Vergleich führte die Transformation der nicht destillierten Qualität zu einer Ausbeute von 86% bezogen auf die Summe von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton.

Schließlich wurde (+)-Valencen mit einem Reduktionsmittel versetzt (5.9.2) und gaschromatographisch untersucht (5.10.2.2): Reaktionsprodukte wurden nicht nachgewiesen.

2.2.3 Transformation mit Lipoxygenase

(+)-Valencen wurde mit Sojalipoxygenase umgesetzt (5.6.2.3). Da Lipoxygenasen auf Substrate mit (Z,Z)-Penta-1,4-dienstruktur angewiesen sind, wurde einem Transformationsansatz zusätzlich Linolsäure hinzugefügt, um eine mögliche Cooxidation des (+)-Valencens zu überprüfen.

Bei der Transformation von (+)-Valencen mit Sojalipoxygenase ohne Zusatz von Linolsäure wurden nach 23 Stunden 7 mg L^{-1} (1,2 mol%) (+)-Nootkatol nachgewiesen (Abbildung 2.13). Der Gehalt von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol in Summe betrug 14 mg L^{-1} (2,4 mol%). Durch den Zusatz von Linolsäure wurden die Gehalte um 219% auf 47 mg L^{-1} (7,9 mol%) gesteigert. Davon entfielen 25 mg L^{-1} (4,2 mol%) auf (+)-Nootkatol.

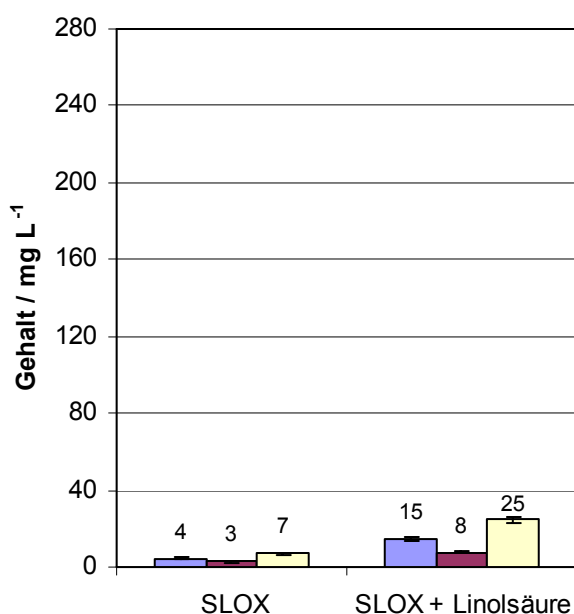


Abbildung 2.13: Produktausbeuten nach Transformation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit Sojalipoxygenase (248 U) mit und ohne Zusatz von $5,4 \mu\text{L}$ Linolsäure (55%ig) in $1,5 \text{ mL}$ 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 23 Stunden;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3 Biotransformation des Sesquiterpens (+)-Valencen

Zur Transformation von (+)-Valencen wurde Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* eingesetzt (Abbildung 2.14). Um einen möglichst homogenen Biokatalysator zu erhalten, erfolgte die Anzucht der Biomasse in einem Rührkesselreaktor (5.4.4.1). Anschließend wurde das Pilzmyzel gefriergetrocknet (5.4.4.2) und das erhaltene Lyophilisat zur Umsetzung von (+)-Valencen eingesetzt. Die Standardtransformation wurde durch Zugabe des Substrats zu 50 mg Lyophilisat in 1,5 mL Transformationspuffer gestartet (5.6.2.1). In der Regel wurde die Transformation nach 24 Stunden beendet, der Reaktionsansatz mit Pentan/Ether extrahiert (5.7.1.4) und die organische Phase gaschromatographisch untersucht (Abbildung 2.15; 5.10.2.2). Die Zielprodukte α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton wurden über den internen Standard Thymol quantifiziert. Die Produktausbeuten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit reinem Lyophilisat befinden sich im Anhang (Tabelle 7.2). Die unterschiedlichen Ausbeuten der Standardtransformationen basierten hauptsächlich auf der experimentell bedingten Verwendung von Lyophilisaten aus verschiedenen Bioreaktoransätzen (3.4.2.1).

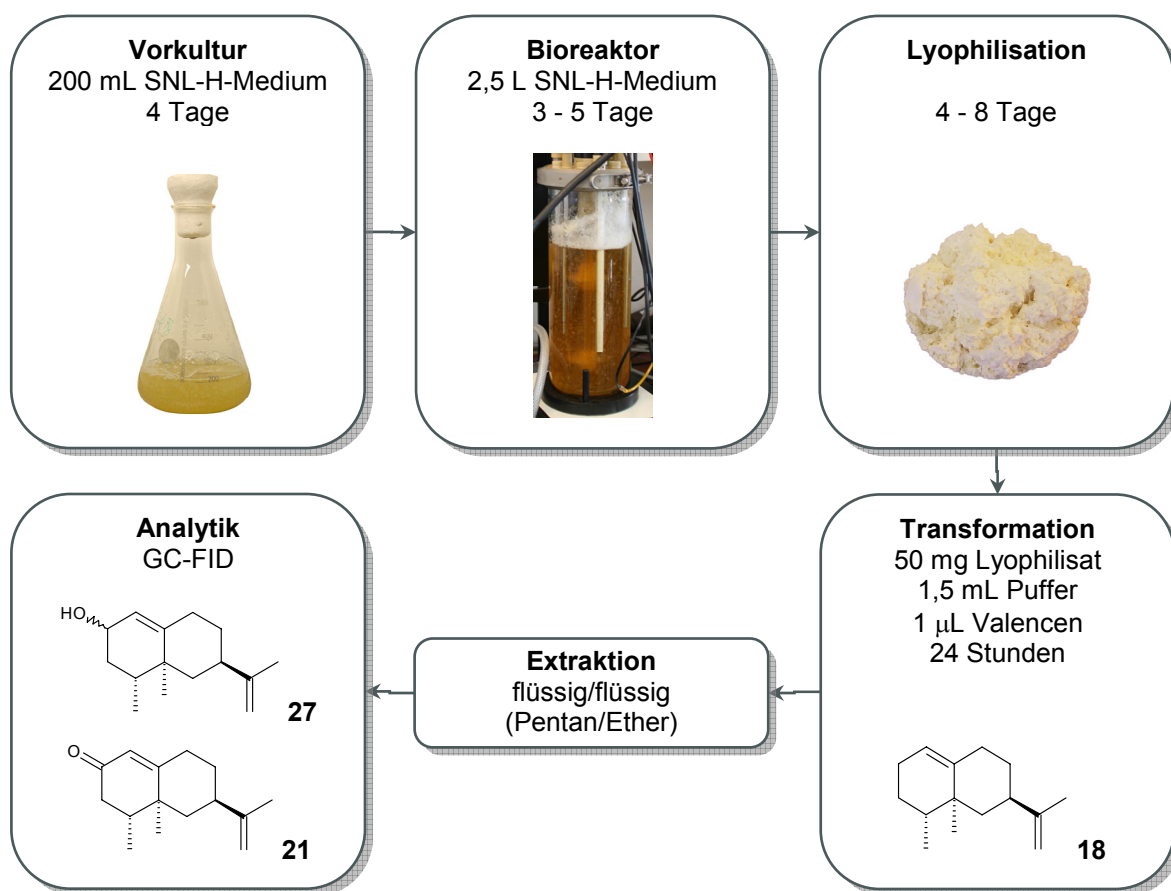


Abbildung 2.14: Experimentelles Design zur Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus*; (+)-Valencen (**18**), Nootkatol (**27**), (+)-Nootkaton (**21**)

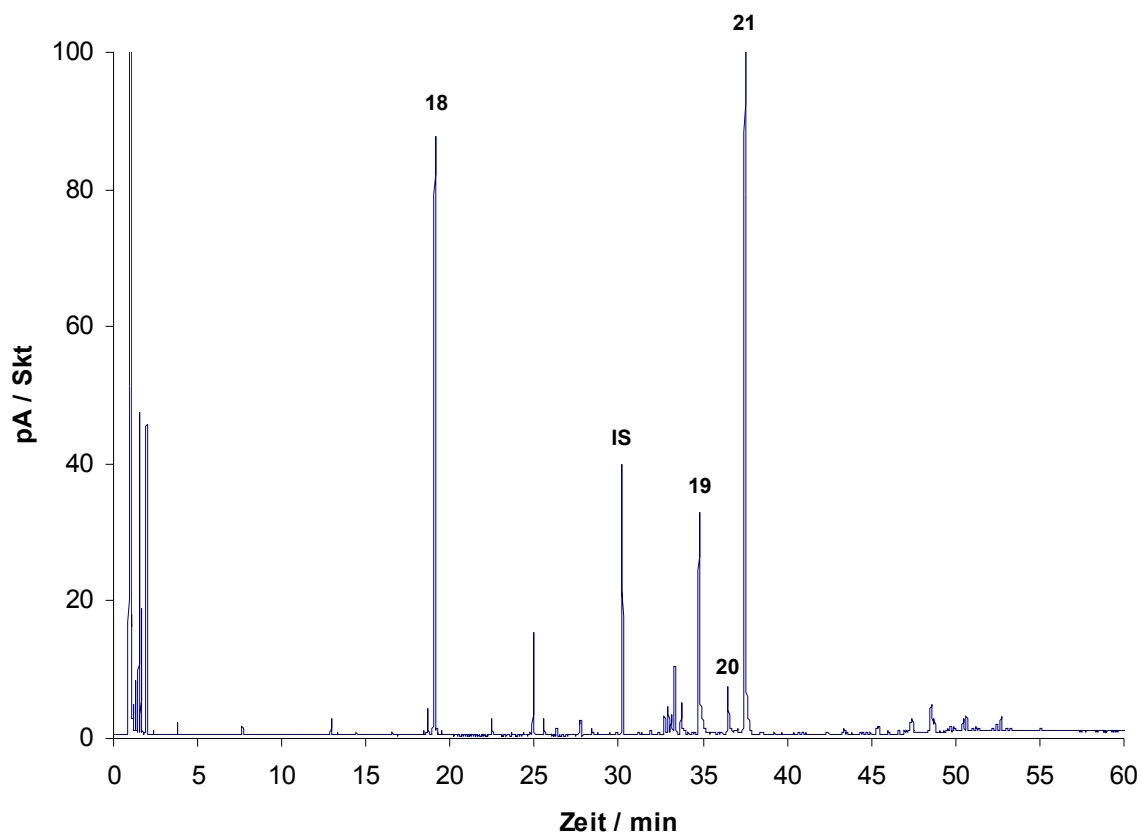


Abbildung 2.15: GC-Chromatogramm der Biotransformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus*; (+)-Valencen (**18**), Thymol (**IS**) (interner Standard), α -Nootkatol (**19**), β -Nootkatol (**20**), (+)-Nootkaton (**21**)

2.3.1 Variation der Rehydratisierungszeit

Zur Transformation von (+)-Valencen rehydratisierte Kaspera (2004) Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* vor der Substratzugabe für eine Stunde in MOPS-Puffer. Um dieses Transformationssystem zu optimieren, wurde in einem ersten Schritt die Rehydratisierungsdauer variiert (5.6.2.2).

Aus einer vorherigen Rehydratisierung des Lyophilisats resultierte eine Abnahme der Transformationsaktivität (Abbildung 2.16). Vor allem die Ausbeuten an (+)-Nootkaton wurden mit zunehmender Rehydratisierungsdauer geringer. Der Gehalt an (+)-Nootkaton nach 24-stündiger Rehydratisierung betrug nur noch 53% im Vergleich zu den Ergebnissen der direkten Transformation, die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton jedoch 71%.

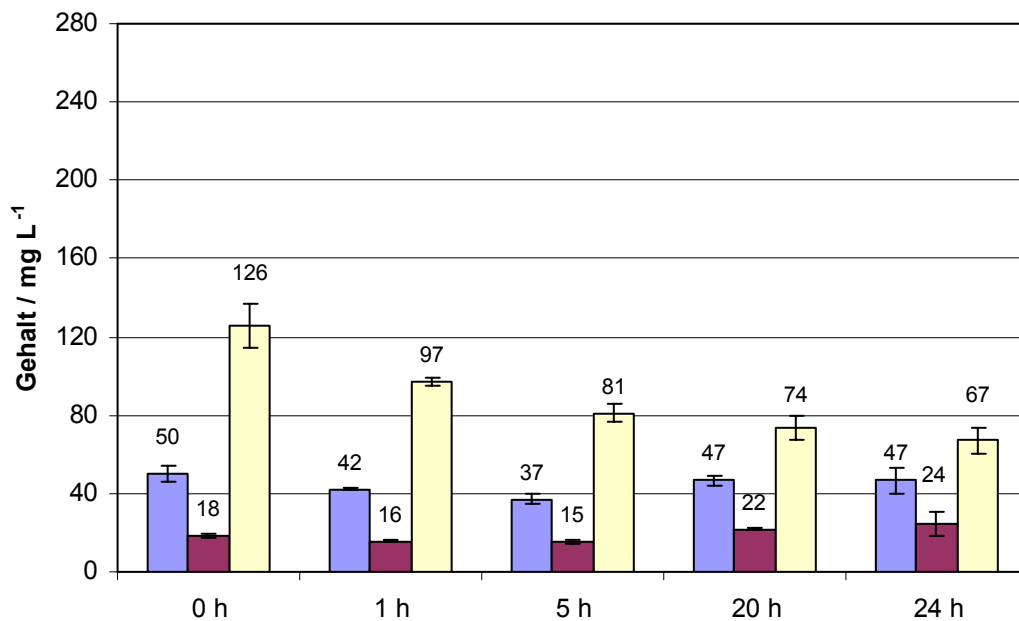


Abbildung 2.16: Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Rehydratisierungsdauer; nach Rehydratisierung (0 - 24 Stunden) erfolgte die Transformation von 10 μ L (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 100 mM MOPS, pH 7,0 für 24 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3.2 Puffer, Pufferstärke

2.3.2.1 Einfluss Puffer und pH-Wert

(+)-Valencen wurde mit Lyophilisaten aus *Pleurotus sapidus* in Na-Citrat-, Na-Acetat- und TRIS-HCl-Puffern bei pH-Werten zwischen 3,0 und 8,5 transformiert (5.6.2.1).

Hohe Produktausbeuten wurden mit 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 als Transformationspuffer erzielt ($\Sigma 342 \text{ mg L}^{-1}$, Abbildung 2.17).

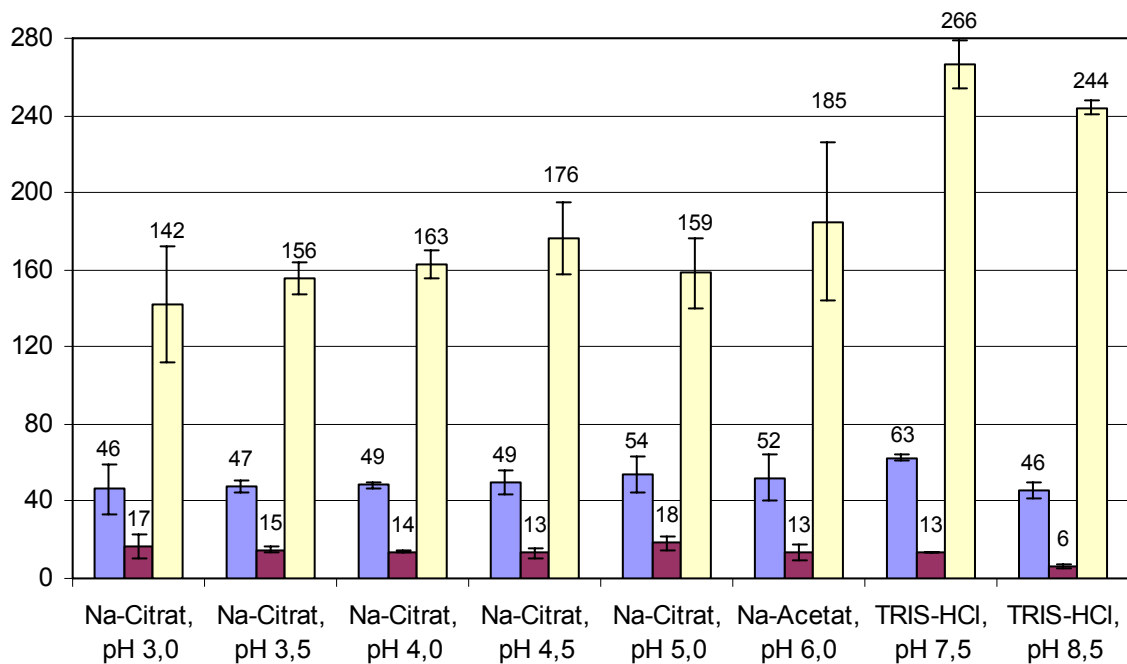


Abbildung 2.17: Produktausbeuten in Abhängigkeit von Puffer und pH-Wert; Transformation von 1 μL (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM Puffer für 24 Stunden

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3.2.2 Einfluss Pufferstärke

Die Transformationsaktivitäten (5.6.2.1) mit Pufferstärken zwischen 20 und 200 mM wurden miteinander verglichen.

Die höchsten Produktausbeuten wurden mit 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5 als Transformationspuffer erzielt ($\Sigma 330 \text{ mg L}^{-1}$, Abbildung 2.18). Eine Pufferstärke von 20 mM führte im direkten Vergleich zu einer um 14% verringerten Ausbeute an den untersuchten Zielprodukten ($\Sigma 282 \text{ mg L}^{-1}$). Die Umsetzungen in 100 mM, 150 mM und 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 wiesen eine sehr ähnliche Aktivität auf: $\Sigma 234$ bis 249 mg L^{-1} (71 bis 76% im Vergleich zur Transformation in 50 mM TRIS-HCl-Puffer).

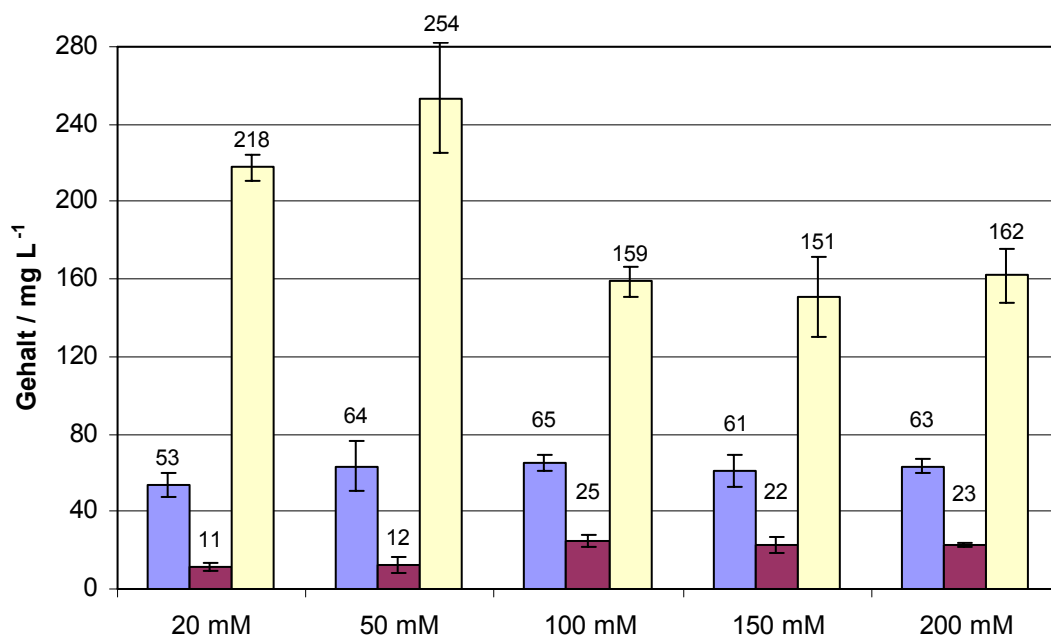


Abbildung 2.18: Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Pufferstärke; Transformation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3.2.3 Einfluss von Natriumchlorid auf die Transformationsaktivität

Der Einfluss der Natriumchloridkonzentration auf das Transformationssystem wurde untersucht. Dazu wurde den Transformationsansätzen Natriumchlorid in einer Endkonzentration zwischen 0 und 1 M zugesetzt (5.6.2.1).

Durch den Salzzusatz wurde die Transformationsaktivität stark vermindert (Abbildung 2.19). Bereits bei einem 150 mM Natriumchloridzusatz betrug die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton im Vergleich zu einer Umsetzung von nativem PSA-Lyophilisat ohne Salzzusatz lediglich 17%.

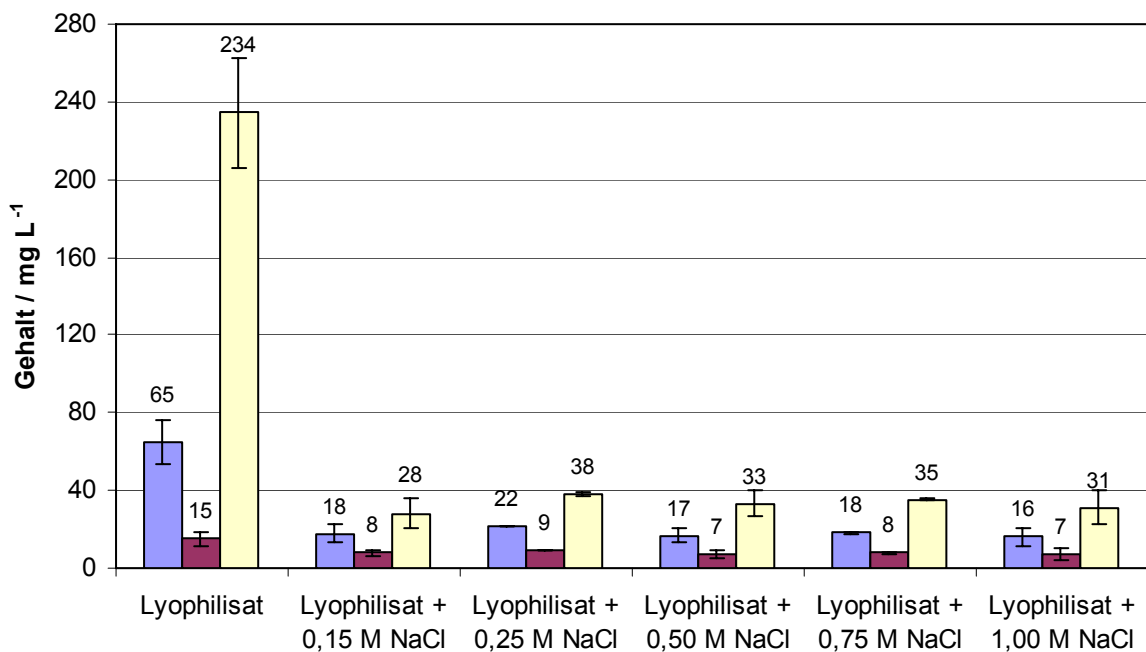


Abbildung 2.19: Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Salzkonzentration;
 Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in
 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 mit und ohne NaCl-Zusatz für 24 Stunden;
 ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.3.3 Einfluss der Valencendosierung auf die Produktausbeute

Durch Transformation unterschiedlicher Valencenmengen mit Hilfe von Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.1) wurde der Einfluss der Substratdosierung auf die Produktausbeuten untersucht.

Die Dosierung von 5 und 10 μL (+)-Valencen führte nach 24 Stunden zu nahezu identischen Produktausbeuten (Abbildung 2.20). In Summe betrug der Gehalt an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol 436 mg L^{-1} beziehungsweise 466 mg L^{-1} . Die entsprechenden Gehalte bei einer Dosierung von 1 μL (+)-Valencen fielen mit 284 mg L^{-1} niedriger aus (61% im Vergleich zu 10 μL (+)-Valencen).

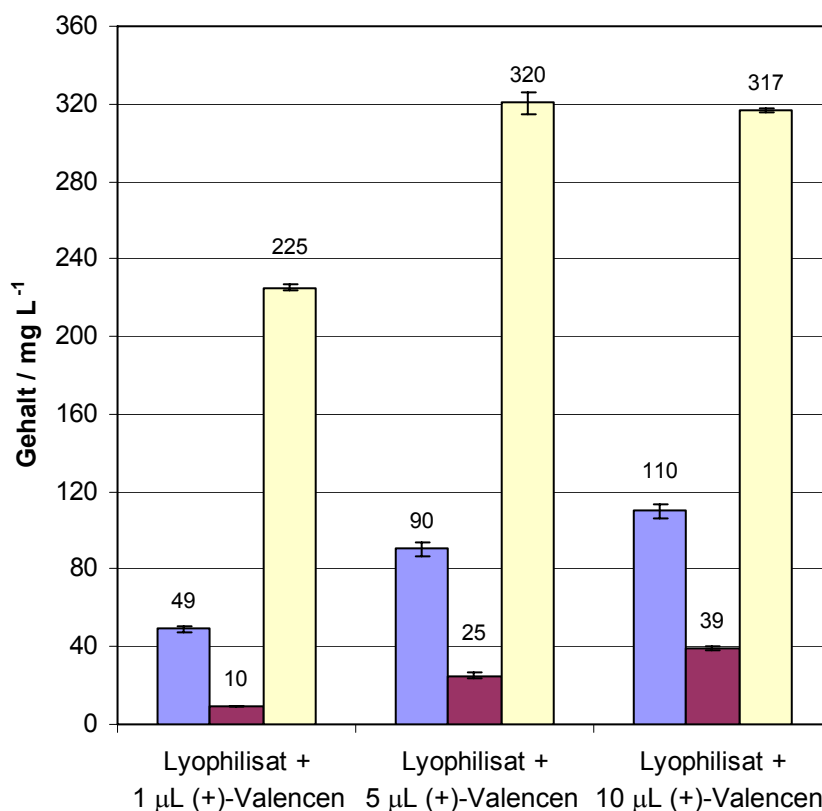


Abbildung 2.20: Einfluss der (+)-Valencendosierung auf die Produktausbeuten; Transformation von 1, 5 und 10 μL (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Bezogen auf die molaren Umsatzraten lieferte hingegen die Dosierung von 1 μL (+)-Valencen die besten Ergebnisse (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Molare Umsatzraten in Abhängigkeit von der Substratdosierung

Substratdosierung	molarer Umsatz / %		
	1 μL (+)-Valencen	5 μL (+)-Valencen	10 μL (+)-Valencen
α -Nootkatol	8,3	3,0	1,9
β -Nootkatol	1,6	0,8	0,7
(+)-Nootkaton	38,3	10,9	5,4
Summe	48,1	14,8	7,9

2.3.4 Einfluss von Inhibitoren und anderen Zusätzen auf die Transformationsaktivität

Inhibitoren für Lipoxygenasen (Typ A) und hämhaltige Enzyme (Typ C), Antioxidantien (Typ B), Eisen(II)-Hemmer (Typ E), Aktivatoren für Lipoxygenasen (Typ D) sowie weitere Zusätze (Typ F) wurden dem Transformationspuffer vor der Umsetzung von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat zugesetzt (5.6.2.1) und deren Einfluss auf die Enzymaktivität beobachtet (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Aktivität nach Umsetzung von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisaten unter Zusatz von Inhibitoren und anderen Substanzen bezogen auf die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton einer entsprechenden Transformation ohne Zusatz; A = Lipoxygenase-Inhibitor, B = Antioxidans, C = Inhibitor für Hämenzyme, D = Aktivator für Lipoxygenasen, E = Fe(II)-Inhibitor, F = sonstiger Zusatz

Typ	Zusatz	Konzentration / mM	Aktivität / %
A	Aesculetin	1	109
A	NDGA	1	0
A	Phenanthrolin	1	116
A	Phenanthrolin	10	120
A	Phenanthrolin	33	23
B	BHT	1	30
C	Kaliumcyanid	1	69
C	Natriumazid	1	3
C	PBO	1	79
C	Proadifen	0,1	96
C	Proadifen	1	108
D	Calciumacetat	10	94
D	Calciumchlorid	10	49
D	Natriumthiocyanat	1	28
D	Natriumthiocyanat	10	10
E	DABCO	0,1	108
E	DABCO	10	99
E	Histidin	1	94
E	Kaliumhexacyanoferrat(III)	10	77
E	Thioharnstoff	1	57
E	Thioharnstoff	10	25
F	Eisen(III)-chlorid	11	73
F	Kaliumiodid	2.000	1
F	Natriumbromid	2.000	18
F	Natriumchlorid	2.000	37
F	Natriumfluorid	500	71

2.3.5 Kompartimentierung des Transformationssystems

2.3.5.1 Separation nach Rehydratisierung

Bei der Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* läuft die Biokonversion in einer Suspension ab, da das Lyophilisat hauptsächlich aus unlöslichen Bestandteilen besteht. Um herauszufinden, ob die gesuchte Enzymaktivität löslich oder in den unlöslichen Bestandteilen lokalisiert ist, wurden 333 mg Lyophilisat für 1 Stunde in 10 mL MOPS-Puffer rehydratisiert und anschließend 30 Minuten zentrifugiert. Mit dem so separierten Überstand (5.6.2.8) wurde (+)-Valencen transformiert (5.6.2.3). Der Zentrifugationsrückstand wurde gewaschen und mit Puffer versetzt. Der Rückstand wurde direkt und nach Rekombination mit separiertem Überstand (5.6.2.9) zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.1).

Die Transformation von (+)-Valencen mit nativem PSA-Lyophilisat führte zu den höchsten Gehalten an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton ($\Sigma 300 \text{ mg L}^{-1}$, Abbildung 2.21). Das Rekombinat aus separiertem Überstand und gewaschenem Rückstand führte zu ähnlich hohen Produktausbeuten ($\Sigma 235 \text{ mg L}^{-1}$, 78% im Vergleich zum Lyophilisat). Die Transformation mit jeweils nur einer der separierten Komponenten führte hingegen zu einem hohen Verlust an Aktivität.

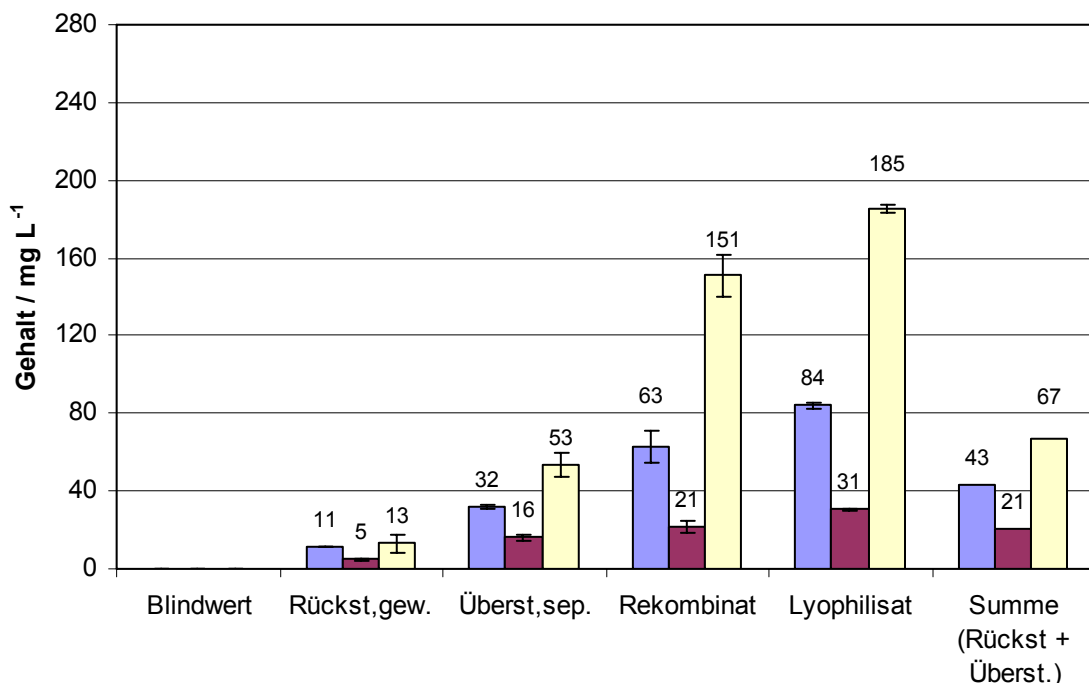


Abbildung 2.21: Ergebnisse der Transformation von 10 μL (+)-Valencen mit separiertem Überstand (Überst,sep.), gewaschenem Rückstand (Rückst,gew.), einem Rekombinat aus gewaschenem Rückstand und separiertem Überstand sowie nativem Lyophilisat in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Blindwert: siehe 5.6.2.5; Puffer: 100 mM MOPS, pH 7,0;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Bezogen auf die Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton wurde mit separiertem Überstand im Vergleich zum Lyophilisat lediglich eine Transformationsrate von 34% ($\Sigma 102 \text{ mg L}^{-1}$) erreicht; bei der Transformation mit gewaschenem Rückstand sogar nur 10% ($\Sigma 29 \text{ mg L}^{-1}$). Auch nach Addition der ermittelten Gehalte betrug die Summe der Gehalte im Vergleich zur Transformation mit Lyophilisat lediglich 43%. Das untersuchte Transformationssystem bestand aus mindestens zwei Komponenten: Eine Komponente war durch Rehydratisierung im Transformationspuffer löslich, die andere Komponente war unlöslich und verblieb im Lyophilisatrückstand.

Überprüft wurde, ob die entsprechenden Komponenten hitzestabil sind. Dazu wurden 667 mg Lyophilisat mit 20 mL MOPS-Puffer separiert, der Rückstand gewaschen und vor der Transformation (5.6.2.3) ausgewählte Komponenten durch Hitze inaktiviert (5.6.2.7, 5.6.2.8).

Durch Desaktivierung des separierten Überstandes und gewaschenen Rückstandes vor der Rekombination (*Überst,desakt.* + *Rückst,desakt.*) wurde die Aktivität vollständig zerstört (Abbildung 2.22). Der totale Verlust der Aktivität wurde ebenfalls nach der Hitzeinaktivierung von resuspendiertem, nicht separiertem Lyophilisat (5.6.2.7) und anschließender Transformation von (+)-Valencen (5.6.2.1) beobachtet. Die gebildeten Produktmengen lagen im Rahmen des entsprechenden Blindwertes (5.6.2.5).

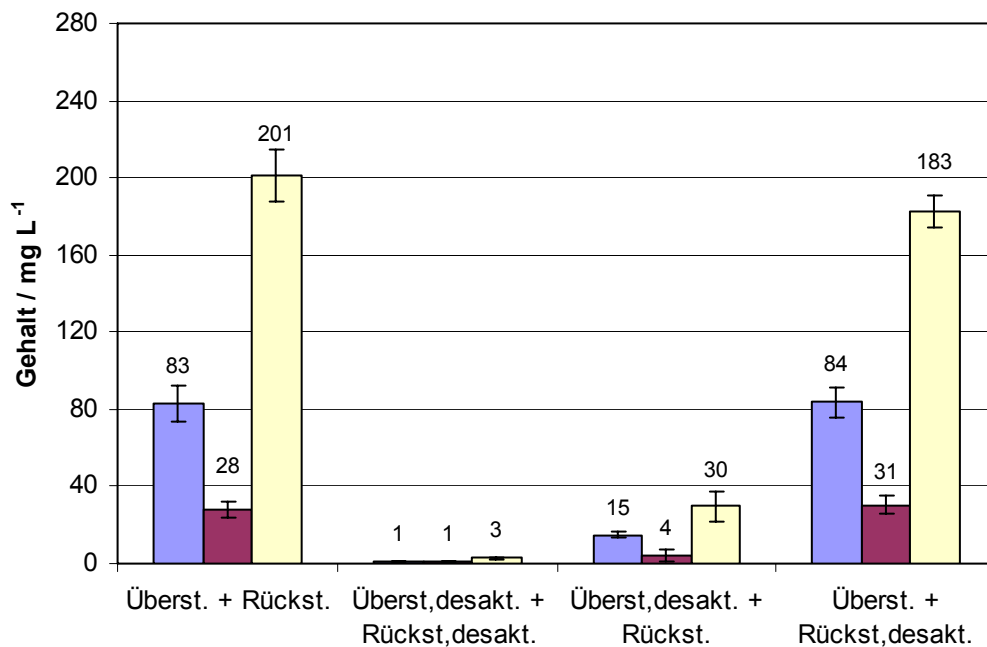


Abbildung 2.22: Einfluss der Hitzeinaktivierung (*desakt.*) von separiertem Überstand (*Überst.*) und / oder gewaschenem Rückstand (*Rückst.*) auf die Produktausbeuten;

Transformation von 10 μL (+)-Valencen mit rekombiniertem PSA-Lyophilisat in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 100 mM MOPS, pH 7,0;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Auch eine Desaktivierung des separierten Überstandes und Rekombination mit nicht desaktiviertem, gewaschenem Rückstand (*Überst.,desakt.* + *Rückst.*) führte nur zu sehr geringen Ausbeuten: $\Sigma 49 \text{ mg L}^{-1}$. Hingegen führte die Transformation mit separiertem Überstand zusammen mit desaktiviertem Rückstand (*Überst.* + *Rückst.,desakt.*) nur zu geringen Einbußen der Aktivität. Der Gehalt an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton nach Transformation von nicht desaktiviertem Rekombinat (*Überst.* + *Rückst.*) betrug in Summe 312 mg L^{-1} , nach Umsetzung mit Überstand und desaktiviertem Rückstand 297 mg L^{-1} (Verlust von lediglich 5%). Bei der im Puffer löslichen Komponente handelt es sich somit um ein hitzelabiles Enzym. Die unlösliche, nach Separation im Rückstand verbleibende Komponente ist hingegen hitzestabil und somit als Mediator beziehungsweise Cofaktor am Transformationssystem beteiligt.

Die Verwendung von 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 als Extraktionspuffer führte zu analogen Ergebnissen (Abbildung 2.23). Auch hier wurde durch Rekombination (5.6.2.9) von separiertem Überstand und desaktiviertem Rückstand (5.6.2.8) ein Großteil der Transformationsaktivität wieder hergestellt. Im Vergleich zum direkt zur Umsetzung von (+)-Valencen eingesetzten Lyophilisat (5.6.2.1) betrug der Gehalt an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton 86%.

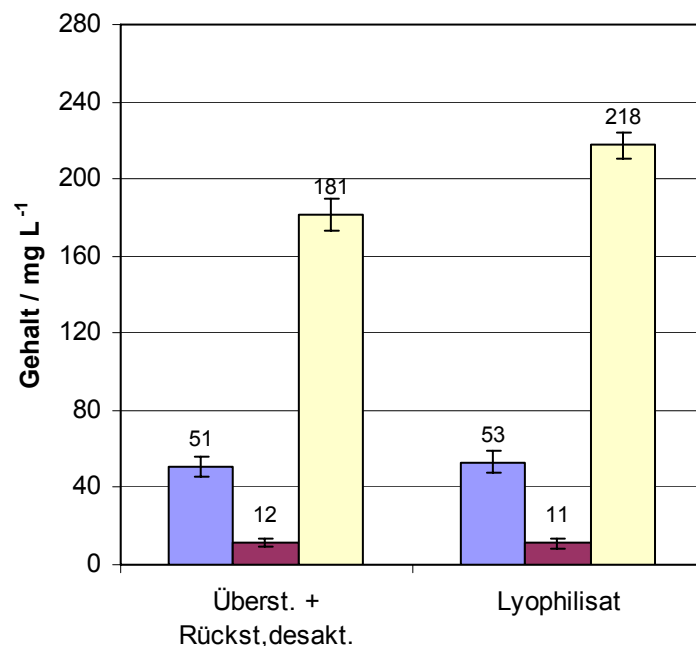


Abbildung 2.23: Vergleich der Transformationsrate zwischen nativem und rekombiniertem Lyophilisat; Transformation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit Lyophilisat und einem Rekombinat aus separiertem Überstand und desaktiviertem Rückstand (*Überst.* + *Rückst.,desakt.*) in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Wurde jedoch zur Separation 20 mM Natriumcitrat, pH 3,0 verwendet, verblieb mindestens eine hitzelabile Komponente, die sich bei der Extraktion mit MOPS-Puffer (pH 7,0) oder TRIS-HCl-Puffer (pH 7,5) aus dem Lyophilisat löste, im Rückstand (Abbildung 2.24). Das Gleiche wurde für die Extraktion von Lyophilisat mit 20 mM Natriumcitrat, pH 4,0 beobachtet. Die Separation (5.6.2.8), Hitzeinaktivierung (5.6.2.7), Rekombination (5.6.2.9) und Transformation (5.6.2.3) erfolgte analog zur Extraktion mit MOPS- beziehungsweise TRIS-HCl-Puffer.

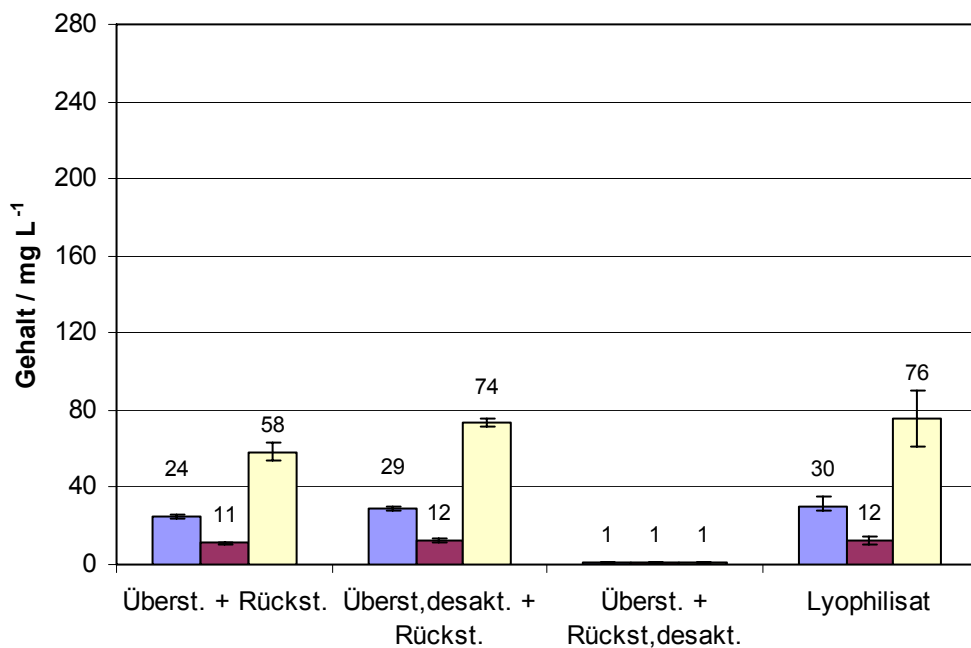


Abbildung 2.24: Einfluss einer Hitzeinaktivierung (desakt.) von separiertem Überstand (Überst.) und / oder gewaschenem Rückstand (Rückst.) auf die Produktausbeuten; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit rekombiniertem PSA-Lyophilisat in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 20 mM Na-Citrat, pH 3,0;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3.5.2 Optimierung der Rückstandsmenge

667 mg Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurden mit 20 mL 100 mM MOPS, pH 7,0 separiert (5.6.2.8) und jeweils 1,5 mL des separierten Überstandes mit 0 bis 100 mg gewaschenem Rückstand rekombiniert (5.6.2.9) und transformiert (5.6.2.1).

Das ursprüngliche Verhältnis von 50 mg Lyophilisat zu 1,5 mL Puffer im analogen Ansatz des Rekombinats (*Überst.* + 50 mg *Rückst.*) führte zu den höchsten Ausbeuten (Abbildung 2.25): In Summe wurden 283 mg L⁻¹ α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton gebildet. Alle anderen Transformationsansätze führten zu niedrigeren Gehalten – vor allem an (+)-Nootkaton.

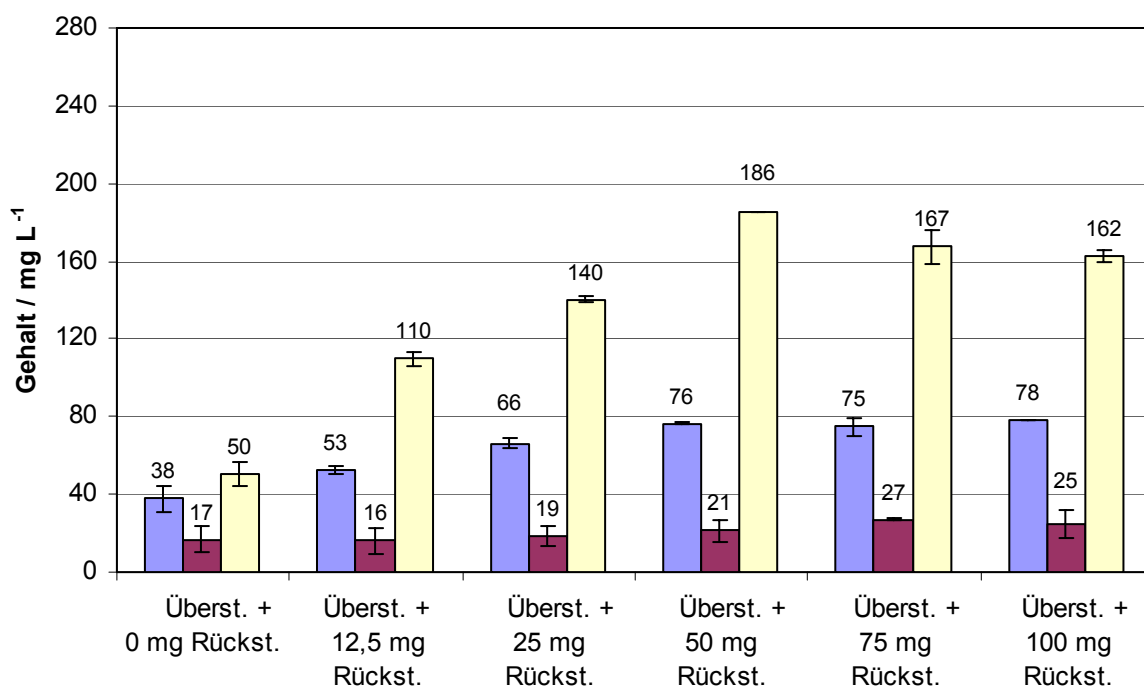


Abbildung 2.25: Produktausbeuten nach Rekombination in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an gewaschenem Rückstand; Transformation von 10 μ L (+)-Valencen nach Rekombination von gewaschenem Rückstand (Rückst.) mit 1,5 mL separiertem Überstand (Überst.) für 24 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.3.5.3 Ultrafiltration nach Separation

Der Einfluss von Konzentrierungs- beziehungsweise Umpufferungsschritten auf das Transformationssystem wurde untersucht. PSA-Lyophilisat wurde für 30 Minuten separiert (5.6.2.8), der separierte Überstand gegebenenfalls mit Puffer versetzt (Tabelle 2.7) und anschließend mit Amicon-, Vivaspin- sowie Centricon-Ultrafiltrationseinheiten konzentriert (5.6.2.12).

Tabelle 2.7: Schema zur Isolierung der 3. Komponente; V = Volumen, Überst,sep. = separierter Überstand, Puffer = 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Amicon = Amicon Ultra Plus-4, Vivaspin = Vivaspin 15R, Centricon = Centricon Plus-80

V(Überst,sep.) / mL	Filtrationseinheit	Zugabe Puffer vor Konzentration ad / mL
3	Amicon	-
	Vivaspin	10
	Centricon	40

Jeweils die Hälfte des Retentats wurde mit Puffer, die andere Hälfte mit dem jeweiligen Filtrat versetzt, mit gewaschenem, deaktiviertem Lyophilisat rekombiniert (5.6.2.10) und die Transformation durch Zugabe von (+)-Valencen gestartet (5.6.2.1).

Alle Retentate, die mit Puffer versetzt wurden, wiesen im Vergleich zur Transformation von (+)-Valencen durch ein Rekombinat aus separiertem Überstand und deaktiviertem Rückstand einen hohen Verlust an Transformationsleistung auf (Abbildung 2.26): Die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol lag bei 55% (Amicon), 49% (Vivaspin) und 48% (Centricon). Durch den Zusatz des Amicon-Filtrats zum Amicon-Retentat (*Amicon-Retentat + Filtrat*) wurden jedoch 93% der Transformationsaktivität im Vergleich zum Rekombinat wieder hergestellt. Bei den anderen Filtrationseinheiten nahm der beobachtete Verlust mit erfolgter Verdünnung des Filtrats durch Zusatz von Puffer (Tabelle 2.7) wieder zu: Der Aktivitätsverlust betrug bei der Verwendung von Vivaspin-Zentrifugationseinheiten 40% (*Vivaspin-Retentat + Filtrat*) und 50% bei Centricon-Zentrifugationseinheiten (*Centricon-Retentat + Filtrat*). Alle Umsetzungen mit reinem Filtrat führten zu Gehalten unter 1 mg L^{-1} der untersuchten Zielprodukte und entsprachen damit denen des Blindwertes.

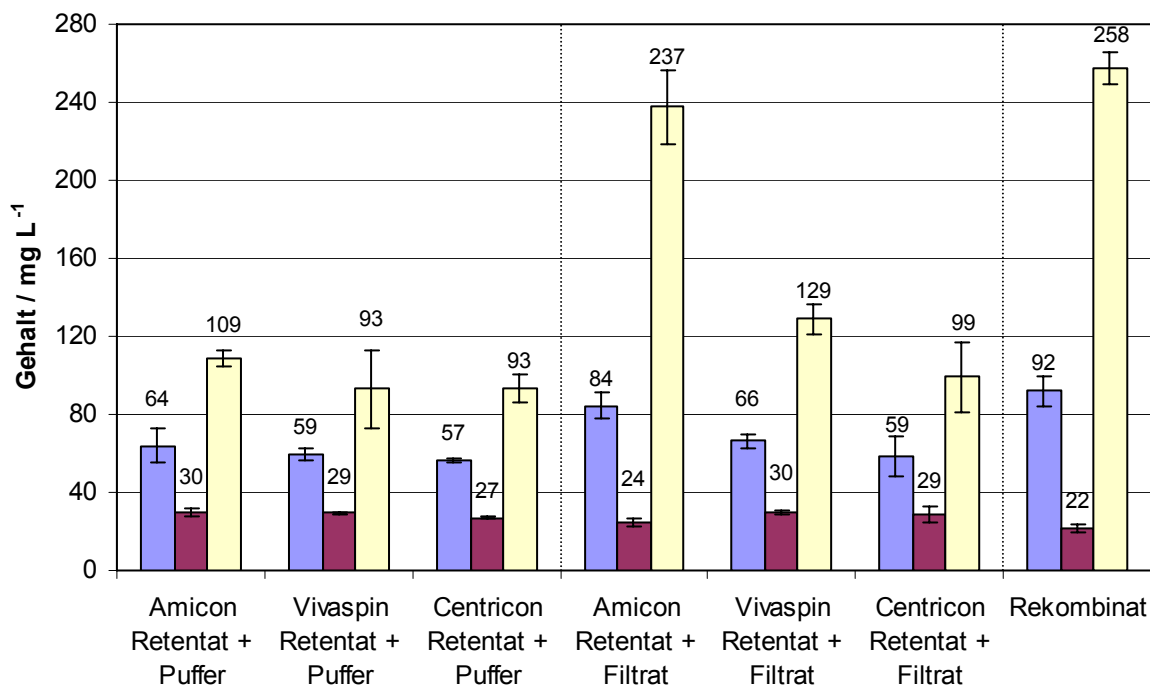


Abbildung 2.26: Produktausbeuten nach Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa im Vergleich zu einem Rekombinat; Transformation von 10 μL (+)-Valencen mit Retentat und Puffer oder mit Retentat und entsprechendem Filtrat in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Amicon = Amicon Ultra Plus-4, Vivaspin = Vivaspin 15R, Centricon = Centricon Plus-80; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass durch die Konzentrierung beziehungsweise Umpufferung mit Filtrationseinheiten eine dritte Komponente abgetrennt wurde, die für die volle Enzymaktivität vonnöten ist. Die Konzentration dieser Komponente übte ferner einen Einfluss auf die Transformationsleistung aus.

Um zu überprüfen, ob die bei der Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten zur Konzentrierung beziehungsweise Umpufferung von separiertem Überstand abgetrennte, im Filtrat befindliche, dritte Komponente eventuell durch die Verwendung von Filtrationseinheiten einer niedrigeren Ausschlussgrenze retardiert werden kann, wurden 7,5 mL separierter Überstand (5.6.2.8) mit Vivaspin 15R Filtrationseinheiten einer Ausschlussgröße von 5.000 Da auf circa 1 mL konzentriert (5.6.2.12). Ein Aliquot des Retentats, welches 1,5 mL separiertem Überstand entsprach, wurde ad 1,5 mL mit Puffer aufgefüllt und ein weiteres mit Filtrat. Nach Rekombination mit deaktiviertem Rückstand (5.6.2.10) wurde (+)-Valencen transformiert (5.6.2.1).

Das mit Puffer aufgefüllte Retentat zeigte erneut nur einen Bruchteil der möglichen Transformationsleistung (26% im Vergleich zum Rekombinat, Abbildung 2.27). Das mit Filtrat versetzte Konzentrat wies jedoch keinen Verlust an Transformationsleistung auf (106% im Vergleich zum Rekombinat).

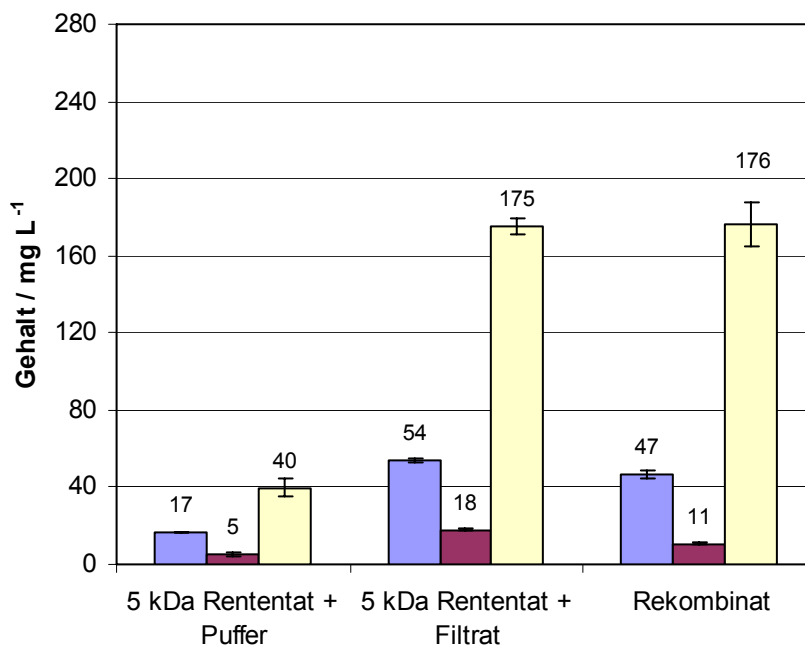


Abbildung 2.27: Produktausbeuten nach Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa im Vergleich zu einem Rekombinat; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit Retentat und Puffer sowie mit Retentat und Filtrat, jeweils rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand, in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Auch bei einer Ausschlussgröße von 5.000 Da ist eine, für die vollständige Transformationsleistung benötigte, dritte Komponente nach Konzentrierung im Filtrat lokalisiert.

Im Weiteren wurde überprüft, ob diese dritte Komponente hitzestabil ist. Dazu wurde PSA-Lyophilisat separiert (5.6.2.8) und 4 x 3 mL des separierten Überstandes konzentriert (5.6.2.12). Die Filtrate und Retentate wurden jeweils aliquotiert und wie in Tabelle 2.8 dargestellt behandelt (5.6.2.7):

Tabelle 2.8: Schema zur Lokalisierung der 3. Komponente; Bezeich. = Probenbezeichnung

Bezeich.	Retentat + Filtrat	Retentat, deaktiviert + Filtrat, deaktiviert	Retentat + Filtrat, deaktiviert	Retentat, deaktiviert + Filtrat
Retentat	keine Behandlung	30 min Kochen im Wasserbad	keine Behandlung	30 min Kochen im Wasserbad
Filtrat	keine Behandlung	30 min Kochen im Wasserbad	30 min Kochen im Wasserbad	keine Behandlung

Die einzelnen Ansätze wurden rekombiniert, mit gewaschenem, deaktiviertem Rückstand versetzt (5.6.2.10) und zur Transformation eingesetzt (*Retentat + Filtrat*). Parallel wurde (+)-Valencen mit einem Rekombinat (separierter Überstand rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand, 5.6.2.9) transformiert (5.6.2.1).

Das Erhitzen des Filtrats (*Filtrat,desakt.*) übte keinen Einfluss auf die Transformationsleistung aus (Abbildung 2.28). Das Erhitzen des Retentats (*Retent,desakt.*) führte hingegen zum vollständigen Verlust der Aktivität.

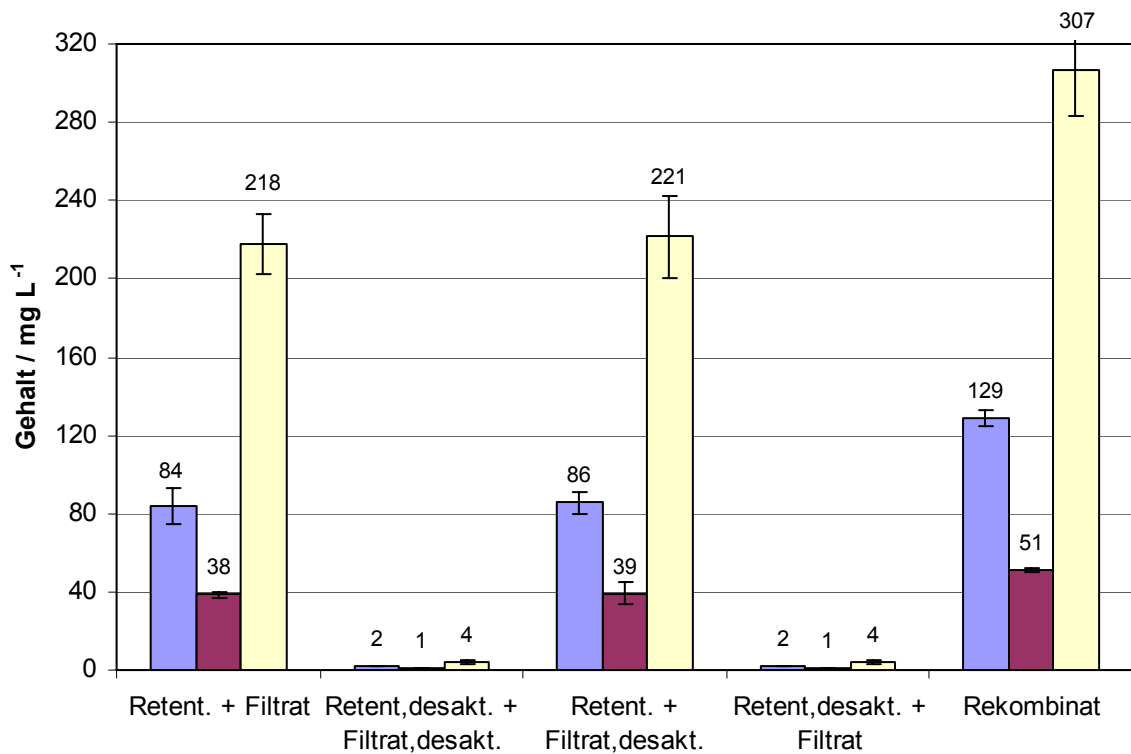


Abbildung 2.28: Einfluss einer Hitzeinaktivierung (*desakt.*) des Ultrafiltrationsretentats (*Retent.*) und / oder Filtrats auf die Produktausbeuten; Transformation von 10 μ L (+)-Valencen durch die genannten Komponenten nach Rekombination mit desaktiviertem Rückstand in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Die durch Ultrafiltration aus dem separierten Überstand abtrennbare dritte Komponente ist im Filtrat lokalisiert und hitzestabil. Wohingegen die hitzelabile Verbindung bei Ausschlussgrößen ab 5.000 Da retardiert wird.

2.3.6 Ersatz der im Zentrifugationsrückstand verbleibenden Komponente

Die Laccase-Mediatoren 1-Hydroxybenzotriazol (**29**), 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) Diammoniumsalz und 3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on wurden separiertem Überstand (5.6.2.8) zugesetzt und anschließend die Transformation durch Zugabe von 10 μL (+)-Valencen gestartet (5.6.2.3).

Der 100 μM Zusatz der oben genannten Mediatoren zum separierten Überstand führte im Vergleich zum separierten Überstand ohne Zusätze zu einer signifikanten Steigerung der Transformationsaktivität (Abbildung 2.29). Diese Steigerung fiel jedoch deutlich schwächer aus als der Anstieg durch Zugabe gewaschenen, desaktivierten Lyophilisats (*Rekombinat*, 5.6.2.9). Der höchste Anstieg an Transformationsaktivität wurde durch den Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zum separierten Überstand erzielt (Σ 159 mg L^{-1} , Tabelle 2.9). Dies entsprach im Vergleich zum Überstand ohne Zusätze einer Steigerung um den Faktor 2,8.

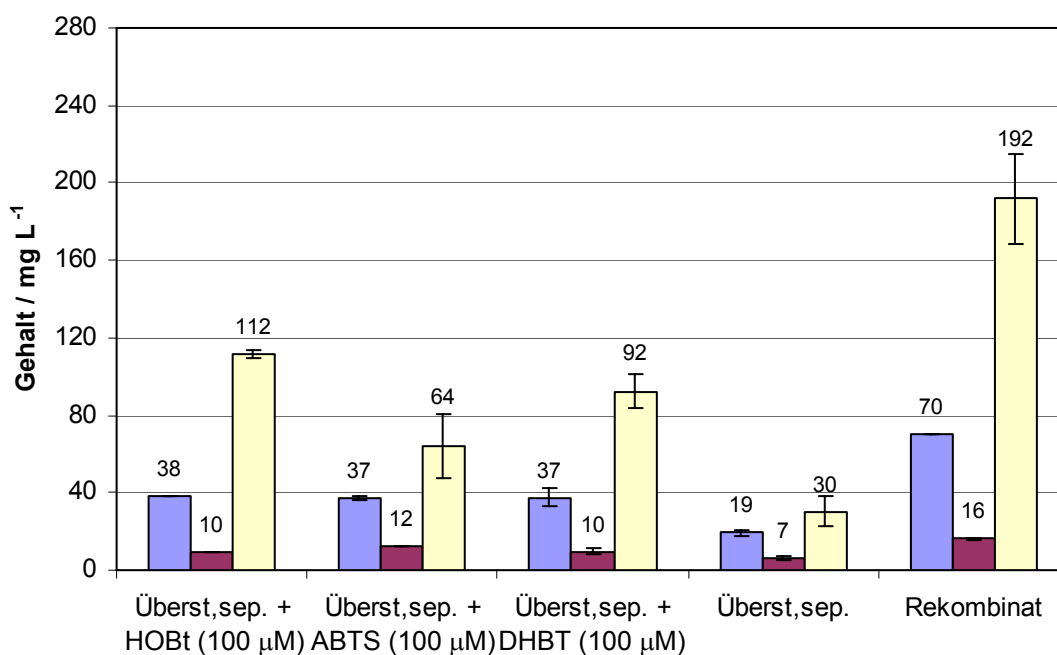


Abbildung 2.29: Ergebnisse der Umsetzung von (+)-Valencen mit separiertem Überstand unter Zusatz von Mediatoren; Transformation von 10 μL (+)-Valencen mit separiertem Überstand (Überst,sep.) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) (ABTS) oder 3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DHBT), eines separierten Überstandes ohne Zugabe von Mediator sowie eines Rekombinats von separiertem Überstand mit gewaschenem, desaktiviertem Rückstand für 24 Stunden in einem Volumen von 1,5 mL; Puffer: 20 mM MOPS, pH 7,0

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Tabelle 2.9: Summe der Gehalte von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol und relative Aktivität der Transformation unter Mediatorzusatz sowie eines separierten Überstandes ohne Zusätze in Bezug zu einem Rekombinat aus separiertem Überstand mit gewaschenem, deaktiviertem Rückstand

Probe	Aktivität / %	Σ α -, β -Nootkatol, (+)-Nootkatol Gehalt / mg L ⁻¹
<i>Überstand, separiert + HOBt (100 μM)</i>	57	159
<i>Überstand, separiert + ABTS (100 μM)</i>	41	114
<i>Überstand, separiert + DHBT (100 μM)</i>	50	140
<i>Überstand, separiert</i>	20	56
<i>Rekombinat</i>	100	278

Um ausschließen zu können, dass eine rein chemische Katalyse durch die eingesetzten Mediatoren vorlag, wurden die entsprechenden Chemikalienblindwerte vermessen: Nach Zugabe eines der Mediatoren und anschließender Inkubation von (+)-Valencen (5.6.2.4) wurde keine Transformation des Substrates beobachtet.

Im Weiteren wurde die Konzentration des Mediators 1-Hydroxybenzotriazol optimiert. Dazu wurde 1-Hydroxybenzotriazol in Konzentrationen zwischen 50 μ M und 1 mM separiertem Überstand (5.6.2.8) zugesetzt und die Transformation durch Zugabe von 10 μ L (+)-Valencen gestartet (5.6.2.3).

Die Transformation von separiertem Überstand unter Zusatz von 100 μ M sowie 1 mM HOBt führte zu identischen Produktausbeuten (Σ 233 mg L⁻¹ beziehungsweise 237 mg L⁻¹, Abbildung 2.30). Durch Variation der HOBt-Konzentration wurde die Transformationsleistung um den Faktor 1,7 gegenüber einem separierten Überstand ohne HOBt-Zusatz verbessert. Dies entsprach 39% der Transformationsrate eines Rekombinats aus separiertem Überstand und gewaschenem, deaktiviertem Rückstand.

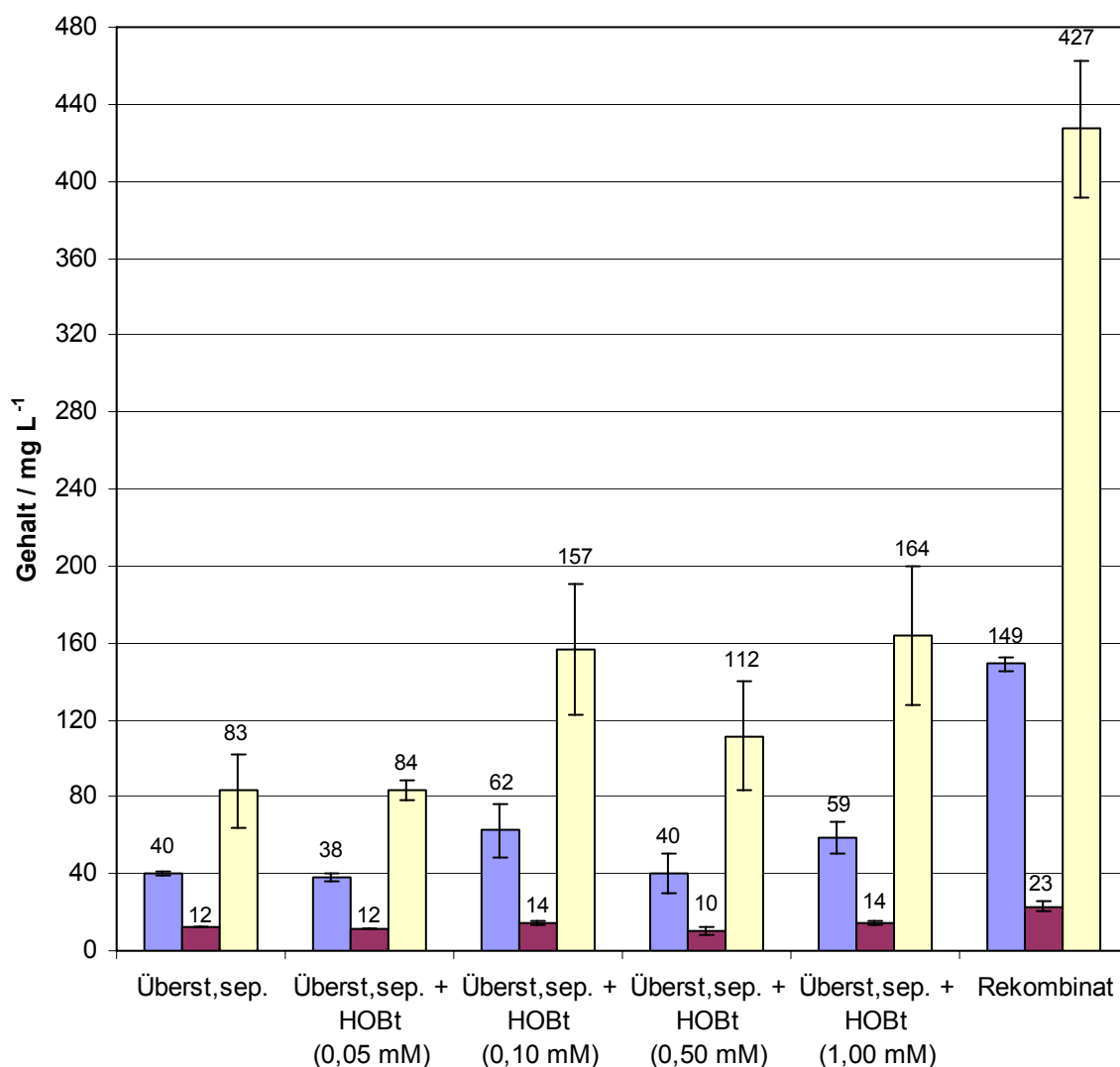


Abbildung 2.30: Umsetzung von (+)-Valencen mit separiertem Überstand in Abhängigkeit von der eingesetzten 1-Hydroxybenzotriazol-Konzentration; Transformation von 10 μL (+)-Valencen mit separiertem Überstand (Überst,sep.) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), eines separierten Überstandes ohne Zugabe von Mediator sowie eines Rekombinats von separiertem Überstand mit gewaschenem, desaktiviertem Rückstand für 24 Stunden in einem Volumen von 1,5 mL; Puffer: 20 mM MOPS, pH 7,0;

■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Neben dem Zusatz von Mediatoren wurden Detergenzien als Ersatz der zweiten, hitzestabilen, im Zentrifugationsrückstand verbleibenden Komponente eingesetzt. Dazu wurde Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* separiert (5.6.2.8) und der separierte Überstand nach Zugabe von ASB-C8Ø (**31**; 0,05%, w/v), Natriumchololat (**30**; 0,20%, w/v) sowie ASB-C8Ø (0,05%, w/v) und Natriumchololat (0,20%, w/v) zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.3).

Sowohl der alleinige Zusatz von ASB-C8Ø als auch von Natriumcholat steigerte die Transformationsrate im Vergleich zum separierten Überstand ohne Zusätze enorm. Die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton betrug beim Zusatz von ASB-C8Ø 290 mg L⁻¹, was einer Steigerung der Produktausbeute um den Faktor 3,9 im Vergleich zum reinen separierten Überstand entsprach. Die Transformationsrate war so hoch, dass die Gehalte selbst im Vergleich zur Umsetzung von (+)-Valencen mit einem Rekombinat um den Faktor 2,1 gesteigert wurden. Beim Zusatz von Natriumcholat betrug die Summe der Gehalte 212 mg L⁻¹ (Faktor 2,9 im Vergleich zum separierten Überstand, Faktor 1,6 im Vergleich zum Rekombinat). Der kombinierte Einsatz von ASB-C8Ø und Natriumcholat ist hingegen nicht notwendig: Im Vergleich zur Verwendung von ASB-C8Ø wurde keine weitere Steigerung der Produktausbeuten beobachtet (Abbildung 2.31).

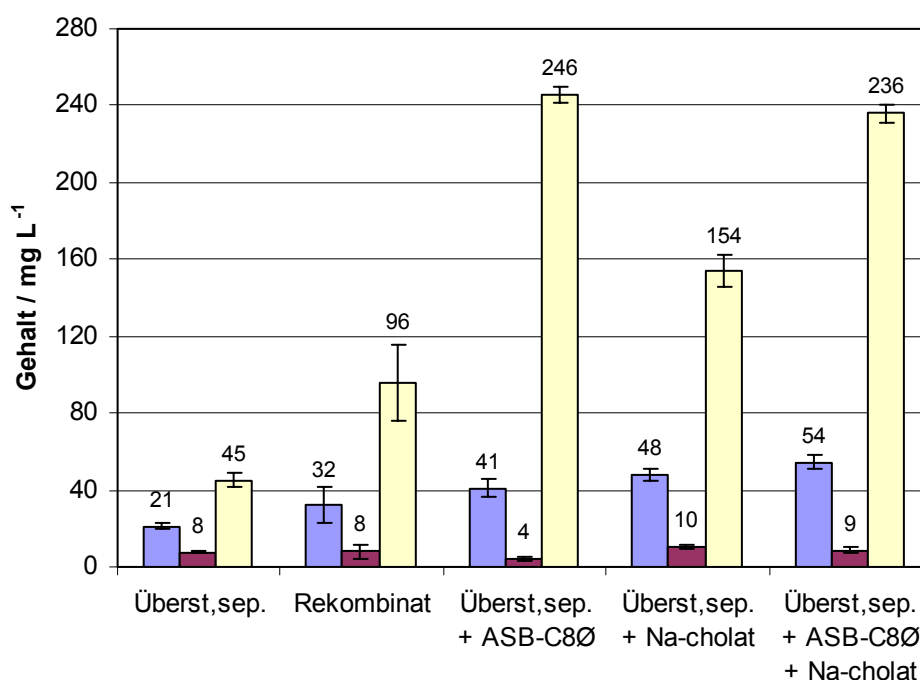


Abbildung 2.31: Umsetzung von (+)-Valencen mit separiertem Überstand unter Zugabe von Detergenzien zum Transformationspuffer; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit separiertem Überstand (Überst,sep.) unter Zusatz von ASB-C8Ø (0,05%, w/v) und Na-cholat (0,20%, w/v) sowie eines Rekombinats von separiertem Überstand mit gewaschenem, deaktiviertem Rückstand für 24 Stunden in einem Volumen von 1,5 mL; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.3.7 Ersatz der im Filtrat befindlichen Komponente

Es wurde untersucht, ob die durch Ultrafiltration des separierten Lyophilisatüberstandes abtrennbare dritte Komponente (2.3.5.3) durch den Einsatz von Metallsalzen ersetzt werden kann. Dazu wurde separierter Überstand von *Pleurotus sapidus* mit Ultrafiltrationseinheiten konzentriert. Ein Aliquot des Konzentrats wurde mit Puffer aufgefüllt. Der anderen Hälfte wurden zusätzlich Metallsalze in Form einer Spurenelementlösung (5.4.1, Tabelle 5.10) zugesetzt. Nach Rekombination der Enzymlösungen mit gewaschenem, deaktiviertem Rückstand (5.6.2.10) wurde (+)-Valencen transformiert. Die genaue Durchführung ist unter 5.6.2.11 beschrieben.

Der Zusatz der Spurenelementlösung erhöhte die Transformationsleistung nicht: Im Vergleich zu der Transformation mit einem Rekombinat (337 mg L^{-1}) betrug die Summe der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton des Transformationsansatzes ohne Zusatz von Spurenelementen 61% (206 mg L^{-1}), unter Zusatz der Spurenelementlösung 59% (200 mg L^{-1}).

2.3.8 Reversible Inhibierung

Bereits ein 150 mM Zusatz von Natriumchlorid zum Transformationspuffer minderte die Aktivität stark (vergleiche 2.3.2.3). Es wurde überprüft, ob durch Umpufferung auf einen natriumchloridfreien Puffer die Aktivität wieder hergestellt werden kann. Dazu wurde Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* mit natriumchloridhaltigem Puffer (1,0 M NaCl) separiert (5.6.2.8) und rekombiniert (5.6.2.9). Zusätzlich wurde der separierte Überstand auf natriumchloridfreiem Puffer umpuffert (5.6.2.12) und mit deaktiviertem Rückstand rekombiniert (5.6.2.10). Verglichen wurden die Ausbeuten mit einem Rekombinat (5.6.2.9), welches zuvor mit natriumchloridfreiem Puffer separiert (5.6.2.8) wurde. Die Rekombinate wurden zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.1).

Durch Umpufferung auf einen natriumchloridfreien Transformationspuffer wurde ein Großteil der Aktivität wieder hergestellt. Die Aktivität wurde somit durch den Zusatz von Natriumchlorid nicht irreversibel vermindert, sondern lediglich reversibel inhibiert. Im Vergleich zum Rekombinat betrug der Gehalt von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton in Summe 83%, unter Zusatz von Kochsalz wurden hingegen nur 5% der Zielprodukte gebildet (Abbildung 2.32).

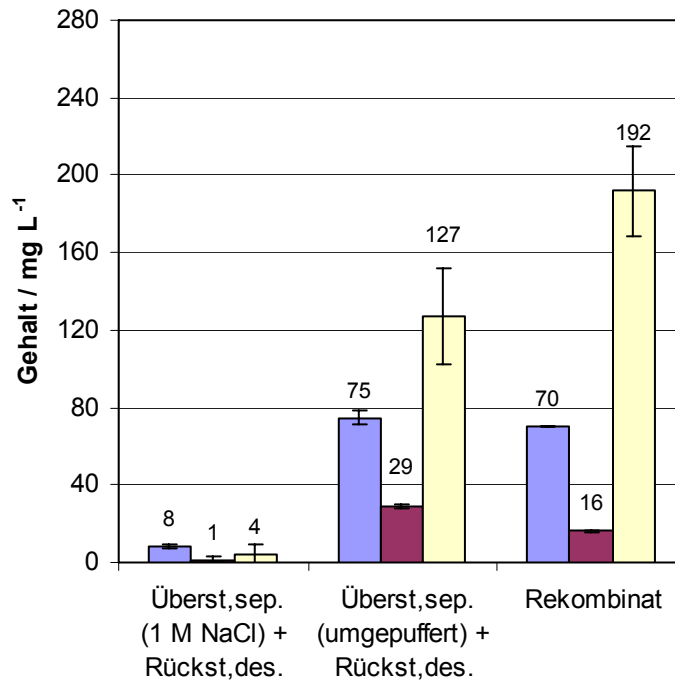


Abbildung 2.32: Produktausbeuten nach Transformation unter NaCl-Zusatz sowie nach Umpufferung auf NaCl-freien Puffer im Vergleich zur Transformation eines Rekombinats; 24-stündige Transformation von 10 μL (+)-Valencen; Puffer: 20 mM MOPS, pH 7,0;

■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.3.9 Lagerstabilität

Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde mit Puffer versetzt, für 24 Stunden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, wieder aufgetaut und durch Zugabe von (+)-Valencen die Transformation gestartet (5.6.2.1). Zum anderen wurde rehydratisiertes Lyophilisat durch 30-minütiges Zentrifugieren separiert (5.6.2.8). Sowohl der separierte Überstand als auch der desaktivierte Rückstand wurden für 6 Tage bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, nach dem Auftauen rekombiniert (5.6.2.9) und zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.1). Die gebildeten Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton wurden mit denen einer Standardtransformation nativen Lyophilisats (5.6.2.1) verglichen.

Die Gehalte an Nootkatolen nach Lagerung wiesen keinen signifikanten Unterschied zur direkten Transformation auf. Lediglich die (+)-Nootkatongehalte waren im Vergleich erniedrigt: Nach 24-stündiger Lagerung des rehydratisierten Lyophilisats wurden 89%, nach 6-tägiger Lagerung der separierten Komponenten 94% nachgewiesen (Abbildung 2.33). Eine Lagerung, vor allem der separierten Komponenten, über diese Zeiträume war somit problemlos möglich.

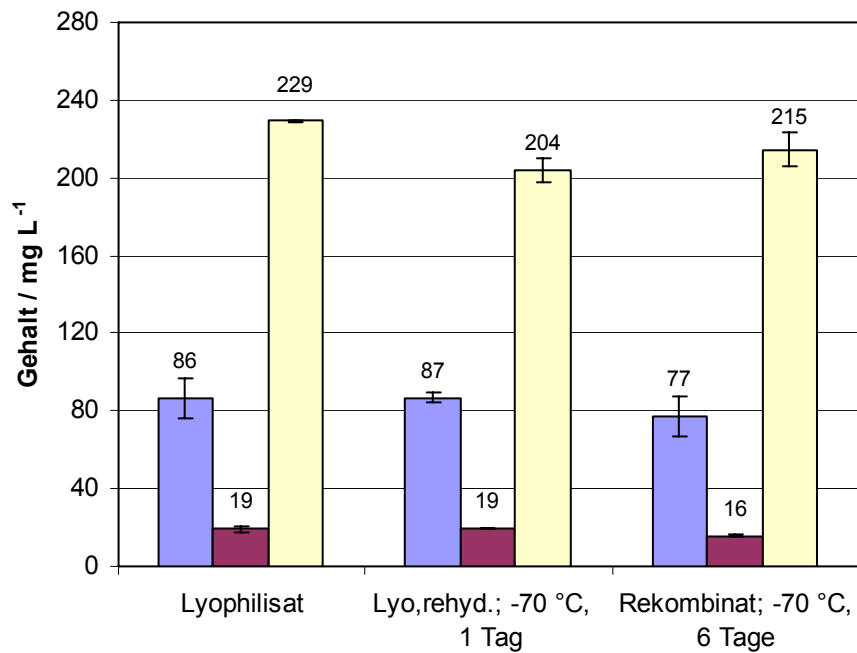


Abbildung 2.33: Produktausbeuten nach Lagerung bei -70 °C im Vergleich zur direkten Umsetzung; Transformation von 10 μ L (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat, gelagertem rehydratisiertem Lyophilisat (Lyo, rehyd.; -70 °C, 1 Tag) und gelagertem, rekombiniertem Lyophilisat (Rekombinat; -70 °C, 6 Tage) in 1,5 mL 20 mM MOPS, pH 7,0 für 24 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.3.10 Einfluss der Sauerstoffsättigung und von Deuteriumoxid auf die Produktausbeuten

Nach Anreicherung des Transformationspuffers mit Sauerstoff (5.6.2.14) wurde (+)-Valencen mit Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* transformiert (5.6.2.1).

Die Anreicherung mit Sauerstoff führte zu keiner Steigerung der Transformationsaktivität (Abbildung 2.34). Die Transformationen zeigten mit 101 mg L^{-1} den gleichen Gehalt an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton in Summe.

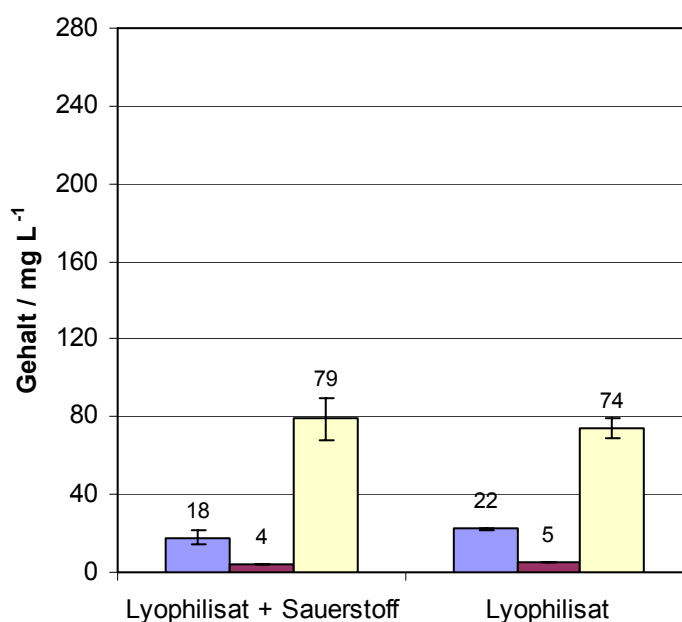


Abbildung 2.34: Produktausbeuten nach Anreicherung des Puffers mit Sauerstoff; Transformation von $1 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit Lyophilisat in $1,5 \text{ mL}$ 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

In einem weiteren Experiment wurde der Transformationspuffer im Ultraschallbad entgast und anschließend Stickstoff durchgeleitet (5.6.2.15). Der so an Sauerstoff abgereicherte Puffer wurde zur Transformation von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat eingesetzt (5.6.2.1).

Die Verwendung eines an Sauerstoff abgereicherten Puffers zur Transformation führte zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität: Im Vergleich zu einer Umsetzung unter Standardbedingungen wurden nur 6% der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton quantifiziert (Abbildung 2.35).

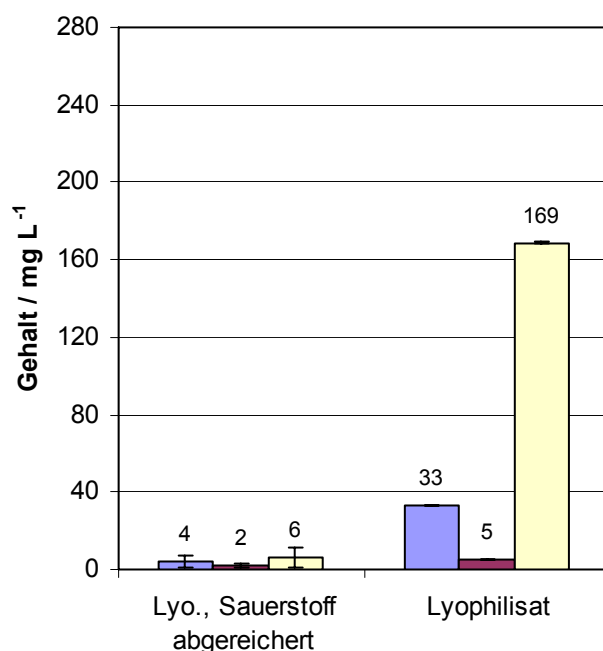


Abbildung 2.35: Produktausbeuten nach Abreicherung des Puffers mit Sauerstoff (Lyo., Sauerstoff abgereichert); Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 24 Stunden;
 ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Als weiterer Schritt zur Aufklärung der Reaktionspartner wurde als Transformationsmedium Deuteriumoxid verwendet (5.6.2.1 und Tabelle 2.10). Durch massenspektrometrische Untersuchungen der Transformationsprodukte (5.10.2.3) wurde festgestellt, ob Deuterium anstelle von Wasserstoff bei der Bildung des α - und β -Nootkatols in die Hydroxy-Gruppe eingeführt wurde.

Tabelle 2.10: Ergebnisse der Transformation von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisat in Deuteriumoxid

	Gehalt / mg L ⁻¹	Standardabweichung / mg L ⁻¹
α -Nootkatol	19,99	0,030
β -Nootkatol	7,2	0,35
(+)-Nootkaton	42	1,2
Summe	68	

Für α -Nootkatol (C₁₅H₂₄), welches durch Transformation von (+)-Valencen in Deuterium-freien Puffer erhalten wurde, betrug die relative Intensität des Isotopenpeaks (221 m/z) bezogen auf das Molekülion (220 m/z) 19,3% (Abbildung 2.36). Für α -Nootkatol, welches in Deuteriumoxid gebildet wurde, betrug die relative Intensität 17,3%. Bei einer theoretischen relativen Intensität von 16,5%, welche sich aus der natürlichen Isotopenverteilung von 1,1% für Kohlenstoff ergibt (MacLafferty und Tureček 1995), wurde der Einbau von Deuterium in die Hydroxy-Gruppe des α -Nootkatols im Rahmen der Messgenauigkeit ausgeschlossen. Analoges galt für die Biogenese von β -Nootkatol.

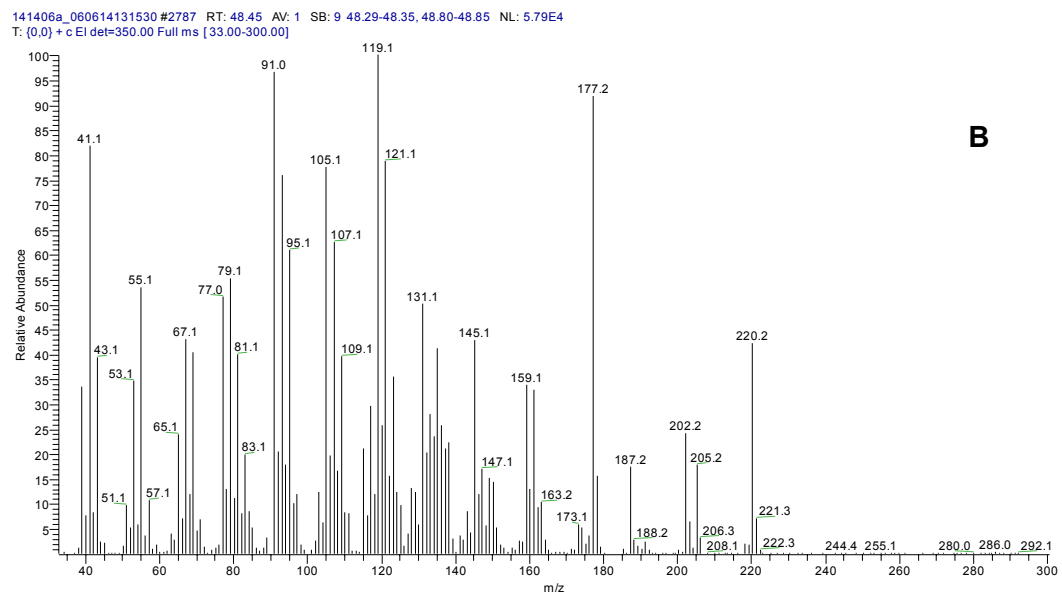
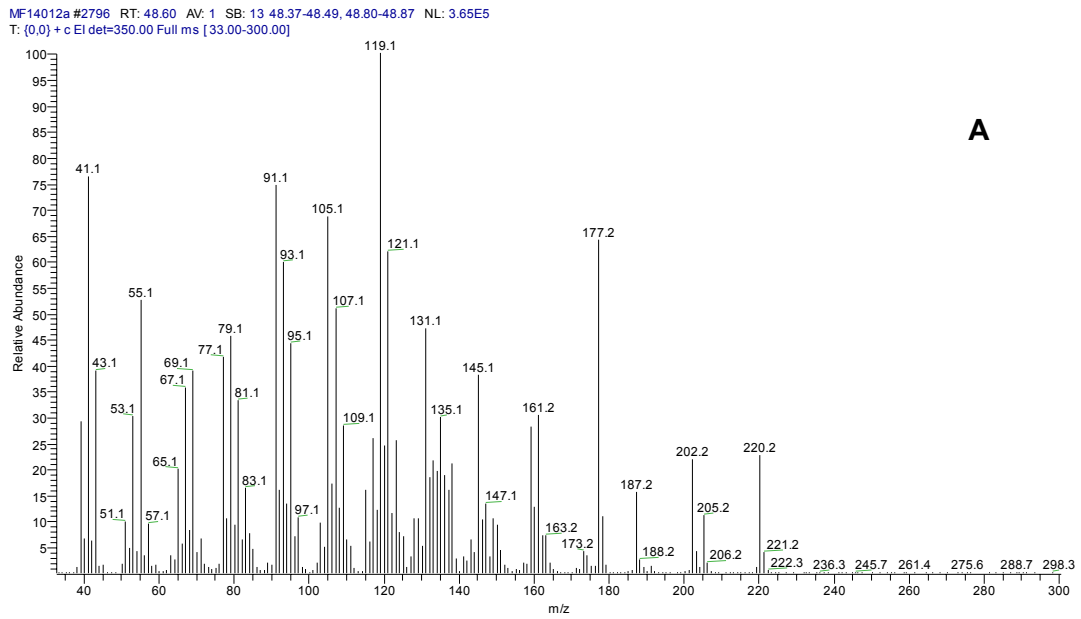


Abbildung 2.36: Massenspektren von α -Nootkatol nach Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 (Abbildung A) und in 1,5 mL D₂O (Abbildung B) für 24 Stunden

2.3.11 Weitere Charakterisierung des Transformationssystems

Die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von 0,04% (w/v) Soja-Lecithin (5.6.2.1) führte bezogen auf die Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton zu einer Steigerung der Transformationsrate um 25% (Abbildung 2.37).

Die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* in Gegenwart von 1 mM EDTA (5.6.2.1) steigerte die Transformationsrate um 86%.

Der Zusatz von Detergenzien (0,05% (w/v) ASB-C8Ø, 0,20% (w/v) Natriumcholat) zu separiertem Überstand aus Lyophilisat von *P. sapidus* (5.6.2.3) und die anschließende Transformation von (+)-Valencen (5.6.2.1) führte zu einem ähnlich hohen Anstieg der Transformationsaktivität (Steigerung um 77% im Vergleich zur Umsetzung von (+)-Valencen mit einem Rekombinat (5.6.2.9) aus separiertem Überstand und deaktiviertem Rückstand).

Nach Separation von Überstand (100 mM MOPS, pH 7,0; 5.6.2.8) und Konzentrierung um den Faktor 5 (5.6.2.12) wurde das Retentat mit gewaschenem, deaktiviertem Lyophilisat rekombiniert (5.6.2.10) und zur Transformation von 10 μ L (+)-Valencen eingesetzt (Einfachbestimmung, 5.6.2.1): Eine Steigerung der Gehalte um 75% wurde beobachtet, allerdings wurde die Ausbeute beim Einsatz der fünffach konzentrierten Enzymlösung lediglich um den Faktor 1,8 gesteigert.

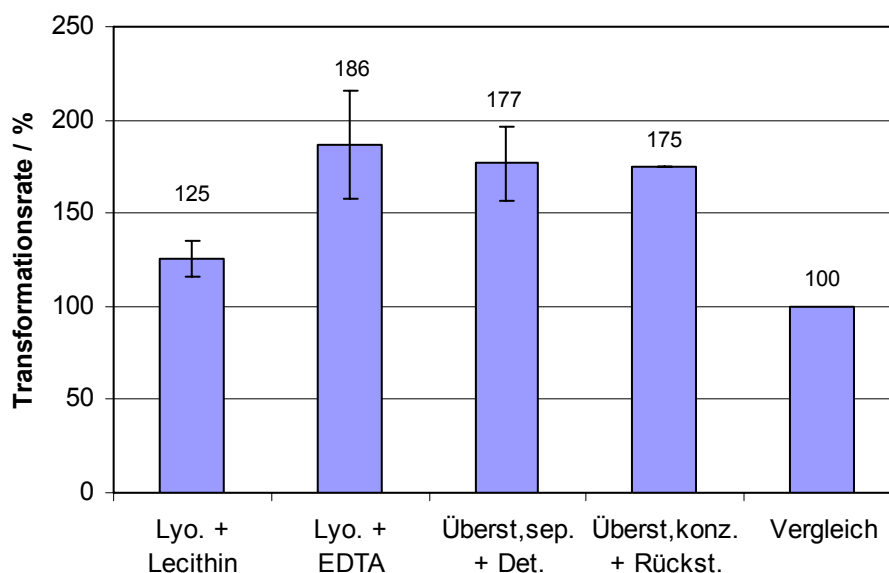


Abbildung 2.37: Transformationsraten nach Umsetzung von (+)-Valencen mit Lyophilisaten (Lyo.) in Gegenwart von Lecithin und EDTA, mit separiertem Überstand (Überst, sep.) und Detergenzien (Det.) sowie einem Rekombinat aus konzentriertem Überstand (Überst, konz.) und deaktiviertem Rückstand (Rückst.) bezogen auf den jeweiligen Vergleich

Die Transformationsdauer der Umsetzung von (+)-Valencen mit Lyophilisat wurde von 24 Stunden auf 48 beziehungsweise 72 Stunden erhöht (5.6.2.1). Dies führte allerdings zu keiner gesteigerten Transformationsleistung, sondern zu geringeren Produktkonzentrationen (Σ nach 24 Stunden: 338 mg L⁻¹; nach 48 Stunden: 249 mg L⁻¹, 74%; nach 72 Stunden: 266 mg L⁻¹, 79%).

Die Gegenwart von Detergenzien (0,05% (w/v) ASB-C8Ø, 0,20% (w/v) Natriumcholat) im Transformationsansatz führte bei der Umsetzung von 5 µL (+)-Valencen durch Lyophilisat von *P. sapidus* (5.6.2.1) zu einer Verringerung der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton um 12% (Σ 386 mg L⁻¹) im Vergleich zur analogen Transformation ohne Zusätze (Σ 439 mg L⁻¹).

(+)-Valencen wurde mit Lyophilisat von *P. sapidus* unter Zusatz von 10 nM, 10 µM und 10 mM Wasserstoffperoxid transformiert (5.6.2.1). Der Zusatz von 10 nM Wasserstoffperoxid zum Transformationssystem übte keinen Einfluss auf die Aktivität aus (Σ 218 mg L⁻¹, 105% im Vergleich zur analogen Transformation ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid). Bei einem 10 mM Zusatz wurden hingegen nur 87% der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton quantifiziert. Bei einem 10 µM Zusatz wurde eine Steigerung der Aktivität festgestellt (Σ 250 mg L⁻¹, 121%), jedoch mit einer hohen relativen Standardabweichung des Nootkatongehalts von 37%.

Unter Zusatz von 5,4 µL Linolsäure (55%ig) wurde (+)-Valencen mit Lyophilisat von *P. sapidus* transformiert (5.6.2.1), wobei der Zusatz von Linolsäure zu einer Abnahme der Transformationsaktivität führte (Σ 74% im Vergleich zur analogen Transformation ohne Zusatz von Linolsäure).

Laccase-haltige Kulturüberstände von *P. sapidus* (5.4.4.3) wurden konzentriert (5.6.2.12, Konzentrationsfaktor 9,3), und je 1,5 mL des nicht konzentrierten sowie des konzentrierten Kulturüberstandes zur Transformation von 10 µL (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.3). Im Vergleich zur Umsetzung von 10 µL (+)-Valencen mit Lyophilisat aus *P. sapidus* in 100 mM MOPS, pH 7,0 (5.6.2.1) wurden nur geringe Gehalte an Zielprodukten quantifiziert (Kulturüberstand: 25 mg L⁻¹ (+)-Nootkaton; Σ 33 mg L⁻¹, 9%; Kulturüberstand, konzentriert: 25 mg L⁻¹ (+)-Nootkaton; Σ 42 mg L⁻¹, 12%). Zusätzlich wurde die Laccase-Aktivität bestimmt (5.5.6, Kulturüberstand: 1.901 U L⁻¹; konzentrierter Überstand: 17.596 U L⁻¹).

2.4 Enzymreinigung

2.4.1 Proteinpräzipitation

Zur Proteinreinigung wurde in einem ersten Schritt eine Präzipitation mit Ethanol durchgeführt und auf Erhalt der Aktivität geprüft. Dazu wurde separierter Überstand von Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.8) mit gekühltem Ethanol auf Endkonzentrationen zwischen 10% und 80% eingestellt (5.9.4.1), die ausgefallenen Proteine resuspendiert, mit deaktiviertem Rückstand versetzt (5.6.2.10) und zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.1).

Im Vergleich zu den Produktausbeuten der Transformation von (+)-Valencen mit einem Rekombinat aus separiertem Überstand und deaktiviertem Rückstand wurden ab einer Ethanolkonzentration in der Lösung von 40%, mit Ausnahme der Fällung mit 50% Ethanol, vergleichbare Gehalte an (+)-Nootkaton erzielt (Abbildung 2.38).

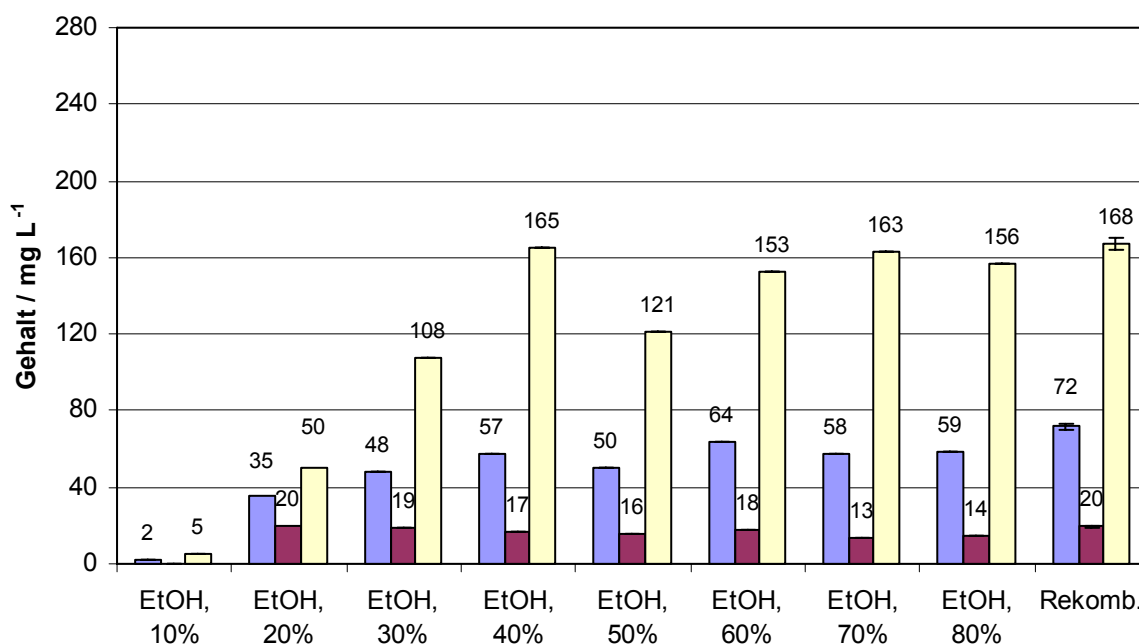


Abbildung 2.38: Produktausbeuten nach Proteinpräzipitation in Abhängigkeit von der verwendeten Ethanolkonzentration; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 suspendierten Präzipitaten nach Ethanolfällung, rekombiniert mit 50 mg deaktiviertem Rückstand für 24 Stunden in Einfachbestimmung;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Bei der Verwendung einer Endkonzentration von 40% konnte in größeren Ansätzen (Volumen des separierten Überstandes größer als 1,5 mL) das Präzipitat nur schwer von der Lösung abgetrennt werden, da es aufschwamm. Dies war bei Endkonzentrationen ab 50% nicht mehr zu beobachten.

2.4.2 SDS-PAGE nach Proteinpräzipitation (Silberfärbung)

Die Proteine eines separierten Überstandes wurden mit Ethanol gefällt und anschließend eine SDS-PAGE mit Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurde Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* separiert (5.6.2.8) und der separierte Überstand mit gekühltem Ethanol auf eine Endkonzentration von 60% eingestellt. Die ausgefallenen Proteine wurden resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.9.4.1). Der klare Überstand des Präzipitats wurde für eine SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen (5.11.1) mit anschließender Silberfärbung (5.11.4) eingesetzt.

Obwohl sowohl der separierte Lyophilisatüberstand (*Über.*) als auch der klare Überstand nach 60%iger Ethanolfällung (*EtOH*) das gleiche Volumen besaßen, fiel der enorme Konzentrationsunterschied (Abbildung 2.39 A) bei vergleichbarer Aktivität auf (2.4.1, Abbildung 2.38). Die einzig deutlich ausgeprägten Banden nach Ethanolfällung befanden sich um 15 kDa. Bei höheren Molekulargewichtsbereichen trat keine Bande deutlich hervor (Abbildung 2.39 B).

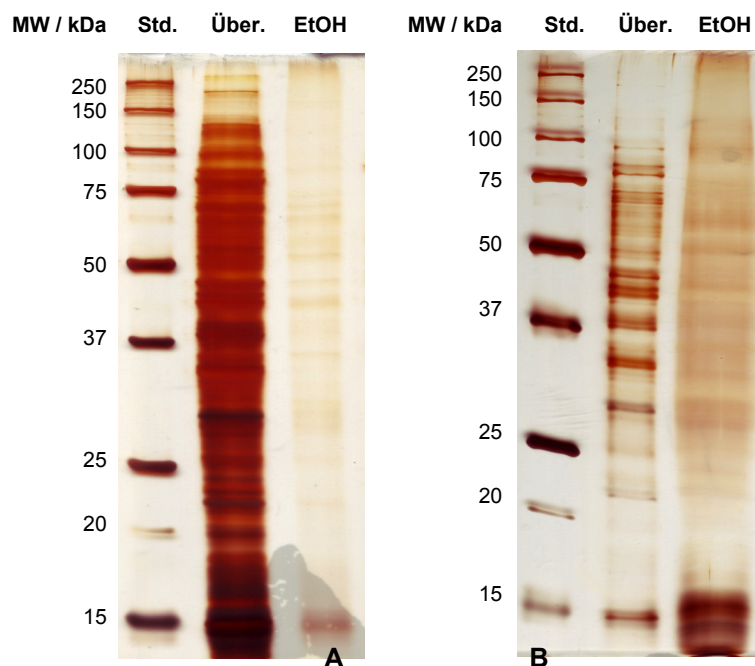


Abbildung 2.39: Gele (12%ig) einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung; MW = Molekulargewicht, Std. = Standard (1 μL); **A**: *Über.* = separierter Überstand (6 μL), *EtOH* = klarer Überstand nach 60%iger Ethanolfällung (6 μL); **B**: *Über.* = separierter Überstand (0,5 μL), *EtOH* = klarer Überstand nach 60%iger Ethanolfällung (20 μL)

2.4.3 FPLC – Ionenaustauschchromatographie (IEX DEAE HiPrep FF)

2.4.3.1 Verwendung eines linearen Gradientens

Zur Proteinreinigung mit Hilfe der FPLC wurde ein schwacher Anionenaustauscher verwendet. Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde separiert (5.6.2.8), 2 mL des separierten Überstandes wurden in die FPLC injiziert und die gebundenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 1 M Natriumchlorid eluiert (5.10.4.1, Tabelle 5.20; Abbildung 2.40). Die Fraktionen 02 bis 16, Fraktionen 17 bis 40, Fraktionen 41 bis 61 und Fraktionen 62 bis 83 wurden vereint und mit Laufpuffer ad 50 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die gepoolten Fraktionen mit 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert, auf circa 400 μ L konzentriert (5.6.2.12), mit separat erzeugtem Filtrat (5.6.2.13) ad 1,5 mL aufgefüllt sowie mit deaktiviertem Rückstand versetzt (5.6.2.10) und die Transformation nach Zugabe von 1 μ L (+)-Valencen gestartet (5.6.2.1).

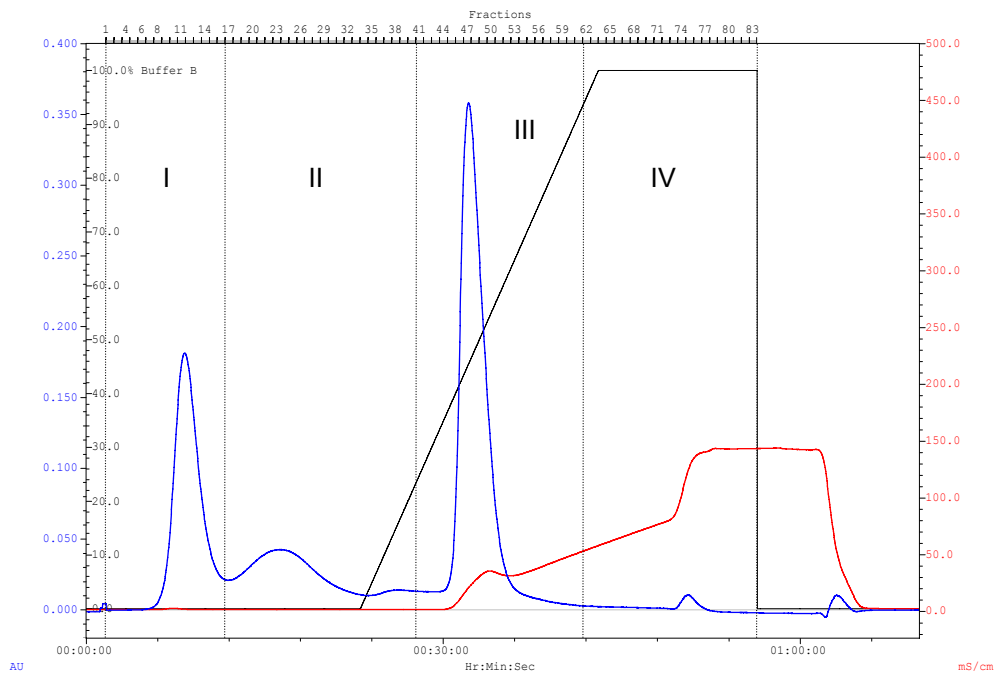


Abbildung 2.40: FPLC-Chromatogramm der Reinigung von separiertem Überstand an einer DEAE-Säule; Laufpuffer 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl, Flussrate: 3,0 mL min⁻¹, Probenvolumen: 2,0 mL, Fraktionsgröße: 2,0 mL;
 — UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm) — Leitfähigkeit — % Puffer B

Pool III wies eine hohe Transformationsaktivität auf (Abbildung 2.41). In den anderen Transformationsansätzen wurde α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol lediglich in Gehalten nachgewiesen, die denen des Blindwertes (5.6.2.5) entsprachen.

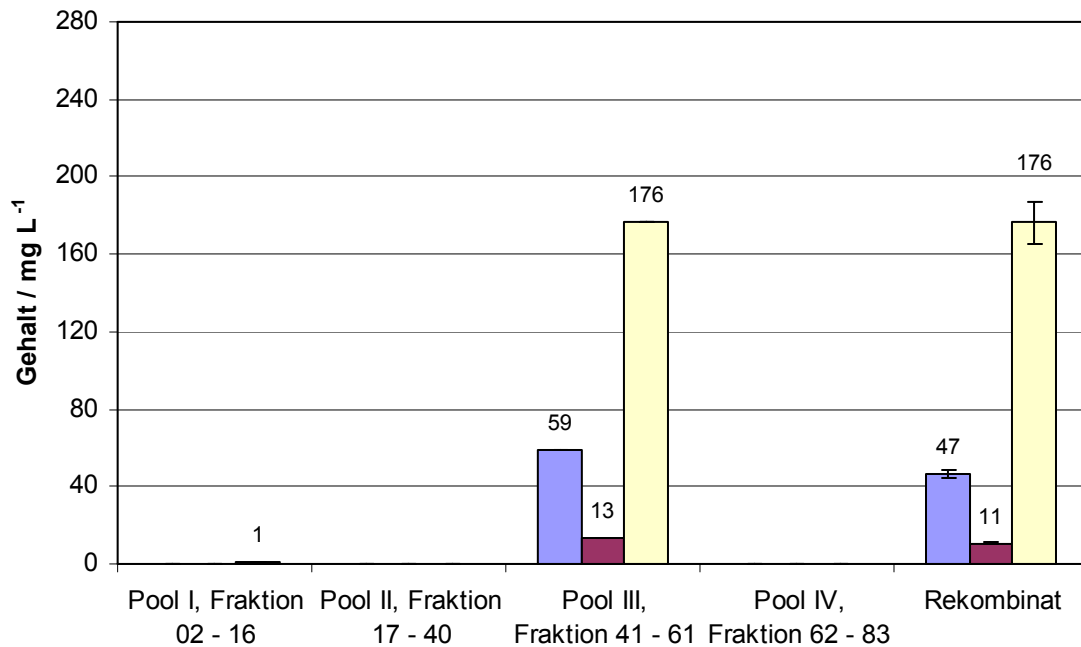


Abbildung 2.41: Produktausbeuten nach Transformation mit gepoolten, umgepufferten FPLC-IEX-DEAE-FF-Fractionen, rekombiniert mit Filtrat und deaktiviertem Rückstand; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.4.3.2 Verwendung eines Stufengradienten

Zur Verbesserung der Proteinreinigung wurde der lineare Gradient durch einen optimierten Stufengradient ersetzt. Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde separiert (5.6.2.8) und 2 mL des separierten Überstandes in die FPLC injiziert. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch einen dreistufigen Salzgradient mit 70 mM, 200 mM und 2 M Natriumchlorid eluiert (5.10.4.1, Tabelle 5.21).

Die Fraktionen 09 bis 19 (Abbildung 2.42) wurden vereint und mit Laufpuffer ad 30 mL aufgefüllt. Anschließend wurden die gepoolten Fraktionen mit 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert, auf circa 400 μ L konzentriert (5.6.2.12), mit separat erzeugtem Filtrat (5.6.2.13) ad 1,5 mL aufgefüllt sowie mit desaktiviertem Rückstand versetzt (5.6.2.10) und nach Zugabe von (+)-Valencen die Transformation gestartet (5.6.2.1).

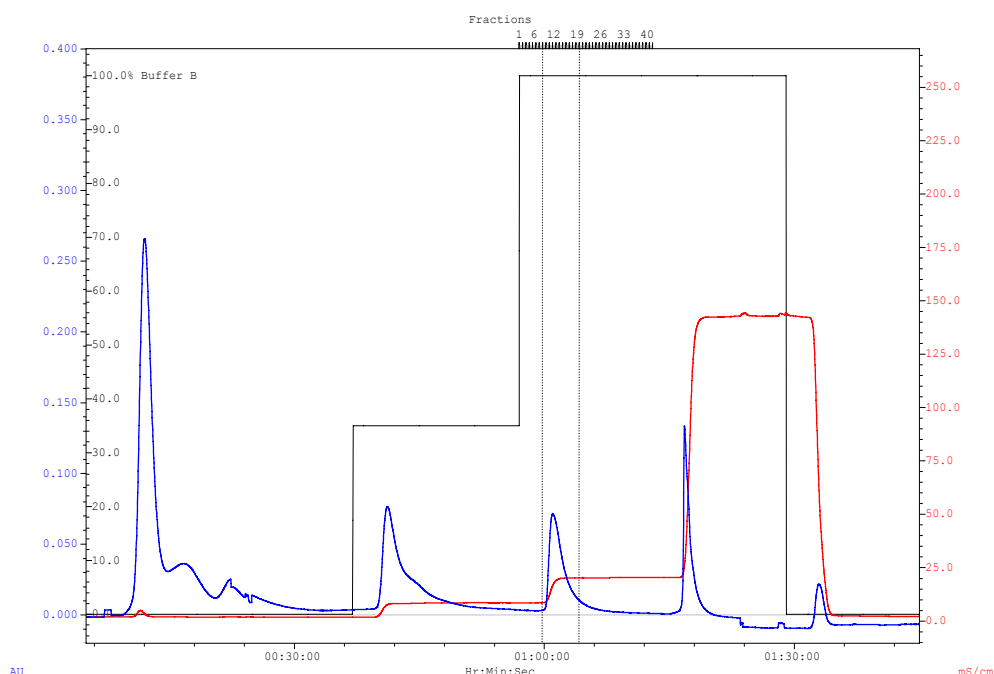


Abbildung 2.42: FPLC-Chromatogramm einer Reinigung von separiertem Überstand an einer DEAE-Säule; Laufpuffer 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Elution mit Stufengradient mit 70 mM, 200 mM und 2 M NaCl-Zusatz, Flussrate: 5,0 mL min⁻¹, Probenvolumen: 2,0 mL, Fraktionsgröße: 2,0 mL;
 — UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm) — Leitfähigkeit — % Puffer B

Im vereinten Pool der Fraktionen 09 bis 19 wurden 53% der Aktivität (Summe der Gehalte von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton) im Vergleich zu einer Transformation von (+)-Valencen mit rekombiniertem separiertem Überstand und desaktiviertem Rückstand wiedergefunden (Abbildung 2.43).

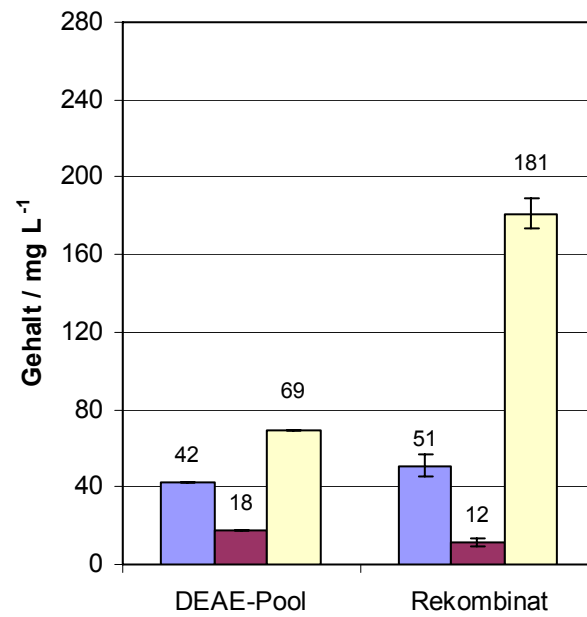


Abbildung 2.43: Produktausbeuten nach Transformation mit gepoolten, umgepufferten FPLC-IEX-DEAE-FF-Fraktionen, rekombiniert mit Filtrat und deaktiviertem Rückstand;

Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit DEAE-Pool (Fraktion 09 - 19) in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

2.4.4 FPLC – Ionenaustauschchromatographie (IEX SP FF)

Zur Proteinreinigung mit Hilfe der FPLC wurde neben einem schwachen Anionenaustauscher (2.4.3) ein starker Kationenaustauscher verwendet. Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde separiert (5.6.2.8), 3 mL des Überstandes wurden auf 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert (5.6.2.12), ad 3 mL mit Puffer aufgefüllt und in die FPLC injiziert. Die Proteine wurden mit einem linearen Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl eluiert (5.10.4.1, Tabelle 5.23). Die Fraktionen 02 bis 11 (Abbildung 2.44) wurden einzeln umgepuffert (5.6.2.12), mit deaktiviertem Rückstand versetzt (5.6.2.10) und zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.2.1).

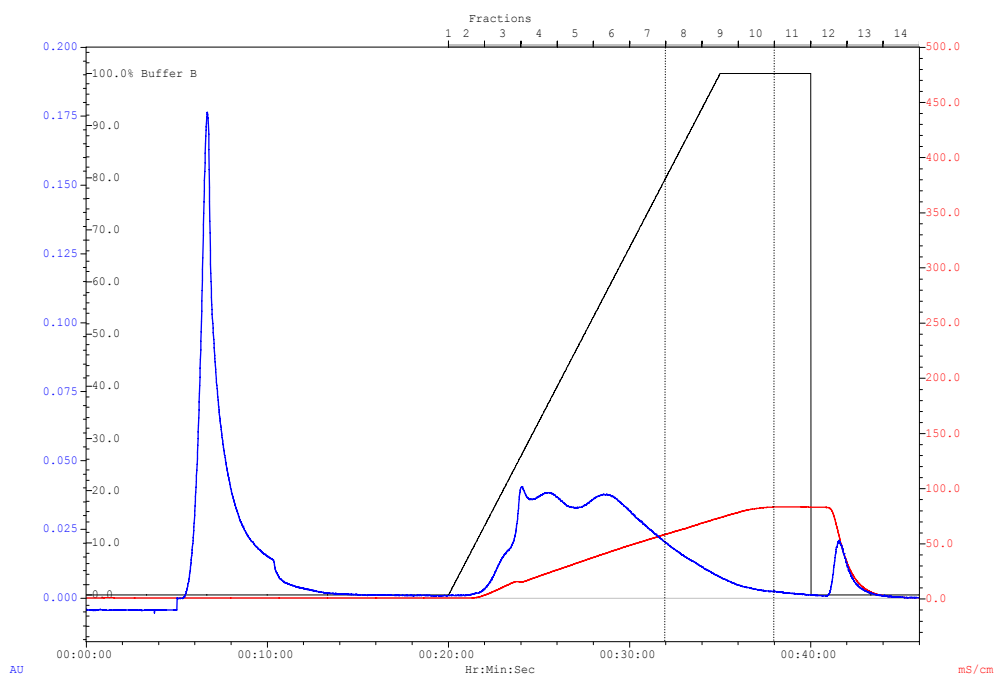


Abbildung 2.44: FPLC-Chromatogramm der Reinigung von separiertem Überstand an einer SP-FF-Säule; Laufpuffer 20 mM Na-Citrat, pH 3,0, linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl, Flussrate: 1,0 mL min⁻¹, Probenvolumen: 2,0 mL, Fraktionsgröße: 2,0 mL;
 — UV-Absorption ($\lambda = 280 \text{ nm}$) — Leitfähigkeit — % Puffer B

Mit Hilfe des Kationenaustauschers (HiTrap SP FF) wurden das beziehungsweise die Zielenzym/e gebunden. Die gesuchte Aktivität wurde in den Fraktionen 07 bis 11 (hauptsächlich Fraktionen 08 bis 10) lokalisiert (Abbildung 2.45).

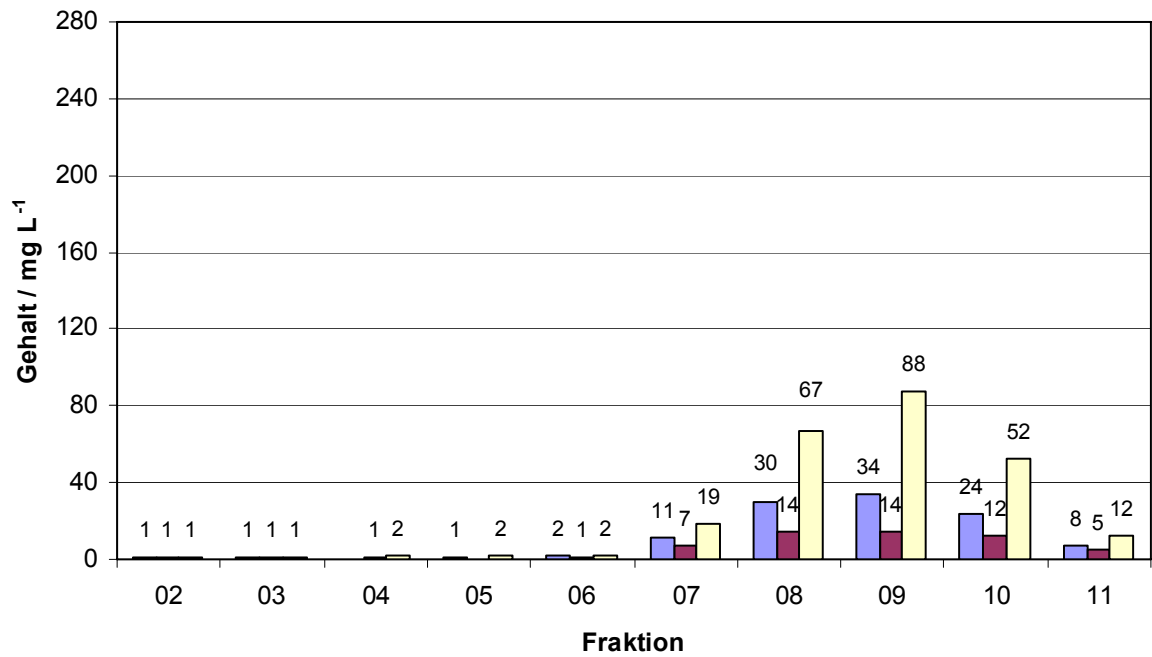


Abbildung 2.45: Produktausbeuten nach Transformation mit gepoolten, umgepufferten Fraktionen, rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit FPLC-IEX-SP-FF-Fractionen in einem Volumen von 1,5 mL für 24 Stunden;
 Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;
 ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.4.5 FPLC – Gelfiltration (GF Superdex 200)

Zur Proteinreinigung wurde neben der Ionenaustauschchromatographie (2.4.3, 2.4.4) zusätzlich eine Gelfiltration durchgeführt. Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde separiert (5.6.2.8) und 3,0 mL des separierten Überstandes auf circa 350 μ L konzentriert (5.6.2.12). 200 μ L des Retentats wurden in die FPLC injiziert (5.10.4.2) und mit Hilfe einer Superdex-200-Säule getrennt. Nach der Chromatographie wurde den Fraktionen 04 bis 14 (Abbildung 2.46) jeweils desaktivierter Rückstand zugesetzt (5.6.2.10) und die Transformation nach Zugabe durch (+)-Valencen gestartet (5.6.2.1).

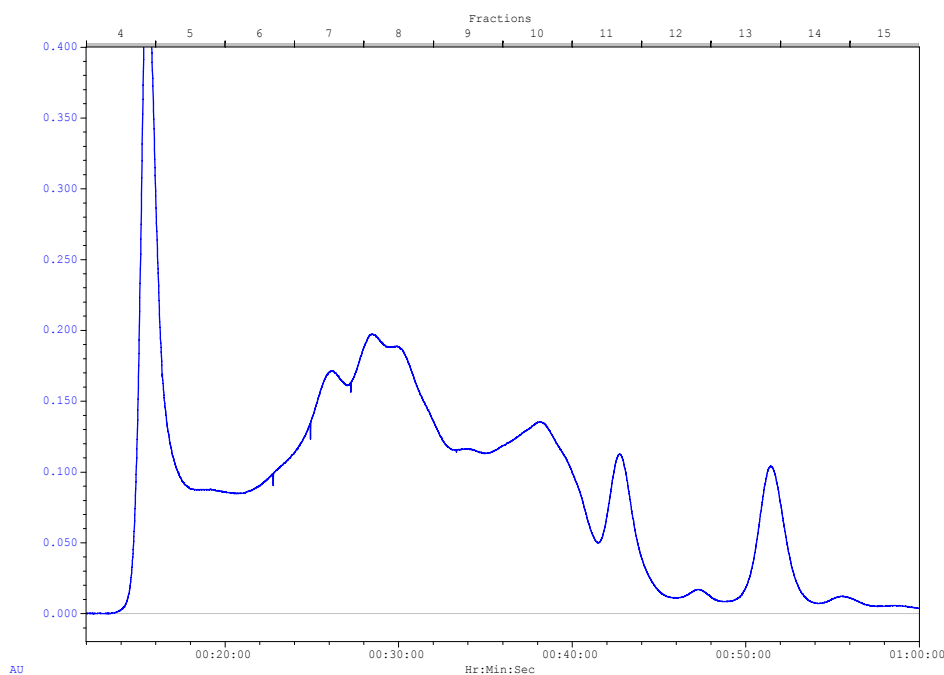


Abbildung 2.46: FPLC-Chromatogramm der Reinigung von separiertem Überstand an einer Superdex-200-Säule; Laufpuffer: 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, Probenvolumen: 200 μ L, Fraktionsgröße: 2,0 mL;
— UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm)

Die Transformationsprodukte α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton wurden nach der Umsetzung mit den Fraktionen 04 bis 08 in signifikanten Mengen nachgewiesen (Abbildung 2.47).

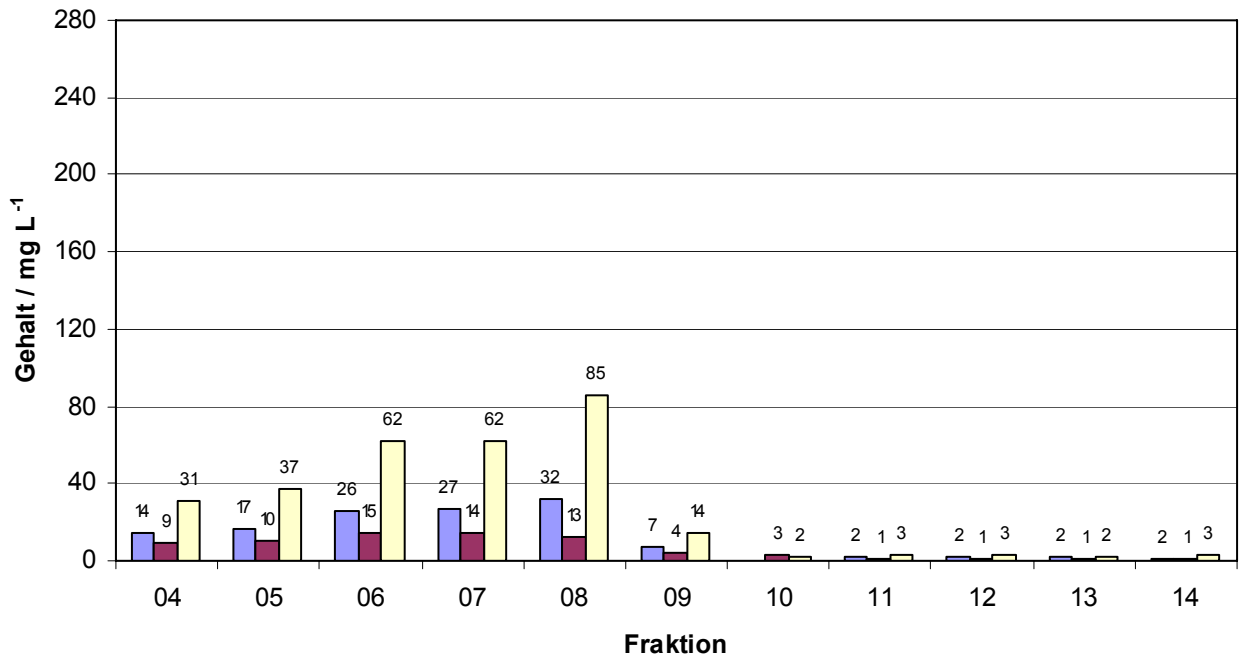


Abbildung 2.47: Produktausbeuten nach Transformation mit FPLC-Fractionen, rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit FPLC-Superdex-200-Fractionen für 20 Stunden;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Nach Kalibrierung der verwendeten Trennsäule (5.10.4.2) entsprach dies einem Molekulargewichtsbereich von 33 bis > 1.300 kDa (Abbildung 2.48). Die Hauptaktivität wurde in Fraktion 08 lokalisiert (33,3 bis 87,5 kDa).

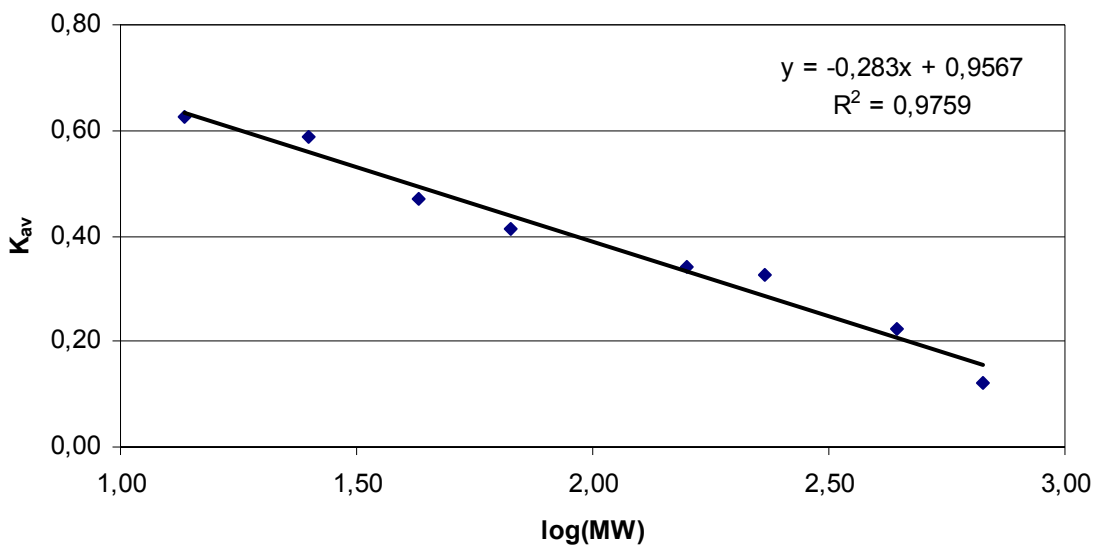


Abbildung 2.48: Kalibriergrade Superdex-200-Säule

2.4.6 Gelfiltration nach Proteinpräzipitation

Einer Ethanol-fällung (2.4.1) wurde eine Proteinreinigung mit Hilfe der Gelfiltration (2.4.5) angeschlossen. Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurde separiert (5.6.2.8) und eine Proteinpräzipitation mit einer Endkonzentration von 60% Ethanol durchgeführt (5.9.4.2). Der klare Überstand des resuspendierten Präzipitats wurde mit Hilfe der Gelfiltration gereinigt (5.10.4.2). Je 1,0 mL der Fraktionen 04 bis 13 (Abbildung 2.49) wurden ad 1,5 mL Puffer aufgefüllt, mit desaktiviertem Rückstand rekombiniert (5.6.2.10) und nach Zugabe von (+)-Valencen für 22 Stunden transformiert (5.6.2.1).

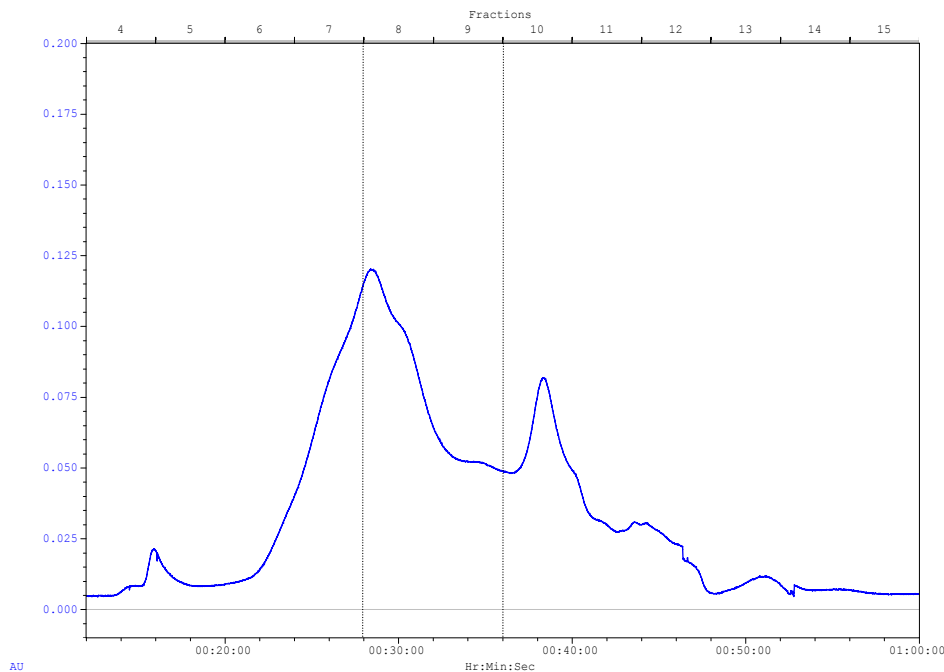


Abbildung 2.49: FPLC-Chromatogramm der Reinigung von zuvor präzipitiertem Überstand an einer Superdex-200-Säule; Laufpuffer: 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Flussrate: 0,5 mL, Probenvolumen: 200 μ L, Fraktionsgröße: 2,0 mL;
— UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm)

Die Transformationsaktivität war in Fraktion 08 und Fraktion 09 lokalisiert (Abbildung 2.50). Dies entspricht den Ergebnissen der mehrstufigen Reinigungsstrategie (2.4.7). Im Gegensatz zur direkten Reinigung mit Hilfe der Gelfiltration war in höheren Molekulargewichtsbereichen keine Aktivität nachweisbar (vergleiche 2.4.5, Abbildung 2.46).

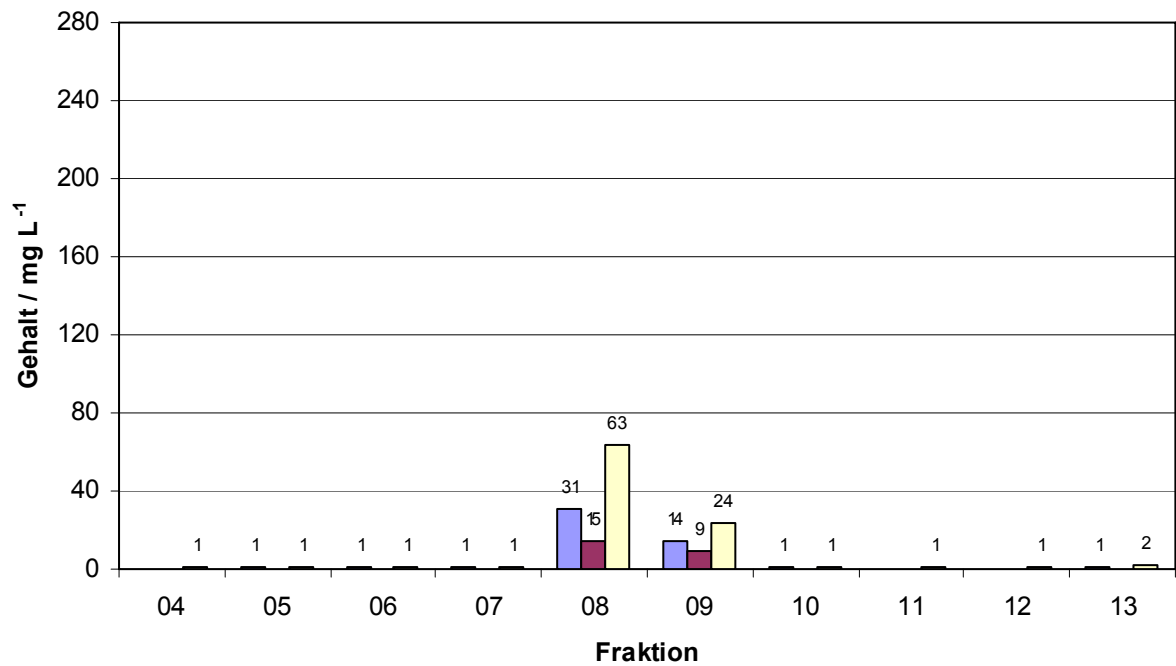


Abbildung 2.50: Produktausbeuten nach Transformation mit FPLC-Fractionen eines resuspendierten Proteinpräzipitats; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen mit FPLC-Fractionen, rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand in einem Volumen von 1,5 mL für 22 Stunden;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

2.4.7 Reinigung über drei chromatographische Stufen (IEX, IEX, GF)

Durch Kombination der unter 2.4.3.2, 2.4.4 und 2.4.5 beschriebenen Reinigungsschritte an der FPLC wurde eine Dreistufenreinigung durchgeführt (5.8.1). 20 mL separierter Überstand aus Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wurden in die FPLC injiziert und mit Hilfe des schwachen Anionenaustauschers DEAE getrennt (analoges Chromatogramm unter Abbildung 2.42). Die das Zielenzym enthaltenden Fraktionen wurden vereint (Reinigungsstufe 1) und mit Natriumcitratpuffer umgepuffert. Anschließend wurde erneut in die FPLC injiziert und mit Hilfe des starken Kationenaustauschers SP Sepharose getrennt (Reinigungsstufe 2, Abbildung 2.51).

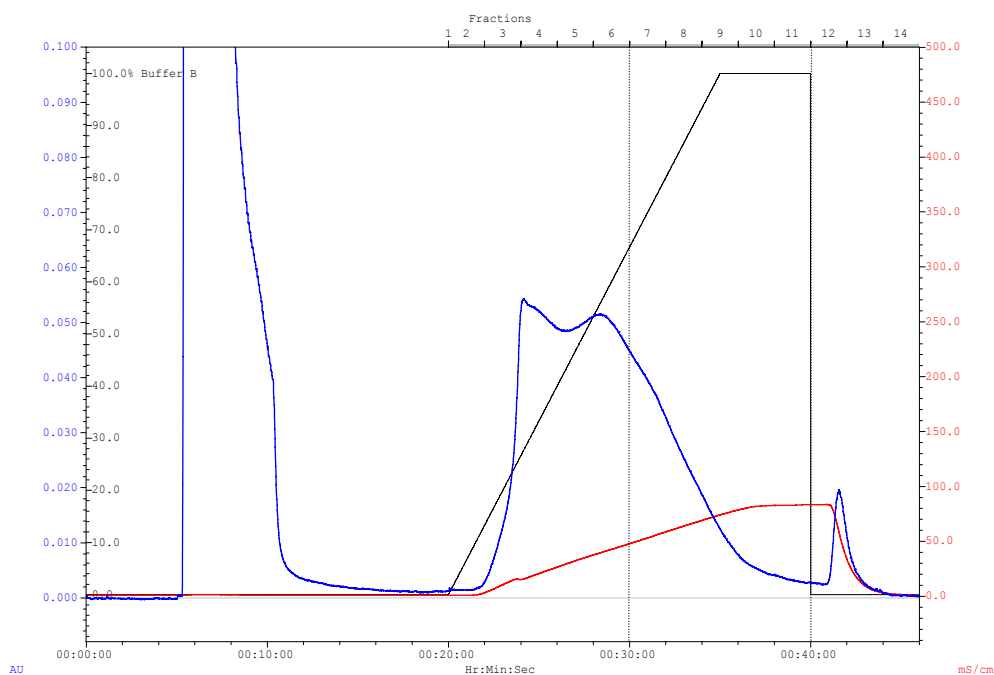


Abbildung 2.51: FPLC-Chromatogramm der zweiten Stufe der 3-Stufenreinigung von separiertem Überstand an einer SP-FF-Säule; Laufpuffer 20 mM Na-Citrat, pH 3,0, linearer Gradient von 0 bis 1 M NaCl, Flussrate: 1,0 mL min⁻¹, Probenvolumen: 2,0 mL, Fraktionsgröße: 2,0 mL;

— UV-Absorption ($\lambda = 280 \text{ nm}$) — Leitfähigkeit — % Puffer B

Die Fraktionen 07 bis 11 wurden vereint, mit 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert, in die FPLC injiziert und durch Gelfiltration an einer Superdex-200-Säule getrennt (Reinigungsstufe 3, Abbildung 2.52).

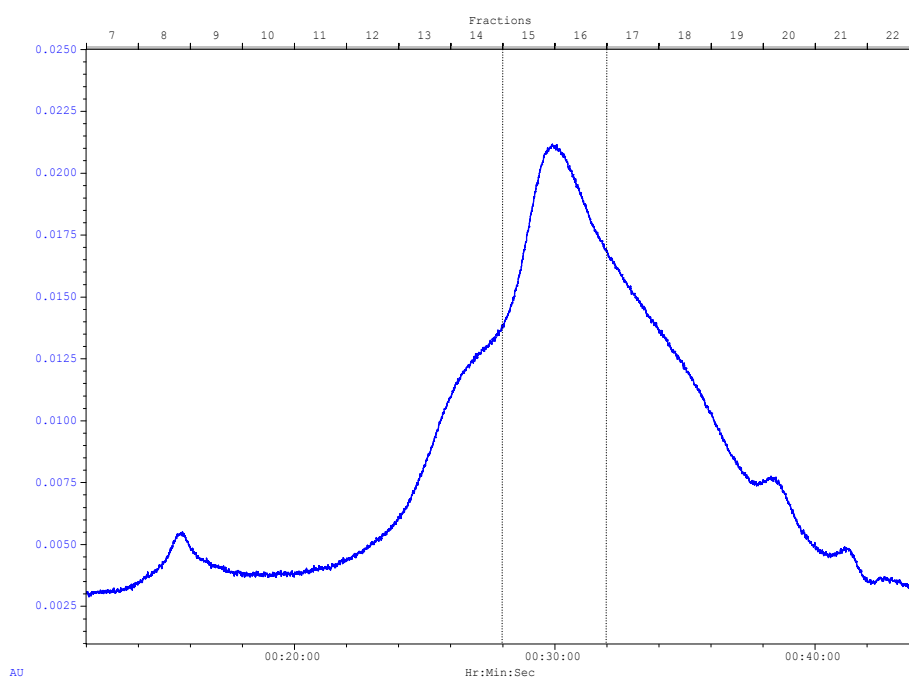


Abbildung 2.52: FPLC-Chromatogramm der dritten Stufe der 3-Stufenreinigung von separiertem Überstand an einer Superdex-200-Säule; Laufpuffer: 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, Probenvolumen: 200 µL, Fraktionsgröße: 1,0 mL;
— UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm)

Nach der letzten Reinigungsstufe wurden die Fraktionen 08, 09 und 12 bis 22 mit desaktiviertem Rückstand kombiniert und zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt.

Die Transformationsprodukte α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton mit Gehalten signifikant über denen des entsprechenden Blindwertes wurden nur nach der Umsetzung mit den Fraktionen 15 und 16 nachgewiesen (Abbildung 2.53).

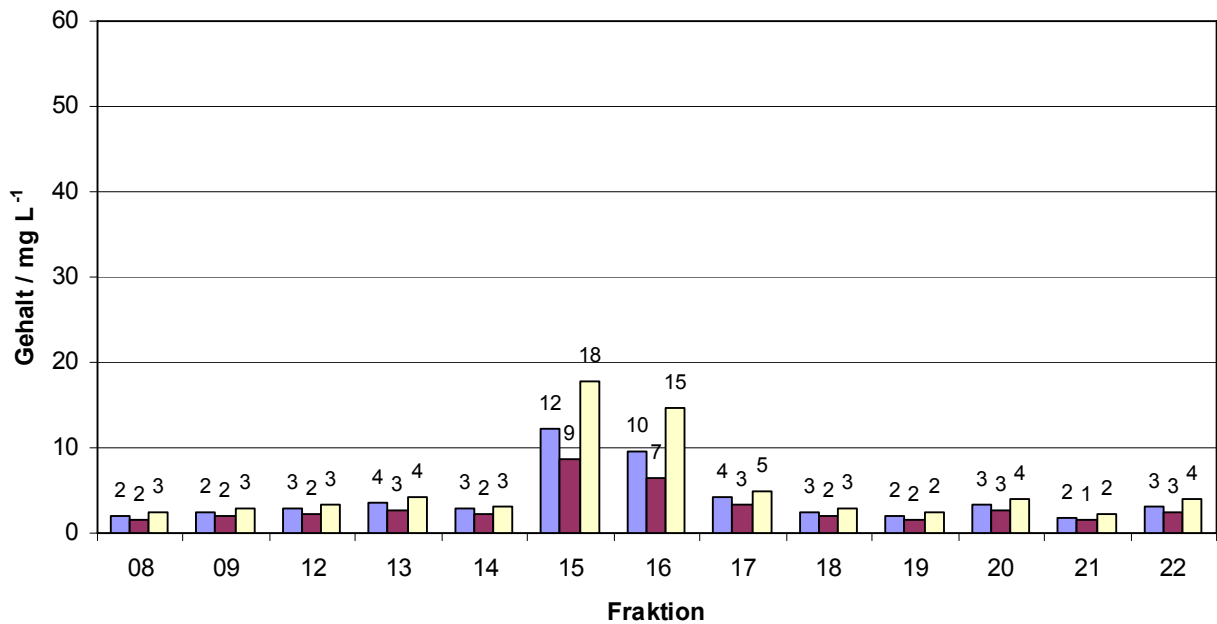


Abbildung 2.53: Produktausbeuten nach Transformation mit FPLC-Fractionen der 3. Reinigungsstufe, rekombiniert mit deaktiviertem Rückstand; Transformation von 1 μ L (+)-Valencen in einem Volumen von 1,5 mL für 20 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5;

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Dies entsprach einem Molekulargewichtsbereich von 33,3 bis 87,5 kDa (vergleiche 2.4.5). Von Fraktion 15 wurde zusätzlich ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen (5.9.1). Das Spektrum wies keine Absorptionsmaxima zwischen 300 und 800 nm auf.

2.4.8 SDS-PAGE nach dreistufiger Reinigung mittels FPLC (Silberfärbung)

Eine SDS-PAGE nach dreistufiger sequenzieller Proteinreinigung mittels FPLC wurde analog 2.4.7 durchgeführt (5.8.2). Das Ausgangsvolumen wurde auf 80 mL erhöht, und die Fraktionen der letzten Reinigungsstufe (Gelfiltration) wurden nach Umpufferung auf E-Pure-Wasser zur denaturierenden SDS-PAGE (5.11.1) mit anschließender Silberfärbung (5.11.4) eingesetzt (Abbildung 2.54).

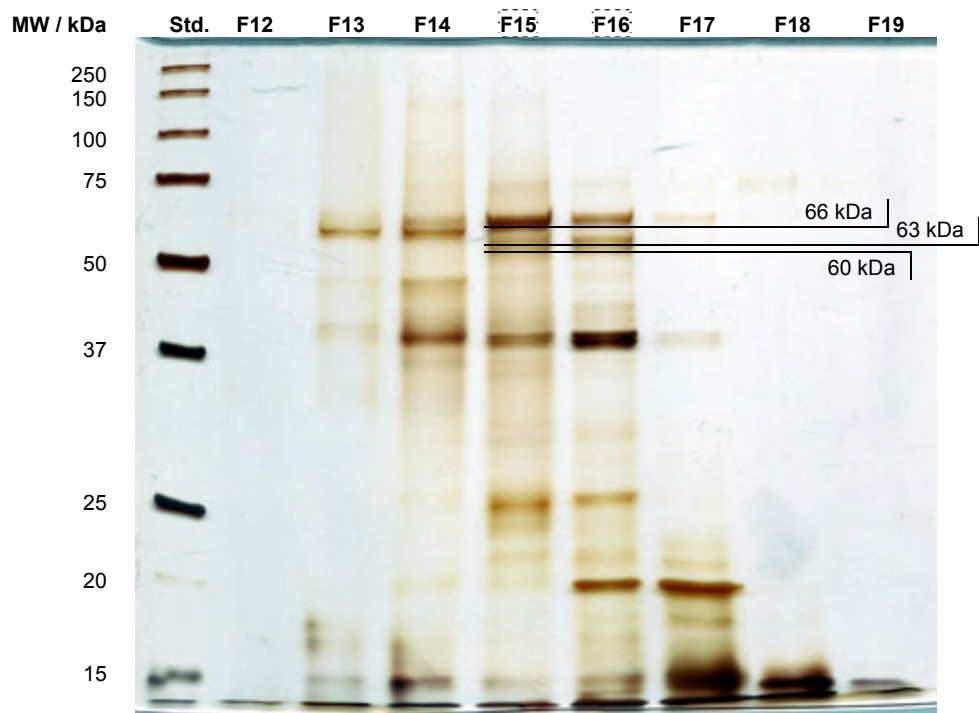


Abbildung 2.54: Gel (12%ig) der SDS-PAGE nach 3-stufiger Proteinreinigung mittels FPLC mit anschließender Silberfärbung; MW = Molekulargewicht, Std. = Standard (1 μ L), Fxx = Fraktion Nr. xx (je 15 μ L), Fxx = aktive Fraktionen

2.4.9 SDS-PAGE nach dreistufiger Reinigung mittels FPLC (Häm-färbung)

Neben der Silberfärbung (vergleiche 2.4.8) wurde nach der chromatographischen Reinigung eine spezifische Färbung für Häm- beziehungsweise Metallenzyme auf einem SDS-Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt (5.11.5). Verglichen wurde separiertes Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.8) mit der über drei chromatographische Stufen gereinigten Enzymprobe (siehe 2.4.7). Als Positivkontrolle diente das hämhaltige Enzym Meerrettich-Peroxidase.

Anhand der spezifischen Färbung wurden zwei Proteine als Metallenzyme identifiziert, die ebenfalls nach der chromatographischen Reinigung über drei Stufen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 2.55 A). Ein Erhitzen der Proben vor der Applikation führte jeweils zum Verlust der Aktivität. Ebenso wurde auf einem separaten SDS-Gel (5.11.2) eine Lipoxygenase aus Sojabohnen deutlich angefärbt (5.11.5; Abbildung 2.55 B).

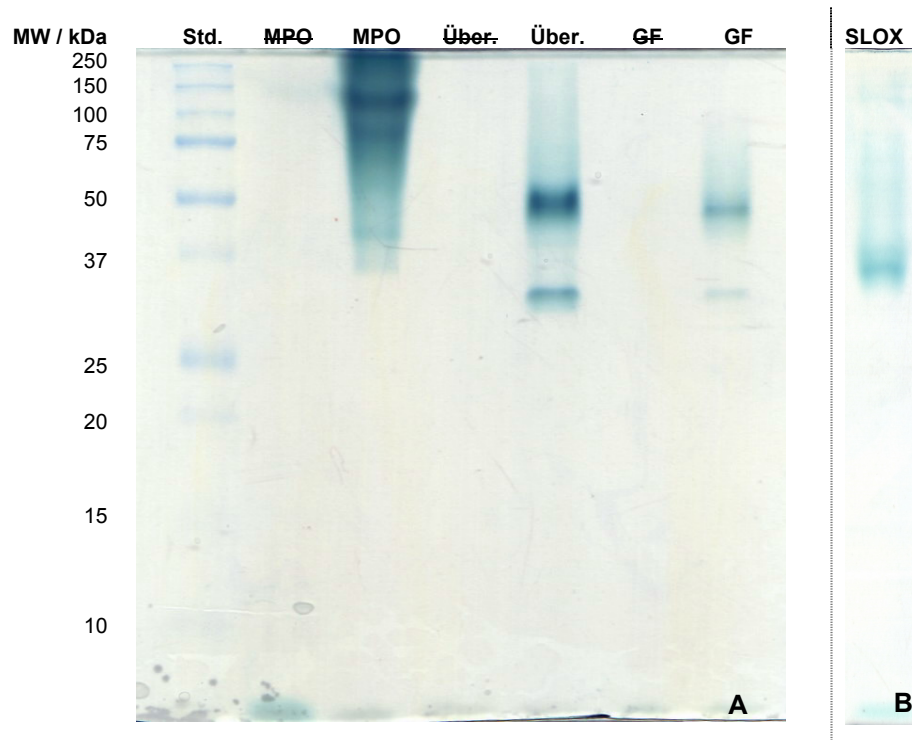


Abbildung 2.55 A: Gel (12%ig) der SDS-PAGE nach 3-stufiger Proteinreinigung mittels FPLC mit spezifischer Färbung für Häm-/Metallenzyme (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin); MW = Molekulargewicht des Standards, Std. = Standard (4 μ L), MPO = Meerrettich-Peroxidase (15 μ L, 345 mU), Über. = separierter Überstand (15 μ L), GF = vereinte aktive Fraktionen aus der 3. Reinigungsstufe (Gelfiltration, 15 μ L), XXX = entsprechende Probe vor SDS-PAGE 5 min auf 95 °C erhitzt;
B: Gel (12%ig) der SDS-PAGE mit anschließender Färbung für Häm-/Metallenzyme; SLOX = Lipoxygenase aus Sojabohnen (20 μ L, 85 mU)

2.4.10 Isoelektrische Fokussierung nach dreistufiger Reinigung (IEF)

Nach einer dreistufigen chromatographischen Reinigung des separierten Überstandes aus Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (5.8.3; vergleiche 2.4.7) wurde eine isoelektrische Fokussierung (5.12) der Proben mit anschließender Silberfärbung (5.12.2; Abbildung 2.56 A) und Färbung auf Laccasen mittels ABTS (5.12.3) durchgeführt. Zusätzlich wurde nach IEF eines separierten Überstandes (5.6.2.8) eine Silberfärbung (5.12.2) sowie eine Färbung auf Laccaseaktivität mit ABTS und DMOP (5.12.3) durchgeführt (Abbildung 2.56 B).

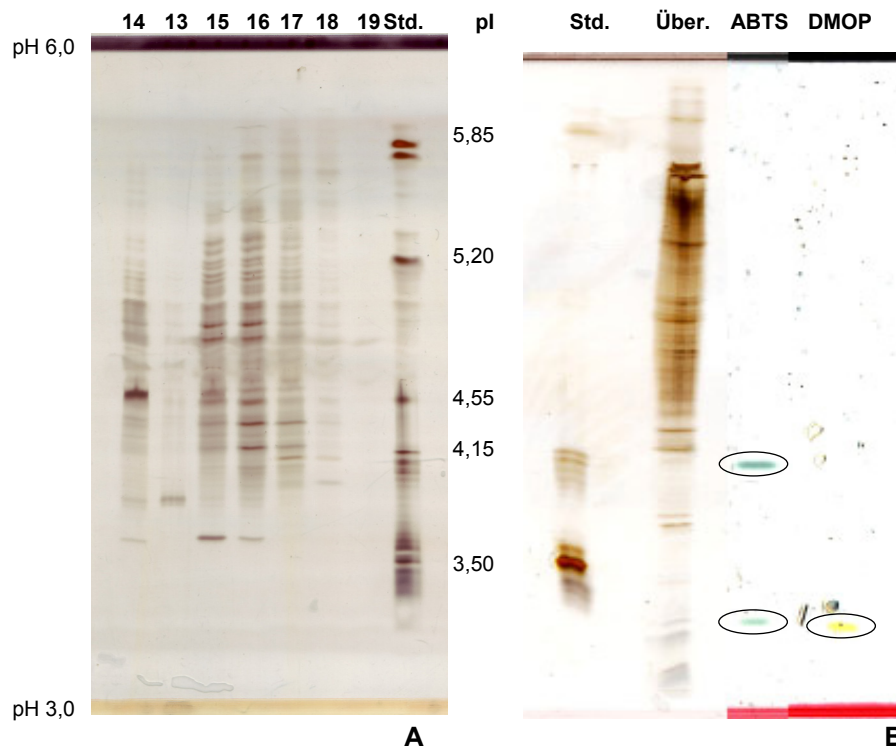


Abbildung 2.56 **A** : IEF-Gel (pH 3 - 6) nach 3-stufiger Proteinreinigung mittels FPLC mit anschließender Silberfärbung; **B**: IEF-Gel (pH 3 - 6) von separiertem Überstand mit anschließender Silber-, ABTS- und DMOP-Färbung; Std. = Standard (2 μ L), pI = isoelektrischer Punkt, 13 - 19 = entsprechende Fraktion der Gelfiltration (10 μ L), Über. = separierter Überstand (10 μ L)
 ○ Aktivitätsgefärbte Banden

Nach dreistufiger chromatographischer Reinigung wurde keine Enzymaktivität mit ABTS-Lösung detektiert. Im separierten Überstand wurden mit ABTS-Lösung nach IEF zwei Enzyme, mit DMOP-Lösung ein Enzym angefärbt (Abbildung 2.56 B).

2.5 Peptidsequenzen

Analog zu 2.4.7 wurde eine dreistufige chromatographische Aufreinigung des separierten Überstandes aus Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* durchgeführt (5.8.2). Die aktiven Fraktionen 15 und 16 der abschließenden Gelfiltration wurden auf einem SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen getrennt (5.11.1) und mit Coomassie® R gefärbt (5.12.1; vergleiche analoge SDS-PAGE mit Silberfärbung in Abbildung 2.54). Drei Banden mit Molekulargewichten von 66, 63 und 60 kDa, die vermutlich für die gesuchte Transformationsaktivität verantwortlich waren, wurden ausgeschnitten und nach Trypsinverdau eine *de novo* Sequenzierung mittels „Electrospray-tandem-Massenspektrometrie“ (ESI-MS-MS) durchgeführt (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Ermittelte Peptidsequenzen (Einbuchstabencode) nach ESI-MS-MS-Analyse der über 3 Stufen gereinigten Enzyme; MW = Molekulargewicht nach SDS-PAGE, fettgedruckt = sichere Identifizierung

Bezeichnung	Zorn 112	Zorn 113	Zorn 114
MW / kDa	66	63	60
Peptidsequenzen	LTQWNQER GFPVDQLNSPK TNPDPVVVAAGTR DLNDMWTTLGAK SESLPQTFTLAGGAK YTESDLMAALPLNAK TNPLDLSVNQANDWPWR	LLEDLLELGQGFEEISR MQEPDEELYNSSDDDG GFPLDQLDDDQFHNYAYAK ...PEVLVPL... ...LVNYYDPAHLAK ...VPLAGFSTML...	SVDQANDEGPWR YLGVSGSVSASYATEK ANSYFEADASSVLR

Homologievergleiche wurden durch Datenbankrecherche (EBI EMBL) mit dem FASTA-Algorithmus und dem *tfastx*-Programm (Pearson *et al.* 1997) durchgeführt. Für Peptidsequenzen aus der Proteinbande *Zorn 112* wurden Treffer auf eine Lipoxygenase von *Aspergillus ochraceus* (E = 2,2) und auf eine Lipoxygenase von *Gibberella moniliformis* (E = 12) gefunden (Abbildung 2.57). Für eine Peptidsequenz aus der Proteinbande *Zorn 113* wurden nach Datenbankrecherche mit EBI EMBL Treffer auf dieselbe Lipoxygenase aus *A. ochraceus* (E = 0,00015) und auf dieselbe Lipoxygenase aus *G. moniliformis* (E = 3,3) erhalten. Die Datenbankrecherche mit NCBI Blast mittels *blastp* (Schäffer *et al.* 2001) ergab für dieselbe Sequenz ebenfalls einen Treffer für die Lipoxygenase aus *A. ochraceus* (E = 1,2) und zusätzlich auf eine Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (E = 0,35). Es gab somit Treffer auf Lipoxygenasen dreier verschiedener Ascomyceten. Zwei verschiedene Peptide aus unterschiedlichen Banden zeigten Homologien zur selben Lipoxygenase.

```

Gibb      LHPIAIVCGYKASKMDSVTIFNQRKDPSSVKEKDDYPWRYAKTCAQVSDWIRHEVGVH 480
Zorn112   -----TNPLDLSVNQANDWPWR----- 17
          .:* * **:: :*:***

Gibb      DALYSYVKYEFENFDFVNNYVPNDLSKRGFPNTTEGLADKKYKNYAYAKNMVSMWNAIRS 600
Zorn112   -----GFP--VDQLNSPK----- 11
          *** .: * . *

Zorn113   -----GFP--LDQLDDDQFHNYAYAK----- 19
          *** : * * .:::*****

Asp_och   LAVNAAARNTLIPHIIVELVGFQPSEAYKFIKHAYKTFDFKKRYVPTDLSQRGFPPEKLN 120
Zorn112   -----GFPVDQLN 8
          *** ::**

Zorn113   -----GFPLDQLD 8
          *** :**:

Asp_och   QPKFHNYAYARCIYSMWHKIRSYVEDMLRLDYPQPGADQKVLRDDRIQAWSAEMRSPTGA 180
Zorn112   SPK----- 11
          .**

Zorn113   DDQFHNYAYAK----- 19
          : :*****:

Asp_fum   GFAFIRHAYENFDFKGRYVPTDLRQRGFPPEELDSPKFHNYAYARCINSMWHKIRSYVQD 540
Zorn113   -----GFPLDQLDDDQFHNYAYAK----- 19
          *** ::** . :*****:

```

Abbildung 2.57: Alignments nach Datenbankrecherche mit EBI EMBL Fungi (Asp_och = Aspergillus ochraceus, Zugriffsnummer DQ087531; Gibb = Gibberella moniliformis, Zugriffsnummer AY699875) sowie NCBI Blast (Asp_och = Aspergillus ochraceus, Zugriffsnummer AAZ13594; Asp_fum = Aspergillus fumigatus, Zugriffsnummer XP_746844) mittels Clustal W (Thompson et al. 1994)

2.6 Optimierung der Nootkatonbiogenese

2.6.1 Optimierung des Transformationssystems

2.6.1.1 Auswahl der Substratqualität

Es wurden niedrigere Valenzenqualitäten der Firma Döhler, äquimolar dosiert, mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* transformiert und mit den Ausbeuten nach Umsetzung des 90-prozentigen (+)-Valencens (Fluka) verglichen. Dazu wurde *P. sapidus* in Submerskultur gezüchtet (5.4.5.1, 5.4.5.3), lyophilisiert (5.4.5.5, 5.4.5.7) und anschließend zur Transformation der unterschiedlichen Qualitäten eingesetzt (5.6.2.1).

Beim Einsatz von 70%igem (+)-Valencen wurden im Vergleich zur Transformation von (+)-Valencen höchster Qualität (Σ 336 mg L⁻¹) vergleichbare Produktausbeuten und -spektren erzielt (Σ 308 mg L⁻¹, 92%). Die Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton nach Transformation der 30%igen Qualität fielen hingegen deutlich niedriger aus (Σ 129 mg L⁻¹, 38%; Abbildung 2.58).

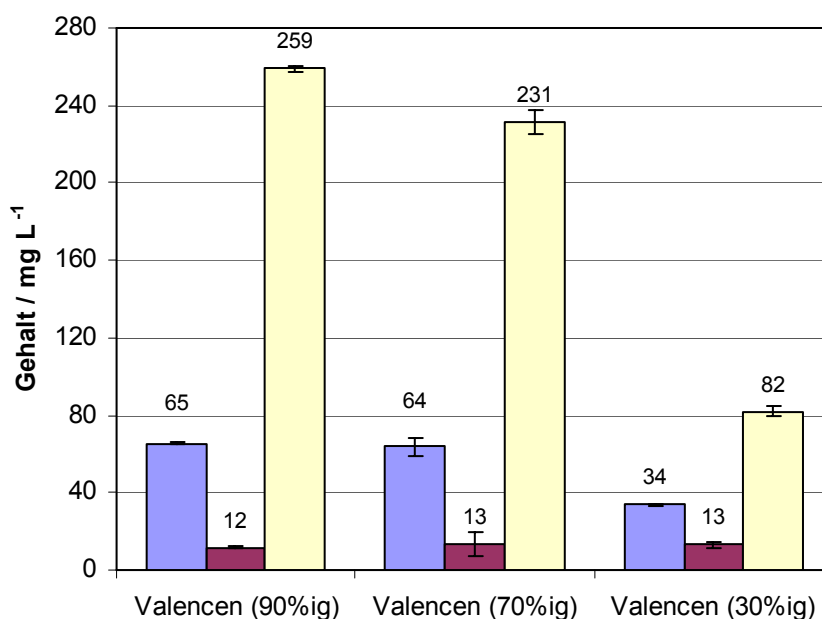


Abbildung 2.58: Produktausbeuten bei der Transformation von (+)-Valencen in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratqualität (äquimolare Dosierung); Transformation von 1,0 μ L (+)-Valencen (90%ig), 1,4 μ L (+)-Valencen (70%ig), 3,3 μ L (+)-Valencen (30%ig) mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL TRIS-HCl, pH 7,5 für 20 Stunden (modifiziert nach Hanning 2006);

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Für alle weiteren Versuche zur Optimierung des Transformationssystems wurde daher 70%iges (+)-Valencen eingesetzt.

2.6.1.2 Kinetik der Nootkatonbiogenese

Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (5.4.5.1, 5.4.5.3, 5.4.5.5, 5.4.5.7) wurde zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1) und eine Kinetik der Biogenese von (+)-Nootkaton erstellt.

Bei der Transformation von (+)-Valencen durch Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* wurde bereits nach 9 Stunden maximale Ausbeute an (+)-Nootkaton erreicht (Abbildung 2.59). Für die nachfolgenden Versuche wurde die Transformationsdauer auf 4 Stunden reduziert.

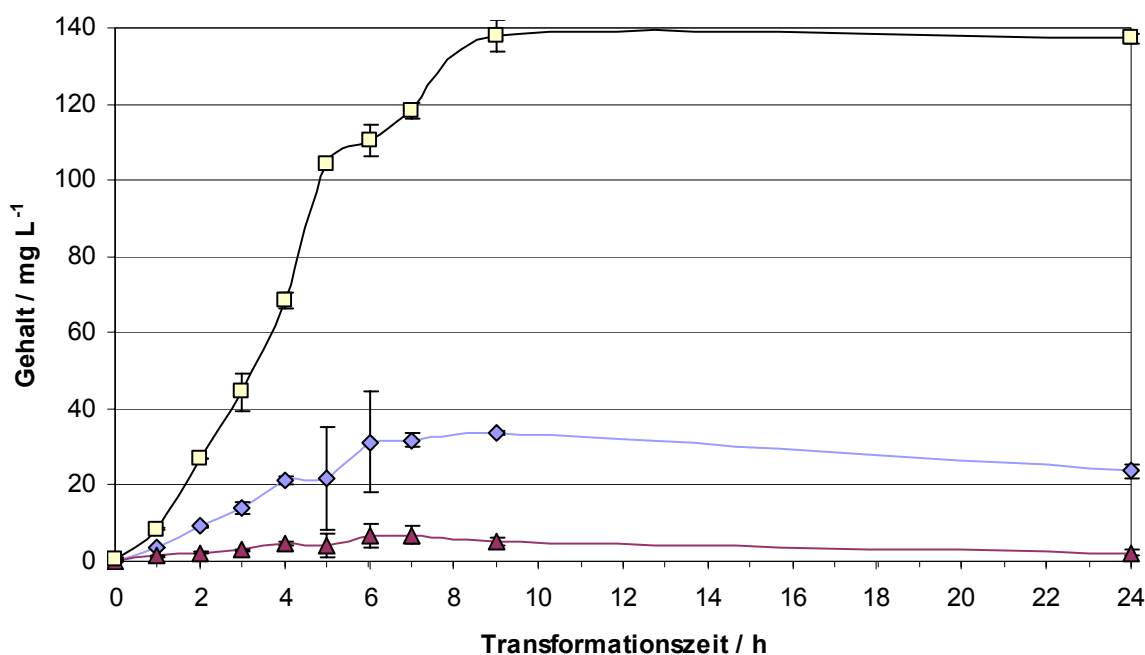


Abbildung 2.59: Ausbeuten an (+)-Nootkaton in Abhängigkeit von der Transformationsdauer; Transformation von 1,4 μL (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 1 - 24 Stunden (modifiziert nach Hanning 2006);

—◇— α -Nootkaton —▲— β -Nootkaton —□— (+)-Nootkaton

2.6.2 Optimierung der Kulturführung

2.6.2.1 Kinetik der Enzym- und Biomassenbildung

Mit einer Vorkultur von *Pleurotus sapidus* (5.4.5.1) wurde eine Hauptkultur inokuliert (5.4.5.3) und diese in SNL-H (5.4.1) kultiviert. Im 24-stündigen Abstand wurde der Glucosegehalt in den Kulturüberständen bestimmt (5.5.4) und die Biomasse gefriergetrocknet (5.4.5.5, 5.4.5.7). Anschließend wurde das Lyophilisat zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1).

Die höchsten Ausbeuten an Lyophilisat pro Liter Kulturmedium wurden am vierten Tag der Kultivierung erzielt (Abbildung 2.61). Zu diesem Zeitpunkt waren noch circa 50% der zugesetzten Glucose im Medium nachweisbar (Abbildung 2.60).

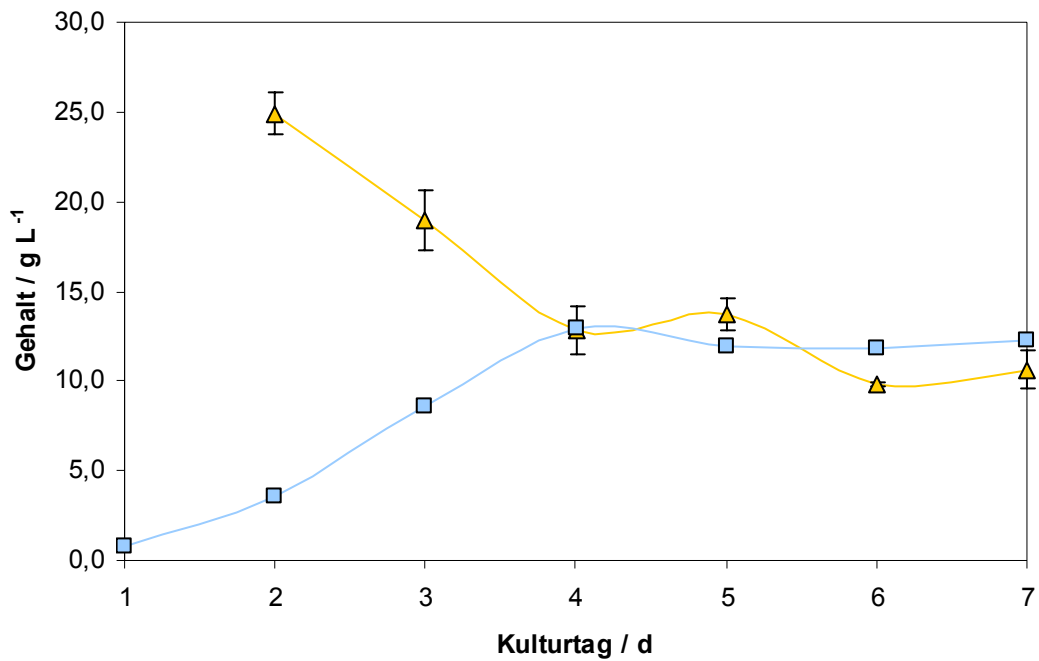


Abbildung 2.60: Wachstumskinetik und Glucosegehalt der Hauptkultur in SNL-H-Medium in Abhängigkeit von der Kulturdauer (modifiziert nach Hänning 2006);

—▲— Glucose —■— Lyophilisat

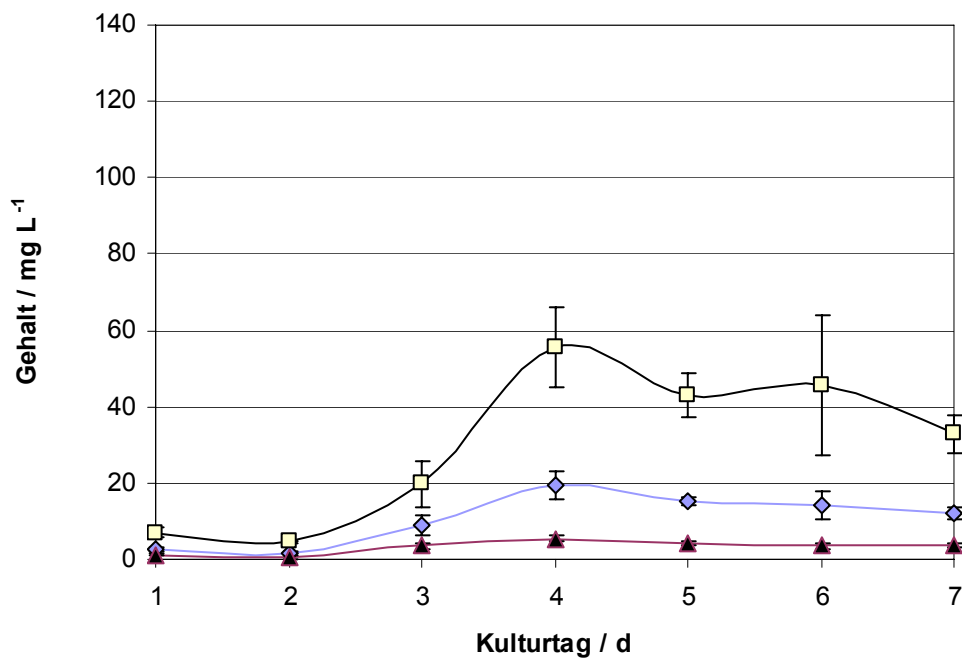


Abbildung 2.61: Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol in Abhängigkeit von der Kulturdauer; Transformation von 1,4 μ L (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 4 Stunden (modifiziert nach Hänning 2006);

—◇— α -Nootkatol —▲— β -Nootkatol —□— (+)-Nootkatol

Die Transformation von (+)-Valencen mit den Lyophilisaten zeigte, dass der Verlauf der Biomassebildung (dargestellt als Ausbeute Lyophilisat pro Liter Kulturmedium) und die Transformationsaktivität proportional zueinander verliefen (vergleiche Abbildung 2.60 und Abbildung 2.61). Ebenfalls nach dem vierten Kulturtag wurden die höchsten Gehalte der untersuchten Zielprodukte α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton nachgewiesen. So betrug die Summe der Gehalte 80 mg L^{-1} , davon entfielen 56 mg L^{-1} auf (+)-Nootkaton.

Im Folgenden wurden die Hauptkulturen von *P. sapidus* am vierten Kulturtag geerntet und zur Gefriertrocknung eingesetzt.

2.6.2.2 Reduzierung der Glucosekonzentration in SNL-H

Die Transformationsaktivität wurde nach Kulturführung der Hauptkultur (5.4.5.3) in glucosereduzierten Medien (NL-G₁₅, NL-G₀₀, 5.4.1) untersucht. Die Kulturen wurden geerntet (5.4.5.5) und das Myzel gefriergetrocknet (5.4.5.7). Anschließend wurde das Lyophilisat zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1).

Der Glucosegehalt der Nährlösung konnte ohne Minderung der Lyophilisatausbeute (Abbildung 2.62) bei gleichbleibender Nootkatonsynthese (Abbildung 2.63) von 30 g L^{-1} auf 15 g L^{-1} reduziert werden. Der Verzicht auf den Zusatz von Glucose zum Nährmedium führte hingegen zu einem fast vollständigen Verlust an Enzymaktivität.

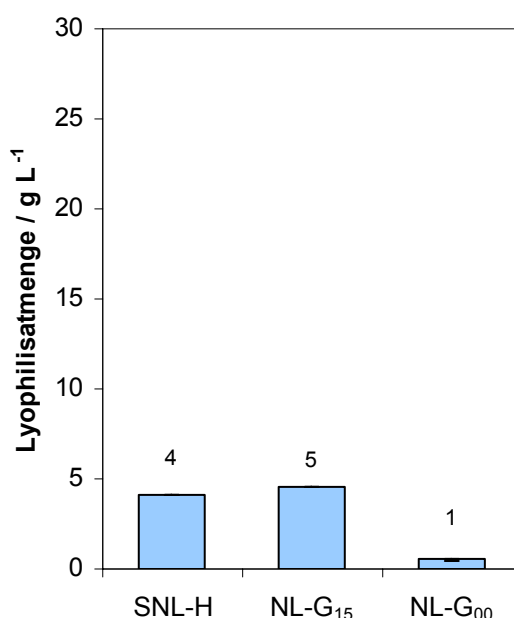


Abbildung 2.62: Lyophilisatmenge nach Gefriertrocknung der Hauptkulturen beim Einsatz glucosereduzierter Medien; SNL-H = Standardnährlösung mit 30 g L^{-1} Glucose, NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L^{-1} Glucose, NL-G₀₀ = Nährlösung ohne Zusatz von Glucose (modifiziert nach Hänning 2006)

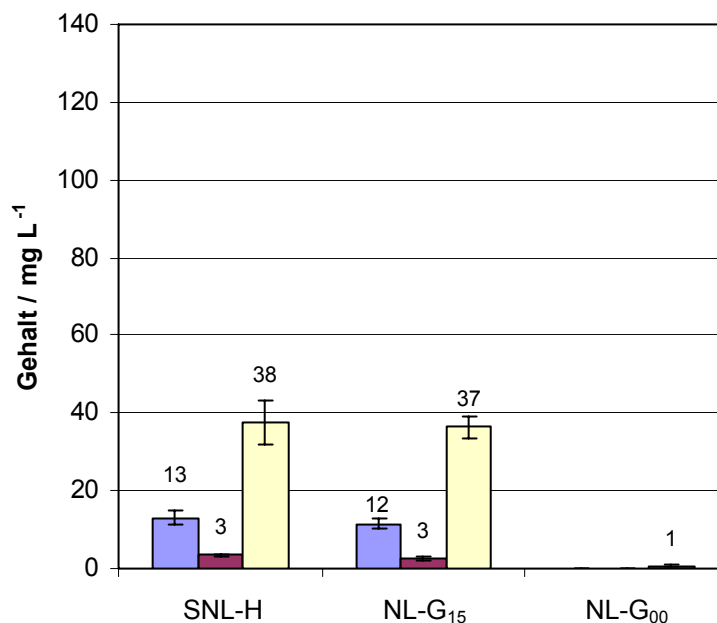


Abbildung 2.63: Ausbeuten an (+)-Nootkatol in Abhängigkeit vom Glucosegehalt des Hauptkulturmediums; Transformation von 1,4 μL (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 4 Stunden; SNL-H = Standardnährlösung mit 30 g L⁻¹ Glucose, NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L⁻¹ Glucose, NL-G₀₀ = Nährlösung ohne Zusatz von Glucose (modifiziert nach Hänning 2006);

■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

Für die weiteren Versuche zur Optimierung des Transformationssystems wurde daher eine modifizierte Nährlösung (NL-G₁₅) mit einem auf 15 g L⁻¹ reduzierten Gehalt an Glucose als Vergleichsmedium eingesetzt.

2.6.2.3 Einsatz von Melasse als Ersatz für Glucose in der Nährlösung

Die in der Hauptkultur als Kohlenstoffquelle eingesetzte Glucose wurde durch Melasse substituiert. Dazu wurden Vorkulturen von *Pleurotus sapidus* in Standardnährlösung (SNL-H, 5.4.1) gezüchtet (5.4.5.1). Mit diesen wurden Hauptkulturen inokuliert (5.4.5.3, 5.4.5.4), bei denen die eingesetzte Glucose durch unterschiedliche Melassegehalte ersetzt wurde (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Veränderte Zusammensetzung der Nährlösungen für die Hauptkulturen beim Einsatz von Melasse als Ersatz für Glucose

Medienbezeichnung	Glucose / g L ⁻¹	Melasse / mL L ⁻¹	Methode
NL-G ₁₅	15	0	5.4.5.3
NL-M ₀₁₀	0	10	5.4.5.3
NL-M ₀₂₅	0	25	5.4.5.3
NL-M ₁₀₀	0	100	5.4.5.3, 5.4.5.4
NL-M ₁₅₀	0	150	5.4.5.4

Die Konzentration der übrigen Medienbestandteile (vergleiche 5.4.1) blieb unverändert. Nach der Ernte der Hauptkulturen (5.4.5.5) wurde das Pilzmyzel zur Gefriertrocknung eingesetzt (5.4.5.7).

Beim Ersatz der Glucose im Nährmedium durch Melasse zeigte *P. sapidus* bei einem Gehalt von 100 mL L⁻¹ Melasse (NL-M₁₀₀) ein dem NL-G₁₅-Medium (15 g L⁻¹ Glucose) äquivalentes Wachstum. Sowohl höhere als auch niedrigere Melassegehalte in der Nährlösung führten zu geringen Lyophilisatmengen (Abbildung 2.64).

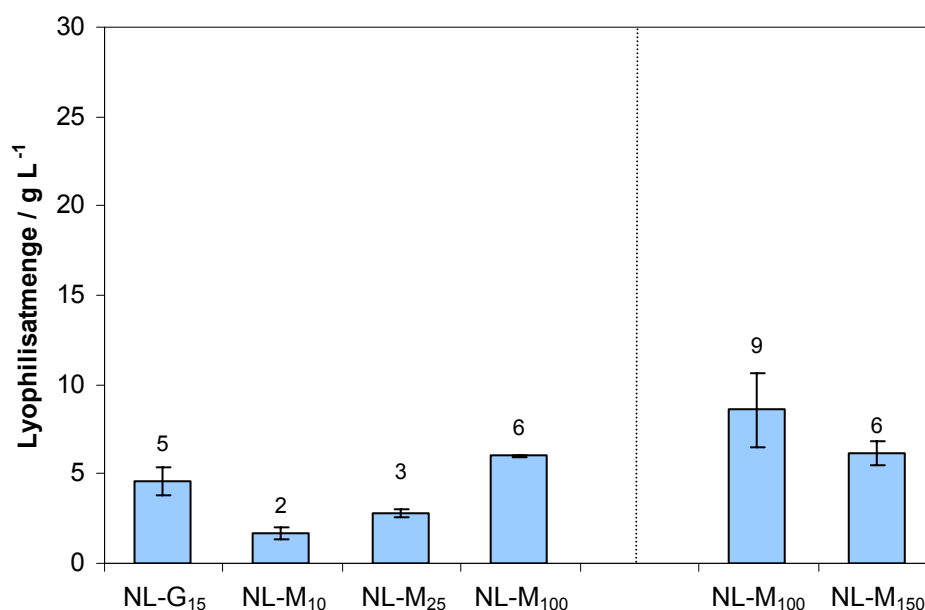


Abbildung 2.64: Einfluss des Melassegehaltes auf das Wachstum von *Pleurotus sapidus*; NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L⁻¹ Glucose, NL-M_{xx} = Nährlösung mit xx mL L⁻¹ Melasse (modifiziert nach Hanning 2006);Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.12

Die Lyophilisate wurden anschließend zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1).

Der Einsatz von 100 mL L⁻¹ Melasse führte zu einer gesteigerten Produktbildung im Vergleich zur Nährlösung mit einem Glucosegehalt von 15 g L⁻¹. Der Ersatz von Glucose durch Melasse im Hauptkulturmedium war somit ohne Minderung des Wachstums und der Transformationsaktivität möglich. Besonders niedrigere, aber auch höhere Zugaben von Melasse zur Nährlösung führten hingegen zu einer zum Teil deutlichen Minderung der Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton (Abbildung 2.65).

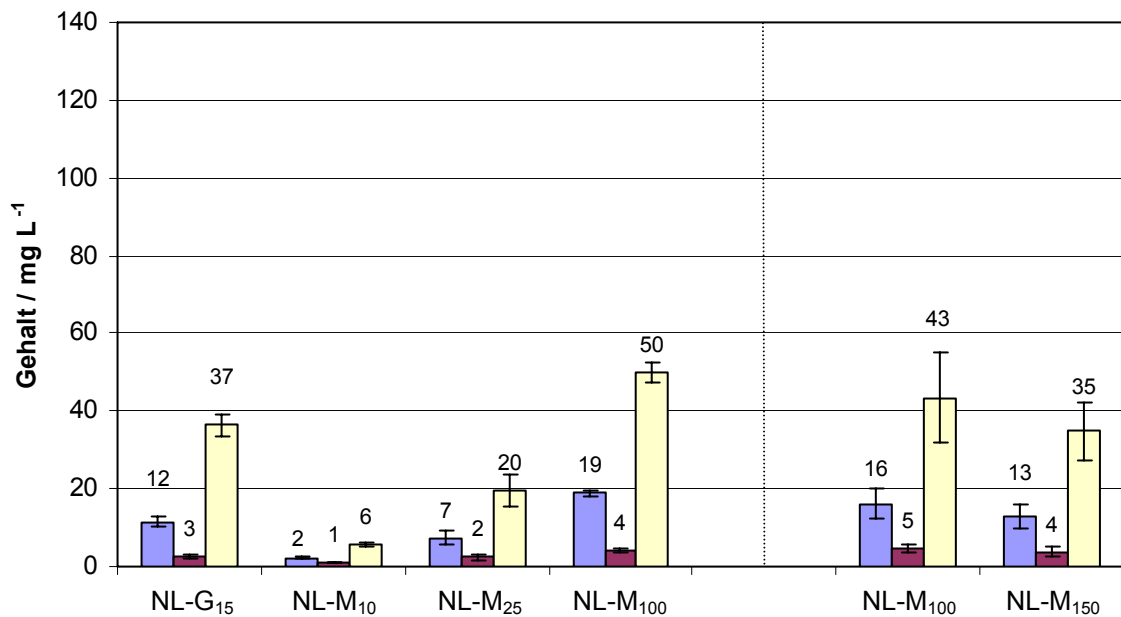


Abbildung 2.65: Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Melassegehalt; Transformation von 1,4 μ L (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 4 Stunden; NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L⁻¹ Glucose, NL-M_{xx} = Nährlösung mit xx mL L⁻¹ Melasse (modifiziert nach Hänning 2006);

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol

.....Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.12

Für die weiteren Versuche zur Optimierung des Transformationssystems wurde daher die modifizierte Nährlösung (NL-M) mit einem Melassegehalt von 100 mL L⁻¹, ohne Zusatz von Glucose, als Vergleichsmedium eingesetzt.

2.6.2.4 Einsatz von Ammoniumnitrat als Ersatz für L-Asparagin in der Nährlösung

Vorkulturen von *Pleurotus sapidus* (5.4.5.1) wurden in Standardnährlösung (SNL-H, 5.4.1) gezüchtet. Mit diesen wurden Hauptkulturen inokuliert (5.4.5.4), bei denen L-Asparagin durch unterschiedliche Gehalte an Ammoniumnitrat ersetzt wurde (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Veränderte Zusammensetzung der Nährlösungen für die Hauptkulturen beim Einsatz von Ammoniumnitrat als Ersatz für L-Asparagin

Bezeichnung	Glucose / g L ⁻¹	Melasse / mL L ⁻¹	L-Asparagin / g L ⁻¹	Ammoniumnitrat / g L ⁻¹
NL-M	0	100	4,5	0,0
NL-MA _{1,2}	0	100	0,0	1,2
NL-MA _{2,4}	0	100	0,0	2,4
NL-MA _{4,8}	0	100	0,0	4,8
NL-MA _{7,2}	0	100	0,0	7,2

Nach der Ernte der Hauptkulturen (5.4.5.6) wurde das Pilzmyzel zur Gefriertrocknung eingesetzt (5.4.5.7).

Die erhaltene Lyophilisatmenge war bei allen Hauptkulturen identisch (Abbildung 2.66).

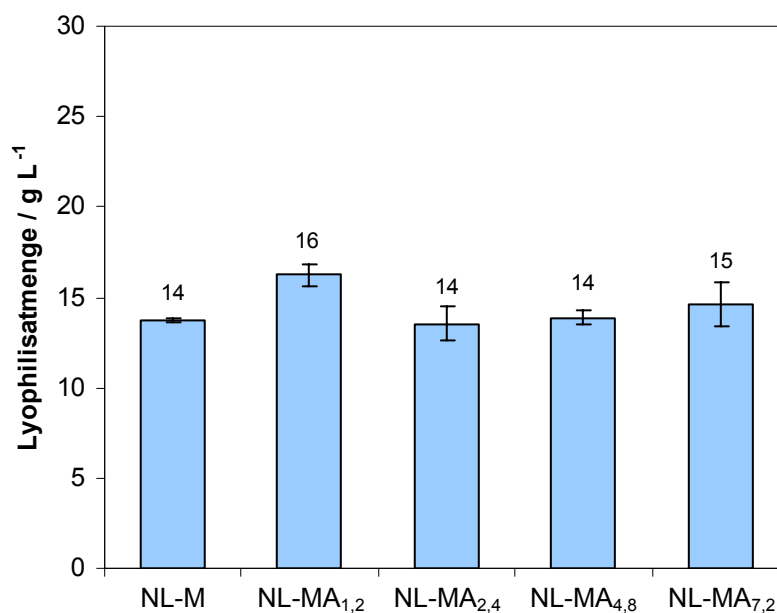


Abbildung 2.66: Lyophilisatmenge nach Gefriertrocknung der Hauptkulturen beim Einsatz unterschiedlicher Ammoniumnitratkonzentrationen als Ersatz für L-Asparagin im Medium; NL-M = Nährlösung mit 100 mL L⁻¹ Melasse, NL-MA_{x,x} = Nährlösung mit x,x g L⁻¹ Ammoniumnitrat (modifiziert nach Seemann 2006)

Die Lyophilisate wurden zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1).

Ein Ersatz des L-Asparagins in der Nährlösung durch Ammoniumnitrat war ohne Einbußen der Produktausbeuten möglich. Die äquimolare Substitution des L-Asparagins durch Ammoniumnitrat (NL-MA_{2,4}) lieferte hohe Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton (Abbildung 2.67).

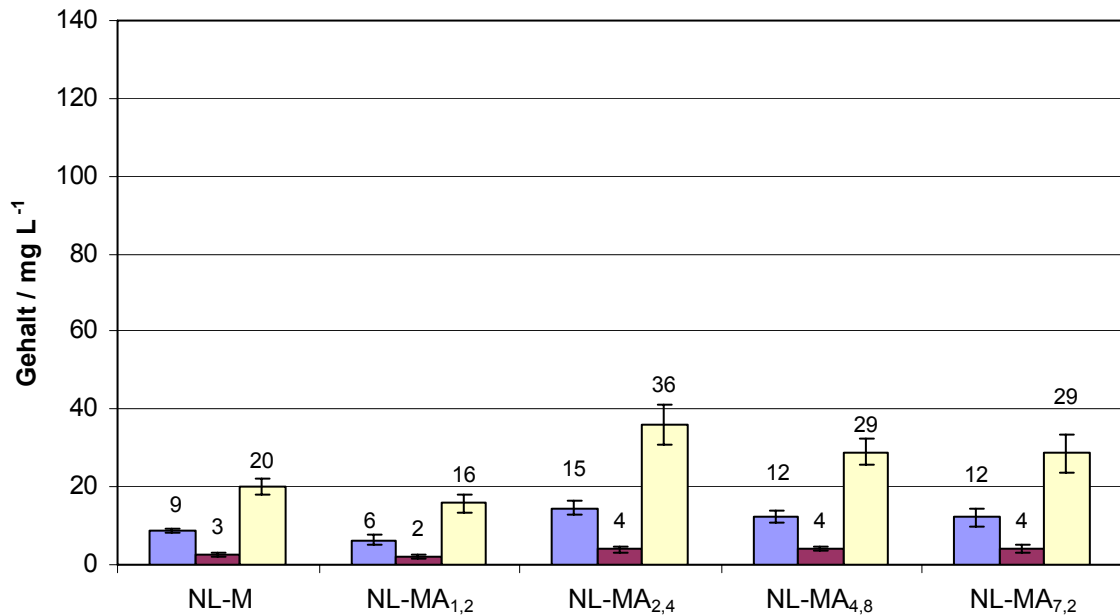


Abbildung 2.67: Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Ammoniumnitratgehalt; Transformation von 1,4 μ L (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 4 Stunden; NL-M = Nährlösung mit 100 mL L⁻¹ Melasse, NL-MA_{x,x} = Nährlösung mit x,x g L⁻¹ Ammoniumnitrat (modifiziert nach Seemann 2006);

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Für die weiteren Versuche zur Optimierung des Transformationssystems wurde daher die modifizierte Nährlösung (NL-MA) mit einem Melassegehalt von 100 mL L⁻¹, ohne Zusatz von Glucose, und einem Ammoniumnitratgehalt von 2,4 mg L⁻¹, ohne Zusatz von L-Asparagin als Vergleichsmedium eingesetzt.

2.6.2.5 Adaption der Vorkulturen mit (+)-Valencen bei der Verwendung des Hauptkulturmediums NL-MA

Eine nicht adaptierte Vorkultur von *Pleurotus sapidus* wurde mit Vorkulturen, die an Valencengehalte von 0,05 bis 0,20% adaptiert wurden (5.4.5.2), verglichen. Als Vorkulturmedium wurde SNL-H (5.4.1) verwendet, und als Nährlösung für die Hauptkulturen kam NL-MA (5.4.1) zum Einsatz. Die erhaltenen Lyophilisate (5.4.5.4, 5.4.5.6, 5.4.5.7) wurden zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt (5.6.3.1).

Der Einsatz des adaptierten *P. sapidus*-Stammes und des Vorkulturmediums mit 0,05% (v/v) (+)-Valencen und dem Hauptkulturmedium NL-MA zur Herstellung von Lyophilisaten, und die anschließende Transformation von (+)-Valencen mit diesem Biokatalysator führte zu einem Nootkatongehalt von 136 mg L^{-1} ($\Sigma 189 \text{ mg L}^{-1}$) nach einer Transformationsdauer von lediglich vier Stunden. Die Kultivierung mit diesen Modifikationen der Medien verbesserte die Transformationsleistung um das Vierfache im Vergleich zu einer nicht adaptierten Vorkultur (Abbildung 2.68).

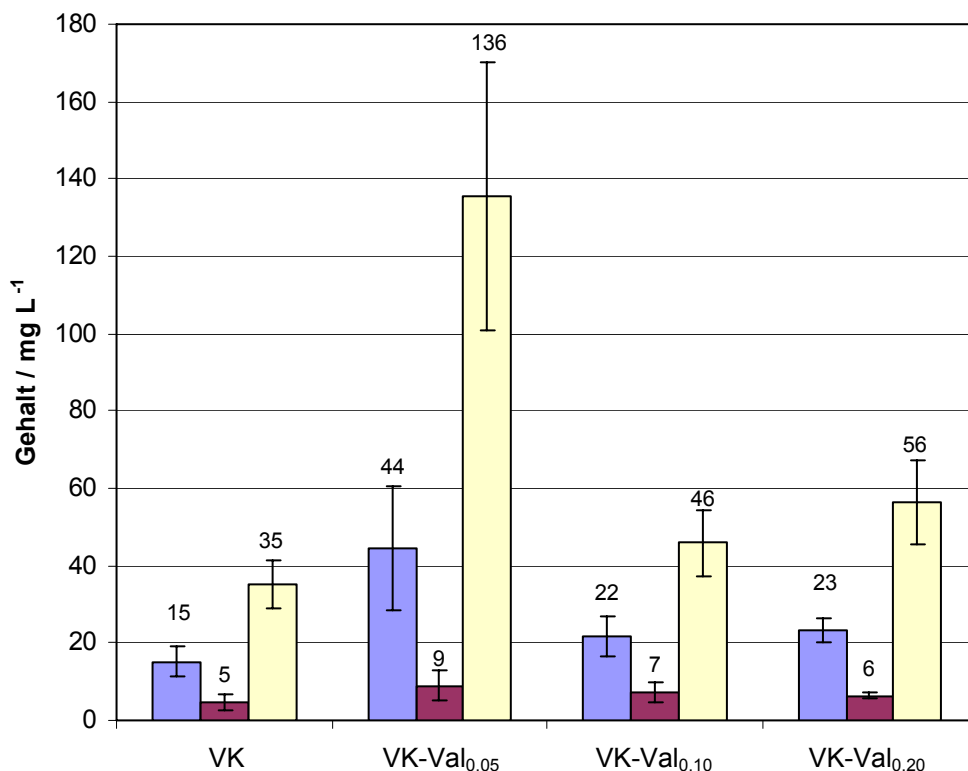


Abbildung 2.68: Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Einsatz unterschiedlich adaptierter Vorkulturen; Transformation von $1,4 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat aus Hauptkulturen in NL-MA-Medium in $1,5 \text{ mL}$ 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen für 4 Stunden; VK = Vorkultur, VK-Val_{x,xx} = Vorkultur mit x,xx% (v/v) (+)-Valencen adaptiert (modifiziert nach Seemann 2006);

■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

3 Diskussion

3.1 Enzymatische Katalyse

Eine Reihe wichtiger organischer Syntheseschritte ist heutzutage durch biotechnologische Transformationen substituierbar. Dazu gehören Oxidationsreaktionen, Hydrolysen, nicht hydrolytische Eliminierungs- sowie Isomerisierungs-Reaktionen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Beispiele für biotechnologische Transformationsreaktionen, eingeteilt nach Enzymklassen

EC-Nummer	Enzymklasse	Reaktionstyp	Beispiel
EC 1	Oxidoreduktasen	Redox-Reaktionen innerhalb eines Substratpaares: z. B. Hydroxylierungen und Epoxidierungen	Oxyfunktionalisierung von (+)-Valencen (Kaspera <i>et al.</i> 2005); Synthese von Glutamat mit Hilfe von Dehydrogenasen (Hummel und Kula 1989)
EC 2	Transferasen	intermolekulare Gruppenübertragungen	Quervernetzung von Proteinen in Wurstwaren sowie Fisch- und Milchprodukten durch Transglutaminasen (Kuraishi <i>et al.</i> 2001)
EC 3	Hydrolasen	Knüpfungen und hydrolytische Spaltungen: z. B. von Ester-, Glycosid- und Ether-Bindungen	Bildung von Aromastoffen durch Veresterung mit Hilfe von Lipasen (Langrand <i>et al.</i> 1988)
EC 4	Lyasen	nicht hydrolytische Eliminierungsreaktionen: z. B. Spaltung von C-C-, C-O-, und C-N-Bindungen	Transformation von α -Pinenepoxid mit <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Latza 1999)
EC 5	Isomerasen	Isomerisierungsreaktionen	Umwandlung von Glucose in Fructose bei der Stärkeverzuckerung (Bhosale <i>et al.</i> 1996)

Die Biotransformation bietet gegenüber organischen Synthesen oft erhebliche Vorteile, weil sie unter milden Reaktionsbedingungen die chemo-, regio-, stereo- und enantiomerenreine Synthese hochwertiger Verbindungen ermöglicht. Dies ist mit klassischen Synthesestrategien bisher nur schwer zu erzielen (Faber 2000; Urlacher *et al.* 2004). Großes Interesse gilt daher den Enzymen, die in der Lage sind, einfache, preiswerte Substrate zu hochwertigen Produkten zu transformieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch die Oxyfunktionalisierung von α -Pinen und (+)-Valencen untersucht. Die zugrunde liegenden Redoxreaktionen können durch verschiedene Enzymunterklassen katalysiert werden. Dazu gehören Laccasen, Peroxidasen, Dioxygenasen, Dehydrogenasen und Monooxygenasen.

3.2 Biotransformation von Terpenen

Terpene weisen häufig eine geringe Wasserlöslichkeit (α -Pinen: $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) und einen niedrigen Siedepunkt auf. Durch Oxidation wird die Wasserlöslichkeit im Allgemeinen erhöht. So ist der Monoterpen-Alkohol Carveol um den Faktor 475 besser wasserlöslich (19 mmol L^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$) als α -Pinen. Die Löslichkeit von Produkten mit Carbonylfunktionen fällt aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wiederum etwas niedriger aus (Carvon: 9 mmol L^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Fichan *et al.* 1999). Ähnlich verhält es sich auch bei (+)-Valencen, Nootkatol und (+)-Nootkaton. Die geringe Wasserlöslichkeit der Substrate führt eventuell zu Schwierigkeiten bei der Transformation in wässrigen Medien, da in Abhängigkeit von der Affinität des Substrats zum biologischen System eine Limitierung der Bioverfügbarkeit eintreten kann. Vermutet wurde, dass dies vor allem bei höheren Zelldichten ein Problem darstellt (van der Werf *et al.* 1997).

Eine weitere Herausforderung bei der Transformation von Terpenen besteht darin, dass Oxyfunktionalisierungen auf Umgebungssauerstoff angewiesen sind, und die Sauerstoffversorgung daher durch ständiges Rühren und häufig durch zusätzliche Begasung sichergestellt werden muss. Dies führt bei der Transformation von leichtflüchtigen Monoterpenen (zum Beispiel α -Pinen) in offenen Transformationssystemen zu einem stetigen Verlust an Substrat über die Gasphase. Weil α -Pinen jedoch in großen Mengen preiswert zur Verfügung steht (1.3), wurde beim durchgeführten Screening (2.1) eine Substratlimitierung durch eine angemessen hohe Dosierung ausgeschlossen. In Bezug auf die Produktbildung stellte dies kein Problem dar, da die Wasserlöslichkeit durch die Biotransformation in der Regel steigt (siehe oben). Bei der Transformation des Sesquiterpens (+)-Valencen musste dieser Punkt aufgrund der geringen Flüchtigkeit nicht beachtet werden.

Die antimikrobielle Wirkung von Terpenen wurde bereits diskutiert (1.2). So führt die Lipophilie der Terpene häufig zur Störung der Membransysteme der Zellen, was eine Abnahme der Transformationsaktivität zur Folge hat (Berger *et al.* 1999). Zum Beispiel inhibiert α -Pinen das Wachstum von Bakterien und Hefen und hohe Konzentrationen können zur Zelllyse führen (Andrews *et al.* 1980). Fungizide Wirkungen von Terpenen, zum Beispiel von (+)-Nootkaton auf bestimmte Pilzstämme, wurden in der Literatur ebenfalls erwähnt (Mao *et al.* 2006). Die Cytotoxizität von Terpenen musste somit bei der Biotransformation berücksichtigt werden. Deshalb wurden zur Transformation von α -Pinen im Vorfeld geeignete terpentolerante Pilzstämme ausgewählt, die für ihr oxidatives Potenzial bekannt waren (2.1.1). Da es sich bei der Verwendung von Lyophilisaten zur Transformation von Terpenen wahrscheinlich um ein nicht vitales System handelte, war dieser Punkt bei der Umsetzung von (+)-Valencen hingegen nur von untergeordneter Bedeutung.

3.3 Biotransformation des Monoterpens α -Pinen

3.3.1 Autoxidation

Wärme- und Luftsauerstoffeinwirkung können zur Autoxidation von α -Pinen führen. Bei 100 °C wurden autoxidativ Verbenol, α -Pinenepoxid (**4**), Verbenon, (*E*)-Pinocarveol, (*E*)-Carveol und Myrtenal gebildet (Moore *et al.* 1956). 1960 wurde die Autoxidation von α -Pinen zu Verbenol und Verbenon bei Raumtemperatur beschrieben (Bhattacharyya *et al.* 1960). Parallel zu den durchgeführten Biotransformationen (2.1.3, 2.1.4, 2.1.6) wurden daher entsprechende Blindwerte (2.1.5, 2.1.7) mitgeführt. Dazu wurden jeweils dasselbe Medium sowie die gleiche Substratdosierung und Transformationsdauer wie in den einzelnen Kultivierungen verwendet, jedoch kein Pilzmyzel oder Lyophilisat eingesetzt. Die durch Autoxidation von α -Pinen entstandenen Verbindungen konnten somit qualitativ und quantitativ mit den Ergebnissen der Biotransformationen verglichen werden.

In Übereinstimmung mit Bhattacharyya *et al.* (1960) wurde Verbenon als Hauptprodukt der Autoxidation identifiziert. Neben den beschriebenen geringen Mengen an (*Z*)-Verbenol wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch (*E*)-Verbenol als weiteres Hauptprodukt der Autoxidation nachgewiesen.⁶ Das von Bhattacharyya *et al.* erwähnte (*E*)-Sobrerol wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.⁷ Bei Untersuchungen zur Autoxidation von α -Pinen unter Einsatz von reinem Sauerstoff und Metallkatalysatoren wurde ebenfalls die Entstehung von Verbenol und Verbenon beobachtet. Zusätzlich wurde α -Pinenepoxid gebildet, welches zu (*E*)-Sobrerol weiter reagierte (Rothenberg *et al.* 1998). In weiteren Untersuchungen wurde neben (*E*)-Verbenol und (*Z*)-Verbenol Verbenon als Hauptautoxidationsprodukt erhalten (Lindmark-Henriksson *et al.* 2004). Das Produktspektrum korrelierte mit den in dieser Arbeit gefundenen Produkten. Ein direkter Vergleich der Gehalte war jedoch aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen (zum Beispiel Substratdosierung und Transformationsdauer) nicht möglich. Lindmark-Henriksson *et al.* stellten darüber hinaus fest, dass die Gehalte abhängig vom verwendeten Medium waren. So wurde in metallfreien Medien autoxidativ deutlich weniger Verbenon gebildet und in destilliertem Wasser wurden keine Oxidationsprodukte von α -Pinen nachgewiesen. Interessanterweise führte die Inkubation von α -Pinen in einer Saccharoselösung erneut zu den selben Autoxidationsprodukten (Lindmark-Henriksson *et al.* 2003; Lindmark-Henriksson *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen den Blindwerten in Nährmedium (2.1.5) und den Blindwerten in MOPS-Puffer (2.1.7) nur in Bezug auf (*Z*)-Verbenol und (*E*)-Carveol deutliche Abweichungen im Produktverhältnis beobachtet (Anhang Tabelle 7.1).

⁶ Eine genaue Quantifizierung der Verbenon- und (*E*)-Verbenolgehalte war nicht möglich, da unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen (5.10.2) keine Basislinientrennung dieser Substanzen erzielt wurde. Der Gehalt wurde deshalb als Summenparameter angegeben.

⁷ Auf eine Identifizierung mittels Referenzsubstanzen wurde verzichtet.

3.3.2 Submerskulturen

Bedingt durch das enorme Potenzial der Oxyfunktionalisierung von α -Pinen (vergleiche 1.2 ff.) wurde bereits eine Vielzahl von Verfahren zu dessen Biotransformation publiziert. Dabei kamen unter anderem Bakterien-, Pilz- und Pflanzenzellkulturen, aber auch isolierte Enzyme zum Einsatz. In einer der ersten Veröffentlichungen zur Biotransformation von α -Pinen wurde der Ascomycet *Aspergillus niger* verwendet (Bhattacharyya *et al.* 1960; Prema und Bhattacharyya 1962). Als Transformationsprodukte wurden (*Z*)-Verbenol, Verbenon und (*E*)-Sobrerol identifiziert. Bei einer breiter angelegten Untersuchung des Transformationspotenzials verschiedener Basidiomyceten (unter anderem *Marasmius*-, *Pleurotus*- und *Trametes*-Stämme) wurden hingegen (*E*)-Verbenol, Verbenon, Myrtenol und (*E*)-Pinocarveol als Hauptprodukte identifiziert (Busmann und Berger 1994). Die gleichen Produkte wurden bei Untersuchungen zur Oxyfunktionalisierung von α -Pinen durch diverse Basidio- und Ascomyceten nachgewiesen (Onken 1998; Hardebusch 2006) und in dieser Arbeit ebenfalls als Hauptprodukte der Biotransformation identifiziert (2.1.3). Weitere Beispiele zur Transformation von α -Pinen sind in Tabelle 3.2 beschrieben.

Tabelle 3.2: Beispiele zur Transformation von Pinen durch Bakterien-, Pilz- und Pflanzenzellkulturen; ^a = die Bildung über α -Terpineol wurde postuliert; ^b = durch Protoplastenfusion hergestellter Produktionsstamm; ^c = Postulat; ^d = α -Pinenepoxid ist in wässrigen Medien instabil und reagiert unter sauren Bedingungen schnell zu (*E*)-Sobrerol, aber auch die Bildung von Borneol ist möglich

Art	Organismus	Hauptprodukte	Literatur
Pilzkultur	<i>Armillaria mellea</i>	(<i>E</i>)-Sobrerol ^a	Draczynska-Lusiak und Siewinski 1989
	<i>Hormonema</i> sp.	(<i>E</i>)-Verbenol, Verbenon	van Dyk <i>et al.</i> 1998
	<i>Botrytis cinerea</i>	Verbenon, (<i>E</i>)-Pinocarveol, 9-Hydroxypinocarveol (13), 4 β -Hydroxy- α -pinen-6-on (16)	Farooq <i>et al.</i> 2002
	<i>Aspergillus niger</i> und <i>Penicillium digitatum</i> ^b	(<i>Z</i>)-Verbenol	Rao <i>et al.</i> 2003
Bakterienkultur	<i>Pseudomonas</i> sp.	Borneol (1), Myrtenol, 4-Isopropylcyclohex-1-encarbonsäure	Shukla und Bhattacharyya 1968
	<i>Serratia marcescens</i>	(<i>E</i>)-Verbenol, Verbenon, (<i>E</i>)-Sobrerol	Wright <i>et al.</i> 1986
	<i>Nocardia</i> sp.	α -Pinenepoxid ^{c,d}	Griffiths <i>et al.</i> 1987
	<i>Pseudomonas putida</i>	α -Pinenepoxid ^d	van Keulen <i>et al.</i> 1998
	<i>Bacillus pallidus</i>	Carveol, Carvon, Limonen, (<i>E</i>)-Pino-carveol, Pinocarveon, Myrtenol, Myrtenal	Savithiry <i>et al.</i> 1998
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Limonen, <i>p</i> -Cymen, α -Terpinen, Campher, Terpinen-4-ol, α -Terpineol, Borneol, <i>p</i> -Cymen-8-ol	Yoo <i>et al.</i> 2001
Enzym	P450-Monooxygenasen aus <i>P. putida</i> (P450 _{cam}); Wildtyp-Enzym und Punktmutanten	(<i>Z</i>)-Verbenol, α -Pinenepoxid ^d , Myrtenol, Verbenon	Bell <i>et al.</i> 2001; Bell <i>et al.</i> 2003
Pflanzenzellkultur	<i>Picea abies</i>	(<i>E</i>)-Verbenol, Verbenon, (<i>Z</i>)-Verbenol, (<i>E</i>)-Pinocarveol, Myrtenol, α -Terpineol, (<i>E</i>)-Sobrerol, Myrtenal, Carveol	Lindmark-Henriksson <i>et al.</i> 2003

Das Produktspektrum der Biotransformation von α -Pinen mit Pflanzenzellkulturen von *Picea abies* korrelierte mit dem in dieser Arbeit beobachteten Spektrum (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Beispielhafter Vergleich der Produktspektren der Transformation von α -Pinen mit Submerskulturen von *Marasmius scorodoni* (vorliegende Arbeit, Anhang Tabelle 7.1) und *Picea abies* (Lindmark-Henriksson *et al.* 2003); k. A. = keine Angabe (Nebenprodukt), ^a = die Summe der identifizierten terpenoiden Transformationsprodukte wurde gleich 100% gesetzt, ^b = Mittelwerte der Schwankungsbreiten

Produkt	Verteilung / %	
	vorliegende Arbeit ^a	Lindmark-Henriksson <i>et al.</i> 2003
(E)-Verbenol + Verbenon	79	63 ^b
(E)-Pinocarveol	6	8 ^b
(Z)-Verbenol	1	5
Myrtenol	12	8 ^b
(E)-Carveol	2	k. A.

Bei der Transformation von α -Pinen in Submerskulturen resultierten mit drei der untersuchten Basidiomyceten (*Marasmius scorodoni*, *Cyathus striatus* und *Trametes versicolor*) in etwa das gleiche Produktmuster und ähnliche Konzentrationen (2.1.3). Als Hauptprodukte wurden (E)-Verbenol und Verbenon identifiziert. Im Vergleich zu den entsprechenden Blindwerten (2.1.5) wurden circa zwei- bis dreifach höhere Gehalte quantifiziert. Lediglich *Cystoderma carcharias* war nicht in der Lage, α -Pinen zu oxidieren, und die ermittelten Ausbeuten der Zielprodukte lagen unter denen des entsprechenden Blindwertes. Zusätzlich war bei allen Organismen Myrtenal in niedrigeren Konzentrationen als im Blindwert enthalten.

3.3.3 Kulturen mit erhöhter Biofeuchtmasse

Der Einsatz von konzentrierten Kulturen zur Biodegradation und -transformation wurde bisher vorwiegend für Bakterien beschrieben (Choi *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 1998). Zur Transformation mit Hilfe von Pilzen wurde konzentrierte Biomasse hingegen bislang nur selten eingesetzt. Ein Beispiel ist die Transformation von Ferulasäure durch *Pycnoporus cinnabarinus*. Durch Variation der Kohlenstoffquelle des Nährmediums wurde eine bis zu vierfach erhöhte Zelldichte des Basidiomyceten erreicht, die zu einer gesteigerten Produktion von Vanillin führte (Oddou *et al.* 1999). Analog wurde durch Transformation von 4-Hydroxymizimtsäure mit konzentrierten Kulturen des thermophilen Schimmelpilzes *Paecilomyces variotii* eine gesteigerte Bildung von 4-Hydroxybenzoesäure erzielt (statt 110 mg in 8 Tagen, 200 mg innerhalb von 4 Tagen) (Sachan *et al.* 2006). Bei der Umsetzung von (+)-Valencen durch den Ascomyceten *Chaetomium globosum* wurde ebenfalls mit steigender Konzentration an Biofeuchtmasse ein Anstieg der Produktausbeuten beobachtet.

Eine effektive Steigerung bezüglich der eingesetzten Biomasse wurde hingegen nicht erzielt (Kaspera 2004). Hardebusch (2006) untersuchte die Transformation von α -Pinen durch Asco- und Basidiomyceten in Kulturen erhöhter Zelldichte. Verglichen mit herkömmlichen Submerskulturen zeigte vor allem *Pleurotus sapidus* eine Steigerung der Konzentrationen an (*E*)-Verbenol (Faktor 4) und Verbenon (Faktor 6). Bezogen auf die eingesetzte Biofeuchtmasse wurden allerdings keine erhöhten Ausbeuten beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit führte die Transformation von α -Pinen mit Kulturen konzentrierter Biofeuchtmasse (bezogen auf das eingesetzte Volumen an Medium) im Allgemeinen zu höheren Produktausbeuten im Vergleich zur Kultivierung in Submerskulturen (vergleiche 2.1.3, 2.1.4). Auffallend war, dass durch Kulturen mit konzentrierter Biofeuchtmasse von *M. scorodoni* im Vergleich zu Submerskulturen deutlich höhere Konzentrationen an Myrtenol (Faktor 5) erzielt wurden und *T. versicolor* analog zu gesteigerten Ausbeuten (Faktor 6) an (*E*)-Verbenol und Verbenon führte. Letzteres war allerdings mit einer hohen Standardabweichung verbunden. Interessanterweise wurde bei keinem der Transformationsansätze Myrtenal nachgewiesen (Anhang Tabelle 7.1). Unter Berücksichtigung dessen, dass die 20-fache Menge an Biomasse eingesetzt wurde, fiel der generelle Anstieg der Transformationsrate jedoch gering aus. So waren die erzielten absoluten Ausbeuten – abgesehen von den oben genannten Ausnahmen – zum Teil nahezu identisch (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Absolute Produktausbeuten nach Transformation von α -Pinen mit Submerskulturen (Sub) beziehungsweise Kulturen mit konzentrierter Biomasse (KBM); MSC = *Marasmius scorodoni*, CCA = *Cystoderma carcharias*, CSTR = *Cyathus striatus*, TVE = *Trametes versicolor*

Substanz	Produktausbeute _{absolut} / μg							
	MSC	MSC	CCA	CCA	CSTR	CSTR	TVE	TVE
	Sub	KBM	Sub	KBM	Sub	KBM	Sub	KBM
(<i>E</i>)-Verbenol + Verbenon	1366	1566	814	756	1455	1463	1527	4259
Myrtenal	7	0	9	0	0	0	0	0
(<i>E</i>)-Pinocarveol	98	38	0	0	148	132	145	193
(<i>Z</i>)-Verbenol	16	5	25	12	57	73	138	87
Myrtenol	213	560	33	11	122	126	176	225
(<i>E</i>)-Carveol	37	67	0	0	7	0	24	124

3.3.4 Lyophilisate

Die Gefriertrocknung von Mikroorganismen ist vorrangig als Methode zur Konservierung bekannt (Kim und Kubica 1973; Tan 1997; Singh *et al.* 2004). Lyophilisierte Kulturen können aber auch zur Transformation einer Reihe von Substraten eingesetzt werden. So wurde die Reduktion ausgewählter Ketone durch Lyophilisate zweier Hefen (*Zygosaccharomyces rouxii* und *Debaryomyces hansenii*) beschrieben (Erdélyi *et al.* 2006), und gefriergetrocknete Zellen des dimorphen Pilzes *Mucor rouxii* wurden zur Reduktion verschiedener β -Ketoester eingesetzt (Mangone *et al.* 2002). Auch Veresterungen mit Hilfe von lyophilisierten Hefen sind möglich (Romano *et al.* 2005). Darüber hinaus existieren eine Reihe von

Veröffentlichungen über den Einsatz von Lyophilisaten zweier Schimmelpilze (*Aspergillus oryzae* und *Rhizopus oryzae*) zur Veresterung diverser Substrate in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Molinari *et al.* 2000; Gandolfi *et al.* 2001; Torres *et al.* 2003; Romano *et al.* 2006). Die Oxyfunktionalisierung von Substraten ist ebenfalls möglich. Zum Beispiel wurde die Oxidation von Himbeeralkohol zu Himbeerketon durch Lyophilisate von *Rhodococcus equi* und *R. ruber* beschrieben (Kosjek *et al.* 2003). Interessanterweise war die Biotransformation mit Submerskulturen nicht möglich. Erst der Einsatz von ruhenden Zellen oder Lyophilisaten ermöglichte eine Produktbildung. Ebenfalls lieferte die Umsetzung von (+)-Valencen zu Nooktaton mit Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* nur marginale Ausbeuten. Durch die Gefriertrocknung des Pilzmyzels wurde jedoch ein hochpotenter Biokatalysator erhalten (Kaspera 2004).

Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Oxyfunktionalisierung von α -Pinen mit *Cystoderma carcharias* beobachtet. Eine Biotransformation durch Submerskulturen und Kulturen mit konzentrierter Biomasse wurde nicht beobachtet (2.1.3, 2.1.4). Hingegen war eine Umsetzung mit Lyophilisaten möglich, verglichen mit den anderen untersuchten Basidiomyceten fiel die Aktivität jedoch gering aus (2.1.6). *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* zeigten den höchsten Aktivitätsanstieg durch Lyophilisierung (2.1.8).

Vor allem die Ausbeuten an (*E*)-Verbenol und Verbenon wurden gesteigert (*M. scorodonius*: Faktor 4, *T. versicolor*: Faktor 5). Die Ausbeute an (*E*)-Pinocarveol wurde ebenfalls durch den Einsatz von Lyophilisaten von *M. scorodonius* um den Faktor 9 im Vergleich zur Submerskultur erhöht. Die Transformation mit Lyophilisaten lieferte somit die höchsten Produktausbeuten bezogen auf das eingesetzte Volumen des Transformationsmediums. Nur Kulturen mit konzentrierter Biofeuchtmasse von *T. versicolor* erzielten ähnlich hohe Ausbeuten, allerdings bei einer 28 Stunden längeren Transformationsdauer. Analoge Ergebnisse wurden bei der Verwendung von Lyophilisaten von *P. sapidus* zur Transformation von α -Pinen beobachtet. Im Vergleich zu Submerskulturen wurde eine Verachtfachung des (*E*)-Verbenolgehalts und eine um den Faktor 20 gesteigerte Ausbeute an Verbenol erzielt (Hardebusch 2006).

Werden die Ausbeuten auf die eingesetzte Biofeuchtmasse bezogen, zeigten hingegen die Transformationen mit Submerskulturen die besten Ergebnisse (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Beispielhafter Vergleich der Produktausbeuten nach Transformation von α -Pinen durch *Marasmius scorodonius* bezogen auf die eingesetzte Biofeuchtmasse

Substanz	Gehalt / $\mu\text{g g}^{-1}$ Biofeuchtmasse		
	Submerskultur	Kultur mit konzentrierter Biomasse	Lyophilisat
(<i>E</i>)-Verbenol + Verbenon	273	31	72
Myrtenal	2	0	2
(<i>E</i>)-Pinocarveol	20	1	11
(<i>Z</i>)-Verbenol	3	0	2
Myrtenol	43	11	8
(<i>E</i>)-Carveol	7	1	1

3.4 Transformation des Sesquiterpens (+)-Valencen

3.4.1 Chemosynthese von (+)-Nootkaton

Es ist bisher nicht bekannt, warum in einigen Pflanzen, wie zum Beispiel den *Valencia*-Orangen, während der Fruchtreifung (+)-Valencen akkumuliert wird, jedoch in den genetisch eng verwandten Grapefruitpflanzen aus (+)-Valencen (**18**) über Nootkatol (**27**) als Endprodukt (+)-Nootkaton (**21**) gebildet wird (Sharon-Asa *et al.* 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass in den entsprechenden Zitrusfrüchten die Biosynthese von (+)-Nootkaton über (+)-Valencen durch Hydroxylierung und anschließende Dehydrierung verläuft (Abbildung 3.1) (Drawert *et al.* 1984; del Río *et al.* 1992). Ein endgültiger Beweis steht noch aus.

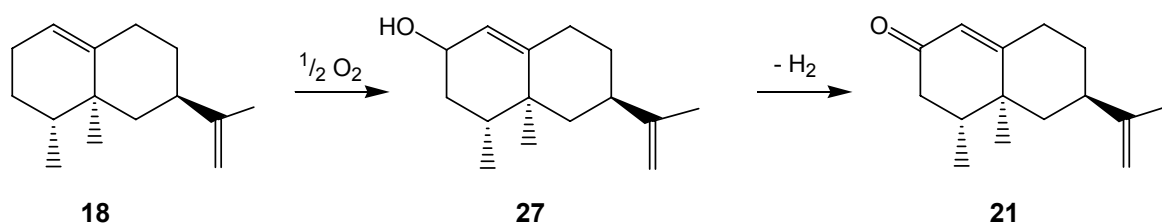


Abbildung 3.1: Oxidation von (+)-Valencen (**18**) über Nootkatol (**27**) zu (+)-Nootkaton (**21**)

Die Nootkatonbiogenese deckt den Bedarf allerdings bei weitem nicht, und die Extraktion aus natürlichen Quellen ist zudem kostspielig und unwirtschaftlich. Zur Aromatisierung von Lebensmitteln, Parfüms und anderen Kosmetika findet daher in der Regel chemosynthetisch hergestelltes (+)-Nootkaton Verwendung. Die Synthesestrategien beruhen meist auf einer Oxidation von (+)-Valencen mit starken, zum Teil gesundheitsschädlichen Oxidationsmitteln. So wurde die Oxidation von Valencen mit carcinogenem tertiärem Butylchromat (Hunter und Brogden 1965b), mit Natriumdichromat und Essigsäure (Shaffer *et al.* 1975) sowie mit tertiärem Butylperacetat (Wilson und Shaw 1978) beschrieben. Salvador und Clark (2002) verwendeten immobilisierte Metallkomplexe basierend auf Co(II), Cu(II), Mn(II) und V(II) als Katalysatoren bei der Oxidation von Valencen durch tertiäres Butylhydroperoxid. Eine Methode zur stereoselektiven Photooxygenierung von Valencen zu Nootkaton in Gegenwart von Bengalrosa und Benzen (Schulte-Elte *et al.* 1970) wurde ebenso veröffentlicht wie die Photooxygenierung in Gegenwart von Cu(I)-Salzen (Ohloff 1971). Aber auch die Synthese ausgehend von Cyclohexen- (Pesaro *et al.* 1968) sowie Cyclohexadienderivaten (Dastur 1973), 4-Oxoheptandisäuredimethylester (Marshall und Ruden 1971), (+)-Nopinon (Yanami *et al.* 1980), 4 β ,4 α β -Dimethyl- $\Delta^{6,7}$ -octalinon-ethylenacetal (Torii *et al.* 1982), 3-Ethoxy-5-methyl-cyclohex-2-enon (Majetich *et al.* 1985) oder (-)- β -Pinen (Sauer *et al.* 2005) ist möglich.

Rechtlich besitzen die Syntheseprodukte nicht den Status eines natürlichen Aromastoffs. Dies ist vor allem für die Lebensmittelindustrie mit erheblichen Marketingnachteilen verbunden, da naturidentisches (+)-Nootkaton vom Verbraucher nicht im selben Maße wie natürliches akzeptiert wird. Vor diesem Hintergrund wurden intensive Bemühungen unternommen, ausgehend von dem bei der Produktion von Orangensaft in großen Mengen anfallenden (+)-Valencen, einen biotechnologischen Zugang zu natürlichem (+)-Nootkaton zu eröffnen (siehe auch 3.4.2).

Eher zufällig wurde die eisenkatalysierte Darstellung von (+)-Nootkaton entdeckt: Bei der Lagerung von Orangensaft in unlackierten Weißblechdosen wurden Fehlparfums durch eine auffällige Grapefruitnote festgestellt, die bei in Flaschen gelagerten Säften nicht auftrat. In Modellversuchen wurde gezeigt, dass Nootkaton aus Valencen durch Kontakt mit Weißblech als Verpackungsmaterial oder Eisen entsteht (Bielig *et al.* 1972). Willershausen und Graf (1991a) untersuchten schließlich gezielt die metallkatalysierte Transformation von Valencen zu Nootkaton. Valencen wurde in wässrigen Puffern mit Eisen(II)-, Nickel(II)-, Zink(II)-, Kobalt(II)- oder Mangan(II)-sulfat sowie Kupfer(I)-chlorid inkubiert. Nach 8 Stunden war nur in den Ansätzen mit Eisen(II)-sulfat Nootkaton nachweisbar; nach 20-stündiger Inkubation in deutlich geringeren Ausbeuten (18% im Vergleich zur Umsetzung mit Eisen(II)-sulfat) auch in den Ansätzen mit Mangansulfat. Angaben zu den erzielten Gehalten wurden jedoch nicht gemacht. Unter 2.2.1 wurde bestätigt, dass durch Inkubation von (+)-Valencen mit Eisen(II)-sulfat (+)-Nootkaton gebildet wird. Bevor die enzymatisch katalysierte Umsetzung von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* näher charakterisiert wurde, musste daher der durch Metallkatalyse oder andere rein chemische Prozesse erzeugte Beitrag zur Nootkatonsynthese im verwendeten Transformationssystem näher untersucht werden. Für den Fruchtkörper von *Pleurotus sapidus* wurde ein Eisengehalt von circa $0,2 \text{ mg g}^{-1}$ Trockenmasse publiziert (Guo *et al.* 2007). Bezogen auf die durchgeführte Umsetzung von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* würde daraus ein Eisengehalt von $0,2 \text{ } \mu\text{mol}$ ($0,1 \text{ mM}$) pro Transformationsansatz (5.6.2.1) resultieren. Für Pilzmyzel aus Submerskulturen lagen hingegen keine Werte vor. Es werden jedoch große Differenzen aufgrund der stark unterschiedlichen Wachstumsbedingungen vermutet. Es war davon auszugehen, dass die Mineralstoffe primär durch die Zugabe der Spurenelementlösung (5.4.1, Tabelle 5.10) zu den Nährlösungen in das Transformationssystem eingebracht wurden. Die als katalytisch aktiv beschriebenen Eisen(II)-Ionen waren zwar nicht in der Spurenelementlösung vorhanden, jedoch unter anderem Fe^{3+} und Mn^{2+} . Unter der Annahme, dass sich die dem Medium zugesetzten Metallsalze vollständig im Lyophilisat wiederfanden und Fe^{3+} dabei quantitativ reduziert wurde, wurde berechnet, dass bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 13 g Lyophilisat pro Rührkesselreaktor maximal 3 nmol ($2 \text{ } \mu\text{M}$) Eisen(II)-Ionen durch den Biokatalysator in den Transformationsansatz eingebracht werden konnten (Σ Spurenelemente 8 nmol , $5 \text{ } \mu\text{M}$).⁸ Der 6-fache molare Überschuss an Eisen(II)-sulfat

⁸ Dieser Berechnung wurde ein Gesamtvolumen von $2,7 \text{ mL}$ Spurenelementlösung zu Grunde gelegt ($0,2 \text{ mL}$ zur Anzucht der Vorkultur und $2,5 \text{ mL}$ für das Medium des Rührkesselreaktors).

(11 μM) führte bei der Umsetzung von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton hingegen nur zu vernachlässigbaren Transformationsausbeuten, höhere Gehalte wurden erst bei einem 1 mM Zusatz nachgewiesen (2.2.1).

Nach thermischer Behandlung des Lyophilisats im kochenden Wasserbad und anschließender Inkubation von (+)-Valencen wurden nur vernachlässigbare Gehalte an (+)-Nootkaton detektiert (2.3.5.1). Es ist jedoch bekannt, dass durch Hitzeeinwirkung Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird. Die Inkubation von (+)-Valencen mit einer analog behandelten Eisen(II)-sulfatlösung (11 mM) führte hingegen zu einer deutlichen Nootkatonsynthese (2.2.1). Der vollständige Verlust der Transformationsaktivität durch Erhitzen des Lyophilisats im Gegensatz zur weiterhin beobachteten Bildung von (+)-Nootkaton durch eine thermisch behandelte Eisen(II)-salzlösung legt einen anderen Wirkmechanismus nahe.

Durch Inhibitorversuche wurde die Rolle von Eisen(II)-Ionen bei der Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* weiter untersucht (2.2.1, Tabelle 2.3 und 2.3.4, Tabelle 2.6). Der Zusatz des Singulett-Sauerstoffquencher Diazabicyclooctan (DABCO, 0,1 mM) inhibierte die Transformationsaktivität des Lyophilisats nicht (108% der $\Sigma \alpha$ -, β -Nootkatol, (+)-Nootkaton im Vergleich zur Transformation ohne Zusatz), verringerte jedoch die eisenkatalysierte Umsetzung von (+)-Valencen stark (44% Aktivität). Die Hemmung der Reaktion von Valencen mit Eisen(II)-Salzen durch DABCO wurde in der Literatur beschrieben (Willershausen und Graf 1991a). Andererseits wurden mit Natriumchlorid und Natriumbromid (je 2,0 M) zwei Inhibitoren gefunden, die die Aktivität des Lyophilisats stark hemmten (36% und 18% Aktivität), jedoch die Umsetzung von (+)-Valencen mit Eisen(II)-sulfat nicht beziehungsweise kaum beeinträchtigten (115% und 89% Aktivität). Zusammenfassend kann ein Beitrag der Eisen(II)-Ionen-Katalyse zur Nootkatonsynthese ausgeschlossen werden. Ein autoxidativer Beitrag der verwendeten Transformationspuffer zur Nootkatonbildung wurde durch entsprechende Blindwertexperimente ebenfalls ausgeschlossen (2.2.1, 2.3.5.1). Dies korrelierte mit den Ergebnissen zur Autoxidation von (+)-Valencen in SNL-H-Medium: Selbst nach 9-tägiger Inkubation von (+)-Valencen (2,25 mM) wurden maximal 2 mg L^{-1} (+)-Nootkaton nachgewiesen (Kaspera 2004).

Durch thermische Behandlung oder durch den Kontakt mit einem Katalysator ist (+)-Nootkaton (**21**) aus Valencen-2-hydroperoxid (**28**) darstellbar (Huang *et al.* 1999) (Abbildung 3.2).

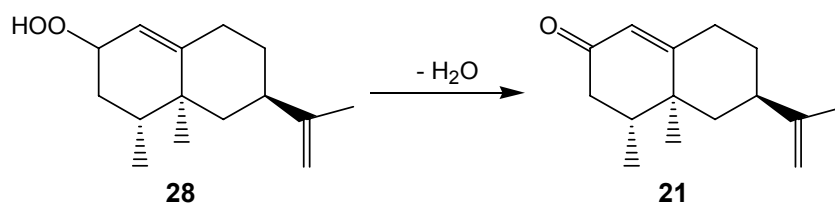


Abbildung 3.2: Reaktion von Valencen-2-hydroperoxid (**28**) zu (+)-Nootkaton (**21**)

Um einen derartigen Zerfall eventuell autoxidativ gebildeter Hydroperoxide auszuschließen, wurde die Qualität des eingesetzten (+)-Valencens mittels HPLC-UV überprüft. Zusätzlich wurde das Substrat säulenchromatographisch gereinigt sowie mit einem Reduktionsmittel versetzt und anschließend jeweils gaschromatographisch untersucht: Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine Verunreinigung des verwendeten Substrats mit Valencenhydroperoxiden (2.2.2). Außerdem wurde eine Vakuumdestillation einer 70-prozentigen Valencenqualität durchgeführt. Unter der Annahme, dass bereits im Substrat vorhandene Valencen-2-hydroperoxide an der Bildung von (+)-Nootkaton in Gegenwart von Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* beteiligt waren, hätte der Einsatz von gereinigtem (+)-Valencen zur Abnahme der Produktausbeute führen müssen. Durch die Destillation wären gegebenenfalls vorhandene Valencen-2-hydroperoxide gespalten und die Reaktionsprodukte abgetrennt worden. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Beim Einsatz des gleichen Substratvolumens wurden durch die Transformation des destillierten Substrats höhere Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton erzielt (2.2.2). Ein Beitrag zur Nootkatongenese durch verunreinigtes Substrat wurde somit ebenfalls ausgeschlossen. Daher konnten die Versuche zur Charakterisierung des Transformationssystems (2.3) bedenkenlos mit nicht gereinigtem Substrat durchgeführt und von einer enzymatisch katalysierten Umsetzung ausgegangen werden.

3.4.2 Biosynthese von (+)-Nootkaton

Neben den beschriebenen chemosynthetischen Methoden (3.4.1) wurde eine Vielzahl von Verfahren zur Biotransformation von Valencen publiziert. Nootkaton wurde zum Beispiel mit Hilfe von vitalen Kulturen von Bakterien, Algen, höheren Pflanzen, Asco- und Basidiomyceten, aber auch mit nicht vitalen Systemen oder durch den direkten Einsatz von (zum Teil rekombinanten) Enzymen synthetisiert (vergleiche Tabelle 3.6).

Die erste in der Literatur erwähnte Biotransformation von Valencen stammt aus dem Jahr 1973 (Dhavlikar und Albroscheit 1973). Valencen wurde mit zwei isolierten *Enterobacter*-Arten (eine aus holländischer Erde, die andere aus infiziertem einheimischen Bier) zu (+)-Nootkaton transformiert (maximale Ausbeute 12% w/w). Die Biotransformation von Valencen mit Zellkulturen von Grapefruit (*Citrus paradisi*) führte nach sechs Stunden Inkubationsdauer zu Nootkatongehalten von 1,11 mg L⁻¹ (20% w/w) (Drawert *et al.* 1984). Eine enzymatische Transformation von Valencen mit Ligninperoxidase-Präparaten aus *Phanerochaete chrysosporium* und Lactoperoxidase zu Nootkaton wurde ebenfalls beschrieben (Willershausen und Graf 1991b). Die Autoren machten jedoch keine Angaben zu den Produktausbeuten. Del Río *et al.* (1991) verwendeten verschiedene *Citrus*-Arten zur Biosynthese von Nootkaton. Sie untersuchten die Akkumulation von Valencen und Nootkaton und erzielten die höchsten Nootkatonausbeuten mit neun Monate alten Kalluskulturen von *Citrus paradisi* (1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ Biofeuchtmasse).

1994 wurde in einem Patent die Biosynthese von Nootkaton durch einen *Rhodococcus*-Stamm (KSM-5706) beschrieben (Okuda *et al.* 1994). Jedoch fiel die Ausbeute erneut nur sehr gering aus: In Schüttelkolben (50 mL) wurden aus 500 mg Valencen lediglich 2,5 mg Nootkaton (0,5% w/w) dargestellt.⁹ Die Oxidation von Valencen durch ungesättigte Fettsäurehydroperoxide (synthetisiert *in situ* durch Lipoxygenasen) wurde 1998 patentiert (Muller *et al.* 1998). Diese enzymatische Cooxidation lieferte Nootkatonausbeuten von bis zu 60 g kg⁻¹ Reaktionsmedium. Ebenfalls patentiert wurde die Darstellung von Nootkaton aus Valencen mit Hilfe von Laccasen (Huang *et al.* 1999). Durch Zugabe von Valencen zu Pilzkulturen mit hohen Laccaseaktivitäten (*Botrytis cinerea* und *Trametes versicolor*) wurde Nootkaton über Valencenhydroperoxide gebildet. Nach zwei Tagen betrug die Transformationsrate mit *B. cinerea* 29% (w/w). Zusätzlich wurde von den Autoren die Darstellung von Nootkaton durch isolierte Enzympräparate beschrieben. Neben der Transformation von Valencen mit Laccasen wurden Cytochrom P450-Monooxygenase-katalysierte Umsetzungen durchgeführt. Dazu wurden mikrosomale Präparationen aus Zichorienwurzeln (*Cichorium intybus* L.) verwendet, die sich durch eine vernachlässigbare Bildung von Nebenprodukten auszeichneten (de Kraker *et al.* 2003). Absolute Transformationsausbeuten wurden jedoch nicht angegeben und ausreichende Mengen dieses Biokatalysators stehen ebenfalls noch nicht zur Verfügung.

Kaspera (2004) verwendete erstmals Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* zur Nootkatonbiosynthese. Innerhalb von 13 Stunden wurden bis zu 250 mg L⁻¹ (4% w/w) (+)-Nootkaton synthetisiert. Die Oxyfunktionalisierung von (+)-Valencen mit rekombinanten P450_{cam}-Enzymen aus *Pseudomonas putida* mit einer maximalen Ausbeute von 9% (w/w) wurde 2005 publiziert (Sowden *et al.* 2005). Die Umsetzung mit rekombinanten P450_{BM-3}-Enzymen wurde ebenfalls beschrieben, führte neben (+)-Nootkaton jedoch zu einer Reihe weiterer Produkte. Auch Submerskulturen des Ascomyceten *Chaetomium globosum* wurden zur Darstellung von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen eingesetzt (Kaspera *et al.* 2005). Nach dreitägiger Transformation wurden 8 mg L⁻¹ (9% w/w) (+)-Nootkaton erzielt, wobei wiederum zahlreiche flüchtige und nicht flüchtige Nebenprodukte gebildet wurden. Kaspera *et al.* postulierten ebenfalls die Beteiligung einer Cytochrom P450-Monooxygenase. Außerdem sind Pflanzenzellkulturen von *Gynostemma pentaphyllum*, *Caragana chamlagu* und *Hibiscus cannabinus* zur Nootkatonsynthese aus (+)-Valencen befähigt (Sakamaki *et al.* 2005). Maximale Ausbeuten an (+)-Nootkaton wurden nach 20-tägiger Transformation mit *G. pentaphyllum* erzielt (600 mg L⁻¹, 66% w/w). Die Oxyfunktionalisierung von (+)-Valencen mit drei Grünalgenarten (*Chlorella*) wurde ebenfalls publiziert (Furusawa *et al.* 2005). Nach 18-tägiger Transformation mit *Chlorella fusca* var. *vacuolata* betrug die Ausbeute an (+)-Nootkaton 63% (w/w). Zusätzlich wurde die Biokonversion von (+)-Valencen mit einer *Mucor*-Pilzart und verschiedenen Stämmen der phytopathogenen Pilze *Botryosphaeria dothidea* und *Botryodiplodia theobromae* durchgeführt.

⁹ Das zitierte Patent wurde auf Japanisch verfasst. Die angegebenen Parameter und Ausbeuten wurden aus Huang *et al.* 1999 übernommen.

Ein direkter Vergleich der Transformationssysteme und eine Bewertung sind aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsparameter (Transformationsdauer, Temperatur, pH-Wert sowie eingesetzte Substrat- und Enzymkonzentration *et cetera*) schwierig. Zum Beispiel waren die publizierten Ausbeuten der Cooxidation von Valencen mit Lipoxygenase aus Sojabohnen über Fettsäurehydroperoxide mit bis zu 60 g kg^{-1} Reaktionsansatz die bisher höchsten (Muller *et al.* 1998). Jedoch wurden in diesem Fall 10 g Valencen in einem Reaktionsansatz (70 g) für 24 Stunden unter einer reinen Sauerstoffatmosphäre bei pH 8,0 (konstant) und $70 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, obwohl die Halbwertszeit der Sojalipoxygenase-1 bei $69 \text{ }^\circ\text{C}$ lediglich 25 Minuten beträgt (Christopher *et al.* 1970). Leider machten Muller *et al.* keine Angabe über autoxidative Prozesse unter diesen drastischen Bedingungen, und interessanterweise sank die erzielte molare Ausbeute bei der Reduzierung der Reaktionstemperatur auf $24 \text{ }^\circ\text{C}$ von 37% auf 1%. Eine reine enzymatische Transformation ist in diesem Fall zumindest fraglich. Ebenfalls hohe Ausbeuten lieferte die Nootkatonsynthese mit Hilfe von Laccasen (Huang *et al.* 1999). Dabei handelte es sich jedoch primär um eine enzymatische Synthese von Valencenhydroperoxid, welches in einem zweiten Reaktionsschritt (durch thermisch-chemische Degradation bei mindestens $55 \text{ }^\circ\text{C}$ unter alkalischen Bedingungen oder Schwermetallkatalyse mit Cobalt oder Kupfer) zu Nootkaton oxidiert wurde.

Zusammengefasst lieferten die meisten bisherigen Systeme entweder sehr niedrige molare Ausbeuten, benötigten lange Transformationszeiten oder wiesen die eben genannten anderen Nachteile auf (Tabelle 3.6). Deshalb ist es trotz der zahlreichen einschlägigen Publikationen und Patente bislang nicht gelungen, ein biotechnologisches Verfahren zur Nootkatonproduktion im industriellen Maßstab zu etablieren.

Tabelle 3.6: Vergleich ausgewählter Transformationssysteme zur Darstellung von Nootkaton aus Valencen; ^a = aus Literaturangabe berechnet, ^b = aus Huang *et al.* 1999, ^c = mg kg^{-1}

Literatur	System	Dauer	T / °C	c / mg L^{-1}	mol%
Drawert <i>et al.</i> 1984	Pflanzenzellkultur (<i>Citrus paradisi</i>)	6 h	27	1	19 ^a
Okuda <i>et al.</i> 1994	Bakterienkultur (<i>Rhodococcus</i> -Stamm)	5 d	30	50 ^b	1 ^a
Muller <i>et al.</i> 1998	enzymatische Cooxidation (Soja-Lipoxygenase)	24 h	70	57.480 ^c	37 ^a
			24	2.260 ^c	1 ^a
Huang <i>et al.</i> 1999	Pilzkultur (Laccasen aus <i>Botrytis cinerea</i>)	2 d	25 - 30	1.296 ^a	27 ^a
Kaspera 2004	lyophilisiertes Pilzmyzel (<i>Pleurotus sapidus</i>)	13 h	24	250	4 ^a
Kaspera <i>et al.</i> 2005	Pilzkultur (<i>Chaetomium globosum</i>)	3 d	24	8	8 ^a
Sakamaki <i>et al.</i> 2005	Pflanzenzellkultur (<i>Gynostemma pentaphyllum</i>)	20 d	25	600 ^a	62 ^a
Furusawa <i>et al.</i> 2005	Pflanzenzellkultur (<i>Chlorella fusca</i>)	18 d	25	252 ^a	59 ^a
vorliegende Arbeit	lyophilisiertes Pilzmyzel (<i>Pleurotus sapidus</i>)	24 h	24	320	11
				266	45

3.4.2.1 Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

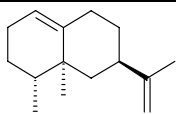
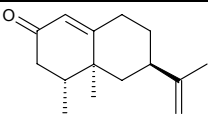
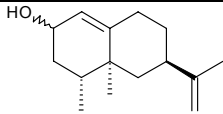
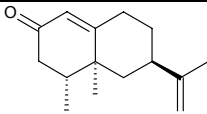
Verglichen mit den bisher publizierten Daten zur biotechnologischen Darstellung von Nootkaton waren die in dieser Arbeit erzielten Gehalte an (+)-Nootkaton vielversprechend (3.4.2, Tabelle 3.6). Um das System besser zu verstehen und dadurch in einem nächsten Schritt gezielt optimieren zu können, war es nötig, Erkenntnisse über das zugrunde liegende Enzymsystem zu erhalten. Deshalb wurde eine Reihe von Experimenten zur Charakterisierung der Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* durchgeführt (2.3).

Die Verwendung eines aus einem Ganzzellsystem hergestellten Biokatalysators führte zwangsläufig zu einem komplexen Transformationssystem. Die Nootkatonsynthese unterlag daher den für biologische Systeme üblichen Schwankungen. Um diese so gering wie möglich zu halten, wurden größere Mengen der benötigten Biomasse im Rührkesselreaktor gezüchtet (5.4.4.1) und so ein möglichst homogener Biokatalysator erzeugt. Dies führte dazu, dass im Rahmen der jeweils durchgeführten Doppelbestimmungen der einzelnen Transformationsversuche meist gut reproduzierbare Werte ermittelt wurden (relative Standardabweichung in der Regel $\leq 6\%$), die erzielten Produktausbeuten jedoch vor allem zwischen den einzelnen Reaktoransätzen höhere Abweichungen zeigten (Anhang Tabelle 7.2). Durch das Mitführen von Vergleichs- und Blindwerten wurde diesem Umstand Rechnung getragen. Eine mögliche Ursache für die Abweichungen zwischen den einzelnen Reaktoransätzen bestand darin, dass das Wachstum des Pilzes im Fermenter (trotz gleicher Versuchsbedingungen) zum Teil unterschiedlich ausfiel. Um eine akzeptable Ausbeute an Biomasse zu erzielen, musste die Kulturdauer zwischen drei und fünf Tagen variiert werden. Dass dies Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben kann, wurde durch entsprechende Versuche mit Kulturen in Schüttelkolben gezeigt (2.6.2.1). Wünschenswert wäre ein Enzymtest gewesen, durch den die Aktivität parallel zur Anzucht der Biomasse im Reaktor hätte bestimmt werden können. Dies hätte unter anderem die Ernte des Pilzes am Tag der höchsten Enzymaktivität ermöglicht. Da jedoch der Biokatalysator erst durch die anschließende Lyophilisierung erzeugt wurde, war die Entwicklung eines Testsystems ohne Kenntnis über das zugrunde liegende Enzymsystem unmöglich. Ebenso war die parallele Probenahme nicht praktikabel, da sich die Lyophilisierung, Transformation und Analytik über mehrere Tage erstreckte. Der Zeitpunkt der Ernte musste daher visuell bestimmt und die schwankenden Qualitäten des erzeugten Biokatalysators in Kauf genommen werden.

Auch zwischen einzelnen Doppelbestimmungen der Transformationen mit Lyophilisat aus demselben Reaktoransatz zeigten sich zum Teil deutliche Abweichungen (Anhang Tabelle 7.2). Als Ursache wäre eine unterschiedliche Körnung des Lyophilisats denkbar und somit eine variierende Zugänglichkeit des Substrats zum Biokatalysator, aber auch ein unterschiedlicher Sauerstoffgehalt des Transformationspuffers. Eine Anreicherung des Puffers mit Sauerstoff führte nicht zu einer Steigerung (bei vergleichsweise niedrigen Ausbeuten), eine Abreicherung jedoch zu einem fast vollständigem Verlust der Aktivität (2.3.10).

Die erzielten Produktausbeuten waren von der Substratdosierung abhängig (2.3.3). Mit steigender Substratdosierung wurden höhere Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton erzielt, wobei die molaren Ausbeuten jedoch abnahmen. Der höchste molare Umsatz wurde bei einer Substratdosierung von 1 μ L beobachtet, die höchsten Ausbeuten jedoch bei einer Dosierung von 10 μ L (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Maximal erzielte Ausbeuten nach Transformation von (+)-Valencen mit 50 mg Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM Puffer für 24 Stunden; Nr. = Fermentationsansatz; Art = Transformationssystem; Lyo. = Lyophilisat; Rek. = Rekombinat; MOPS = MOPS, pH 7,0; TRIS = TRIS-HCl, pH 7,5

						
Nr.	Art	Puffer	(+)-Valencen V / μ L	(+)-Nootkaton c / mg L ⁻¹ mol%	Σ α -, β -Nootkatol, (+)-Nootkaton c / mg L ⁻¹ mol%	
9	Lyo.	MOPS	10	303 5	436	7
9	Lyo.	TRIS	10	317 5	466	8
9	Lyo.	TRIS	5	320 11	436	15
10	Lyo.	TRIS	1	266 45	342	58
9	Rek.	MOPS	10	427 7	599	10

Eine Erhöhung der Transformationsdauer führte zu einer Abnahme der Ausbeuten (2.3.11). Die Bildung mehrfach oxidierte Produkte wäre eine mögliche Ursache, konnte jedoch durch die gaschromatographische Untersuchung an einer polaren Trennphase (5.10.2.2) nicht beobachtet werden. Weil die Transformation von 1 μ L (+)-Valencen zu den höchsten molaren Ausbeuten führte und die Chromatographie gleichzeitig deutlich verbessert wurde, wurde diese Substratdosierung für die weiteren Experimente verwendet.

3.4.2.2 Charakterisierung des Transformationssystems

Ausgangspunkt der Charakterisierung des Transformationssystems war die Umsetzung von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* in 100 mM MOPS, pH 7,0 (Kaspera 2004). Kaspera rehydratisierte das Lyophilisat vor der Substratzugabe für 1 Stunde. Es stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine Variation der Rehydratisierungsdauer auf die Transformationsaktivität ausübte. Die beobachtete Verringerung der Nootkatonsynthese mit steigender Rehydratisierungsdauer (2.3.1) wäre dadurch zu erklären, dass Enzyme in Gegenwart ihrer Substrate häufig eine höhere Stabilität aufweisen. Wieso hingegen die Synthese von α -Nootkatol und β -Nootkatol nahezu unverändert blieb, konnte nicht erklärt werden. Da die höchsten Ausbeuten durch die unmittelbare Zugabe des Substrats erzielt wurden, wurde in allen folgenden Standardversuchen auf die Wartezeit vor der Substratdosierung verzichtet. Die abnehmende (+)-Nootkaton- bei gleichbleibender Nootkatolsynthese könnte die Beteiligung mehrerer Enzyme implizieren. So wäre eine allylische Oxidation von (+)-Valencen durch eine Oxidoreduktase zu Nootkatol und im

zweiten Schritt eine durch Dehydrogenasen katalysierte Oxidation zu (+)-Nootkaton vorstellbar (Abbildung 3.3).

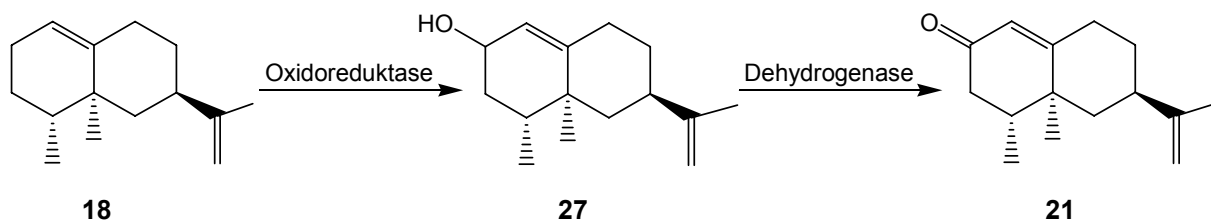


Abbildung 3.3: Postulierte enzymatische Oxidation von (+)-Valencen (**18**) über Nootkatol (**27**) zu (+)-Nootkaton (**21**)

Jedoch wurden bei allen durchgeführten Experimenten höhere Ausbeuten an (+)-Nootkaton im Vergleich zu den Alkoholen quantifiziert, auch und vor allem bei den durchgeführten Enzymreinigungen. Dass es bei keiner der durchgeführten Methoden (2.4) zu einer Trennung der beteiligten Enzyme kam (und somit zu einer Akkumulation der Alkohole), ist jedoch eher unwahrscheinlich. Möglicherweise war deshalb nur ein einzelnes Enzym an der Transformation beteiligt.¹⁰

Erst durch die Lyophilisierung¹¹ des Myzels von *P. sapidus* wurde ein aktiver Biokatalysator erhalten, da die Transformation von (+)-Valencen mit Submerskulturen nur zu vernachlässigbaren Produktausbeuten führte (Kaspera 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass an der Katalyse mindestens drei Komponenten beteiligt waren. Eine (Komponente 1) war in MOPS-Puffer (pH 7,0) und TRIS-Puffer (pH 7,5) löslich und hitzelabil. Bei dieser handelte es sich um mindestens ein an der Umsetzung beteiligtes Enzym. Eine weitere, hitzestabile Komponente (Komponente 2) war in den oben genannten Puffern unlöslich und verblieb im Zentrifugationsrückstand. Diese Komponente war als Cofaktor¹² an der Transformation beteiligt (2.3.5.1). Durch Ultrafiltration (MWCO \geq 5 kDa) des separierten Überstandes ließ sich ein weiterer löslicher, hitzestabiler Cofaktor (Komponente 3) abtrennen (Abbildung 3.4; 2.3.5.3).

Die Löslichkeit des Enzyms hing vom verwendeten Puffer beziehungsweise pH-Wert ab. Wenn mit einem Natriumcitratpuffer (pH 3,0 und pH 4,0) rehydratisiert wurde, verblieb das Enzym – im Gegensatz zur Rehydratisierung in MOPS- oder TRIS-HCl-Puffer – im Rückstand (2.3.5.1).

¹⁰ Im Folgenden wird daher Einfachheit halber von Zielenzym im Singular gesprochen, obwohl ein Mehrenzymsystem nicht sicher ausgeschlossen wurde.

¹¹ Zum Einsatz von Lyophilisaten zur Biotransformation siehe auch 3.3.4.

¹² Es war nicht auszuschließen, dass die Wirksamkeit der Komponente 2 auf eine rein emulgierende Wirkung zurückzuführen war – es sich demnach im engeren Sinne nicht um einen Cofaktor handelte. Zur Vereinfachung wurde dieser Begriff jedoch im Weiteren beibehalten.

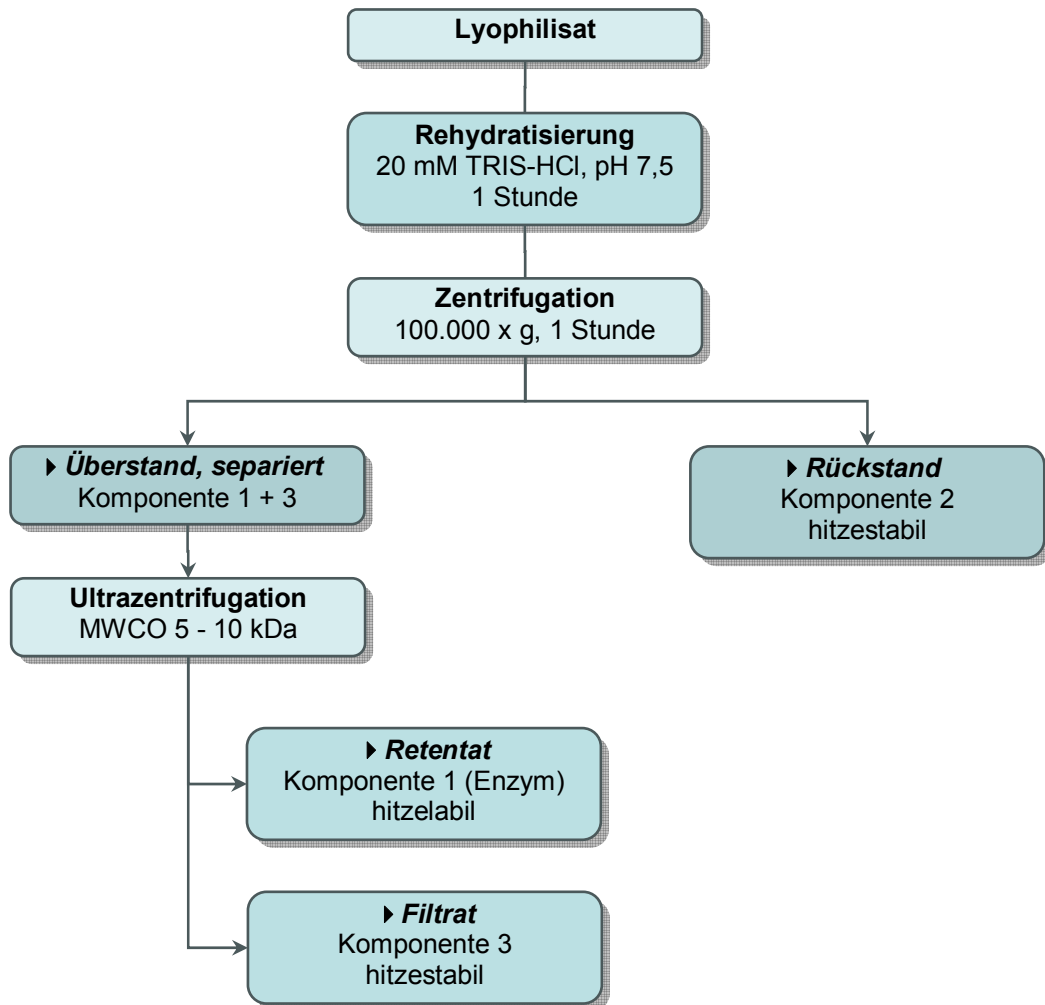


Abbildung 3.4: Schema zur Separation der drei an der Transformation von (+)-Valencen beteiligten Komponenten; MWCO = Ausschlussgrenze

Aufgrund der Tatsache, dass die Enzymaktivität durch Rehydratisierung des Lyophilisats (in ausgewählten Puffern) ohne Zusatz von Detergenzien innerhalb einer Stunde nahezu quantitativ in den Überstand überging (2.3.5.1, Abbildung 2.23), wurde eine direkte Reinigung des separierten Überstandes mit Hilfe der FPLC (2.4.3) angestrebt. Der von Kaspera (2004) verwendete zwitterionische MOPS-Puffer war zur Reinigung an einem Anionenaustauscher (DEAE) ungeeignet. Mit TRIS-HCl stand aber ein kationischer Puffer mit ähnlichem pH-Wert als Alternative zur Verfügung. Zwischen diesen Puffern bestand kein signifikanter Unterschied (Anhang Tabelle 7.2). Für die Ionenaustauschchromatographie (IEX, 2.4.3, 2.4.4) wurde außerdem eine möglichst niedrige Pufferstärke für den Laufpuffer benötigt. Deshalb wurde der Einfluss der Pufferstärke des für die Reinigung an der DEAE-Säule verwendeten TRIS-HCl-Puffers auf die Transformationsaktivität überprüft. Das Optimum lag bei 50 mM, jedoch führte ein 20 mM TRIS-Puffer ebenfalls zu hohen Ausbeuten (2.3.2.2). Im Gegensatz zum schwachen Anionenaustauscher musste für den starken

Kationenaustauscher ein Puffer mit möglichst niedrigem pH-Wert gewählt werden. Es war allerdings nicht möglich, das Zielenzym durch Rehydratisierung in einem entsprechenden Puffer zu lösen (siehe oben). Deshalb wurde das Lyophilisat zuerst mit TRIS-HCl, pH 7,5 separiert, anschließend auf 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert und schließlich zur chromatographischen Trennung eingesetzt (2.4.4). Im Gegensatz zur IEX war die Verwendung eines niedrigmolaren Puffers bei der Gelfiltration (2.4.5) ausgeschlossen. Eine Trennung des Proteingemisches wurde zwar beobachtet, eine Kalibrierung mit Größenstandards war hingegen nicht möglich: Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem experimentell bestimmten K_{AV} -Wert wurde nicht erreicht (5.10.4.2). Für die Gelfiltration wurde daher ein 200 mM TRIS-Puffer eingesetzt. Der Aktivitätsverlust war im Vergleich zum 50 mM Puffer vertretbar (2.3.2.2).

Vor Beginn der Reinigung wurde versucht, den hohen Aktivitätsverlust, der durch das Abtrennen der Cofaktoren während der Enzymreinigung eintrat, zu kompensieren. Der unlösliche Cofaktor (Komponente 2) wurde bereits bei der Probenvorbereitung für die FPLC durch Zentrifugation abgetrennt. Um ausreichend hohe Aktivitäten in den gereinigten Fraktionen zu erhalten, wurden diese anschließend jeweils mit desaktiviertem Rückstand (Komponente 2) rekombiniert. Zur Überprüfung der Aktivität nach Reinigung an der FPLC wurde jedoch mehr Rückstand benötigt, als im Laufe der Probenvorbereitung separiert wurde. Zusätzlich war die Erzeugung des desaktivierten Rückstandes zeitaufwendig. Eine Substitution durch eine lösliche, in großen Mengen zur Verfügung stehende, einfach handhabbare Verbindung war deshalb wünschenswert. Da keine Informationen über das beteiligte Enzymsystem vorlagen, wurde unter anderem untersucht, ob der unlösliche Cofaktor durch einen der gängigen Mediatoren für Laccasen substituierbar war (2.3.6).

Dies war zum Teil möglich: Durch den Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol (**29**, Abbildung 3.5, HOBt; 100 μ M) zur Enzymlösung (separierter Überstand) wurden maximal 57% der Produktausbeuten an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton im Vergleich zu einem Rekombinat erhalten (Steigerung um Faktor 2,8 gegenüber separiertem Überstand). Durch den Zusatz von Detergenzien zum separierten Überstand waren noch weitaus höhere Steigerungen der Aktivität möglich (2.3.6, Abbildung 2.31). In Gegenwart von ASB-C8Ø (**31**; 0,05% w/v) wurden bis zu 214% der Produktausbeuten an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton im Vergleich zu einem Rekombinat erhalten (Steigerung um Faktor 3,9 gegenüber separiertem Überstand). Natriumcholat (**30**) steigerte ebenfalls die Transformationsaktivität deutlich (156% im Vergleich zum Rekombinat, Faktor 2,9 im Vergleich zum separierten Überstand).¹³

¹³ An diesem Beispiel wird deutlich, dass sich je nach gewähltem Bezugspunkt zum Teil Unterschiede in der beobachteten Aktivitätssteigerung ergaben. Dies war auf das schwankende Verhältnis der Ausbeute(Überstand,separiert) / Ausbeute(Rekombinat) zurückzuführen (vergleiche zum Beispiel 2.3.6, Abbildung 2.30 und Abbildung 2.31). Da nach einem Ersatz für die Komponente 2 (Rückstand,desaktiviert) gesucht wurde, wurde vorangig die Aktivität des Rekombinats als Bezugspunkt gewählt.

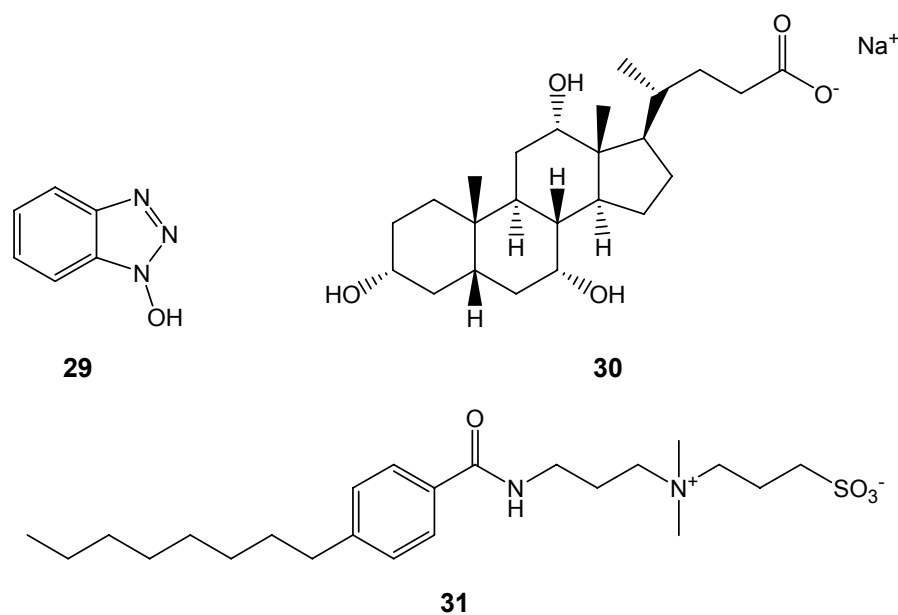


Abbildung 3.5: 1-Hydroxybenzotriazol (**29**), Natriumcholat (**30**), ASB-C8Ø (4-n-Octylbenzylamido-propyldimethylammoniumsulfobetain) (**31**)

Wieso das als Laccase-Mediator bekannte HOBT (Call und Mucke 1997) in der Lage war, den unlöslichen Cofaktor teilweise zu ersetzen, und sowohl das anionische Detergenz Natriumcholat als auch das zwitterionische Detergenz ASB-C8Ø im Vergleich zum Rekombinat zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität führten, ist unbekannt. Bei Natriumcholat und ASB-C8Ø kann vermutet werden, dass sie eventuell die Substratverfügbarkeit erhöhten und zur Stabilisierung des Enzyms beitrugen. Für HOBT muss hingegen ein anderer Mechanismus vermutet werden. Vor allem für ASB-C8Ø wurde gezeigt, dass es integrale Membranproteine zu stabilisieren vermag und deren Löslichkeit erhöht (Henningesen *et al.* 2002). Dass die eingesetzten Detergenzien die bessere Löslichkeit des Enzyms aus dem Lyophilisat ermöglichten und der Anstieg der Produktausbeute auf eine erhöhte Enzymkonzentration im Überstand zurückzuführen war, wurde durch den Zeitpunkt der Zugabe (nach bereits erfolgter Separation) sicher ausgeschlossen. Der simultane Einsatz von ASB-C8Ø und Natriumcholat führte zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität (2.3.6). Vielmehr verringerte der gemeinsame Zusatz die Ausbeuten der Transformation von (nicht separiertem) Lyophilisat um 12% (2.3.11). Dies korrelierte mit der bereits erwähnten Beobachtung, dass eine Erhöhung der Rückstandsmenge in den Rekombinaten ebenfalls eine Erniedrigung der Produktausbeuten zur Folge hatte (2.3.5.2). Ein Problem bei der Verwendung von ASB-C8Ø bestand darin, dass es während der Extraktion der Transformationsansätze mit Pentan/Diethylether (5.7.1.4) zu einer starken Emulsionsbildung kam. Diese trat in Gegenwart von Natriumcholat nicht auf. Natriumcholat stellte daher den am besten geeigneten Ersatz für den unlöslichen Cofaktor (Komponente 2) dar. Der Ersatz der Komponente 2 durch Natriumcholat und die Zugabe zu gereinigten FPLC-Fraktionen führte nicht zur Wiederherstellung der ursprünglichen Aktivität.

Dies lag an der Abtrennung des löslichen, hitzestabilen Cofaktors ($\sim < 5$ kDa, Komponente 3) während der Chromatographie oder einem der benötigten Umpufferungsschritte. Durch separate Erzeugung der Komponente 3 und Zusatz zur aktiven FPLC-Fraktion in Gegenwart von desaktiviertem Rückstand (Komponente 2) führte die Transformation von (+)-Valencen hingegen erneut zu den erwarteten hohen Ausbeuten (2.4.3.1). Bei der Entwicklung der FPLC-Methoden war der Zusatz von separat erzeugtem Ultrafiltrationsfiltrat (Komponente 3) zu den Transformationsansätzen allerdings nicht praktikabel. Für jede einzelne Fraktion hätte das Filtrat separat aus Lyophilisat erzeugt werden müssen. Dies hätte die benötigte Menge an Lyophilisat stark erhöht. Eine Wiederherstellung der Ausgangsaktivität durch den Zusatz beider Cofaktoren nach der Reinigung war jedoch nicht unbedingt nötig. Es kam vorrangig darauf an, ausreichend Enzym zu reinigen und parallel sicher aktive Fraktionen von inaktiven unterscheiden zu können. Dies war auch durch den alleinigen Zusatz beziehungsweise Ersatz des unlöslichen Cofaktors (Komponente 2) möglich.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem löslichen Cofaktor (Komponente 3) um ein Metallion handelte, wurde ein Rekombinat aus Enzym (Ultrafiltrationsretentat) und Komponente 2 (Rückstand, desaktiviert) mit einer Spurenelementlösung supplementiert, die FeCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , CuSO_4 und EDTA enthielt (5.4.1, Tabelle 5.10). Dieser Zusatz beeinflusste die Transformationsaktivität nicht (2.3.7). Um einen möglichen Einfluss von EDTA auf die Aktivität zu überprüfen, wurde der Transformation von (+)-Valencen durch Lyophilisat von *P. sapidus* EDTA (1 mM) zugesetzt. Die Aktivität wurde nicht vermindert, sondern durch den Zusatz um 86% gesteigert (2.3.11). Es handelte sich daher entweder um einen anderen Cofaktor oder um ein Metallion einer anderen Oxidationsstufe.

Zur Elution der Proteine bei der Ionenaustauschchromatographie wurde ein Salzgradient verwendet. Anfangs wurde in keiner Fraktion Aktivität nachgewiesen. Die gesuchte Enzymaktivität wurde ab einem 150 mM Natriumchloridzusatz nahezu vollständig gehemmt (2.3.2.3), aber erst ab einer Konzentration von 200 mM von der Säule eluiert (2.4.3.2). Durch Umpufferung auf einen natriumchloridfreien Puffer mit Zentrifugationseinheiten wurde ein Großteil der ursprünglichen Aktivität wieder hergestellt. Die Inhibierung war somit reversibel. Der Verlust von 17% Aktivität wurde auf die Abtrennung des löslichen Cofaktors (Komponente 3) zurückgeführt. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde auf das Spülen der Biofeuchtmasse bei der Ernte mit einer isotonischen Kochsalzlösung zugunsten destillierten Wassers verzichtet.

3.4.2.3 Enzymreinigung

Zur abschließenden Enzymreinigung wurde neben der Proteinpräzipitation (2.4.1) die chromatographische Reinigung an drei verschiedenen Trennmaterialien, Anionen- (2.4.3), Kationenaustauscher (2.4.4) und Gelfiltration (2.4.5), eingesetzt. Durch jedes dieser Verfahren wurden erhebliche Mengen an Fremdprotein abgetrennt. Eine genaue Bilanzierung war hingegen nicht möglich, da kein spezifischer Enzymtest zur Verfügung stand (siehe oben), und der lineare Arbeitsbereich deshalb nicht bestimmt werden konnte. Möglich war lediglich, nach Inkubation von (+)-Valencen mittels Gaschromatographie zu überprüfen, ob die gereinigten Fraktionen Aktivität aufwiesen. Die Untersuchung der gereinigten Proben mit Hilfe der SDS-PAGE zeigte, dass in den aktiven Fraktionen noch eine Vielzahl an Proteinen nachweisbar war. Daher wurden die einzelnen Reinigungsschritte kombiniert. Die besten Ergebnisse wurden durch eine dreistufige Reinigung mittels FPLC erzielt (2.4.7). Eine zusätzliche Proteinpräzipitation verbesserte die Reinigung nicht weiter.¹⁴ Auf den Einbau dieser Methode in die mehrstufige Reinigungsstrategie wurde daher verzichtet.¹⁵ Selbst durch die dreistufige Reinigung wurde jedoch keine elektrophoretische Homogenität des Zielenzym in den aktiven Fraktionen erreicht (2.4.8, 2.4.10).

Um Rückschlüsse auf das an der Transformation von (+)-Valencen beteiligte Enzym ziehen zu können, musste das Bandenmuster aktiver mit dem Bandenmuster inaktiver Fraktionen verglichen werden. Als Zielenzym kamen schließlich drei Proteine mit Molekulargewichten von 60, 63 und 66 kDa in Betracht (2.4.8). Durch *de novo* Sequenzierung dieser Banden mit Hilfe der „Electrospray-tandem-Massenspektrometrie“ wurden Peptidsequenzen erhalten, die Homologien zu Lipoxygenasen aus *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* und *Gibberella moniliformis* aufwiesen (2.5).

3.4.2.4 Enzymsysteme

Valencen wurde bisher unter Beteiligung von Cytochrom P450-Monooxygenasen, Laccasen, Peroxidasen und Lipoxygenasen zu Nootkaton oxidiert.

Cytochrom P450-Monooxygenasen

Bei Cytochrom P450-Enzymen (EC 1.14.14.1 und andere) handelt es sich um Monooxygenasen, die in Bakterien, Hefen, filamentösen Pilzen, Insekten, Säugetieren und Pflanzen vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Prostaglandinen, Steroiden und zahlreichen pflanzlichen Sekundärmetaboliten. Zusätzlich katalysieren sie häufig die Detoxifikation von schwer wasserlöslichen Verbindungen.

¹⁴ Auf die Darstellung der entsprechenden Gele wurde verzichtet.

¹⁵ Es wäre denkbar, den Umpufferungsschritt nach der ersten Reinigungsstufe durch eine Proteinpräzipitation zu ersetzen (vergleiche 5.8.1).

Zur Zeit sind über 6.000 Cytochrom P450-Monooxygenasen aus 711 verschiedenen Enzym-Familien bekannt. Darunter sind 1.016 P450-Monooxygenasen aus 287 Pilzenzym-Familien verzeichnet.¹⁶ Sie sind in der Lage, atomaren Sauerstoff in allylischer Position, an Doppelbindungen oder an nicht aktivierten Kohlenstoffatomen einzuführen. Neben Hydroxylierungen [1] wurden auch Epoxidierungen, Sulfoxidationen oder Desalkylierungen bekannt (Urlacher *et al.* 2004).



P450-Monooxygenasen enthalten eine Hämgruppe. Der wichtigste Schritt bei der Oxidation des Substrats (R) stellt die Addition eines durch das reduzierte Häm-Eisen aktivierten Sauerstoffatoms an das Substratmolekül (RH) dar. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Die benötigten Elektronen werden im Allgemeinen von NAD(P)H über ein separates Elektronendonorsystem geliefert. Abhängig von diesem Donorsystem werden Cytochrom P450-Monooxygenasen in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Die meisten mitochondrialen und prokaryotischen P450-Enzyme gehören zur Klasse I und benötigen ein Zwei-Proteinsystem (eine FAD-haltige Reduktase und ein Eisen-Schwefel-Redoxin). P450-Enzyme, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, gehören zur Klasse II und benötigen nur ein einzelnes Protein als Redoxpartner (FAD/FMN-enthaltende Cytochrom P450-Reduktase). Klasse-III-Enzyme benötigen hingegen kein Elektronendonorsystem. Sie katalysieren die Umsetzung peroxidierter Substrate, die bereits Sauerstoff enthalten (Urlacher *et al.* 2004). P450-Enzyme der Klasse IV beziehen die benötigten Elektronen direkt vom NAD(P)H. Die Mehrzahl der bisher entdeckten P450-Monooxygenasen aus Pilzen stammten aus dem endoplasmatischen Retikulum und gehörten zur Klasse II (van den Brink *et al.* 1998). Der Einsatz von P450-Monooxygenasen zur Biotransformation von Terpenen ist durch ihre geringe Aktivität und limitierte Stabilität eingeschränkt. Zusätzlich benötigen P450-katalysierte Reaktionen in der Regel eine ständige Zufuhr des Cofaktors NAD(P)H, um das Hämeisen zu reduzieren. Dies macht kontinuierliche zellfreie Prozesse sehr kostenintensiv. Abhilfe durch den Einsatz von Elektronen-Mediatoren, eine Elektronenzufuhr durch Elektroden oder enzymatische Ansätze ist jedoch denkbar.

Da P450-Monooxygenasen Hydroxylierungen in allylischer Position katalysieren, scheinen diese Enzyme besonders zur Oxyfunktionalisierung von Valencen geeignet zu sein. Die Beteiligung dieser Enzyme an der Transformation von Valencen zu Nootkaton wurde daher vielfach postuliert (Kramer und Maute 1973; de Kraker *et al.* 2003; Kaspera *et al.* 2005). Mehrfach wurde beobachtet, dass die Synthese von Nootkaton über Nootkatol verlief (Drawert *et al.* 1984; del Río *et al.* 1992; Furusawa *et al.* 2005; Sakamaki *et al.* 2005). In weiteren Publikationen wurde ebenfalls die Synthese von Nootkatol als Nebenprodukt

¹⁶ <http://drnelson.utmem.edu/P450.stats.2006.htm>; zuletzt aktualisiert 11.04.2007; Abruf der Seite 18.04.2007

beschrieben (Muller *et al.* 1998; Huang *et al.* 1999). Bisher gelang jedoch der Nachweis einer direkten Transformation von (+)-Valencen mit isolierten Enzymen nur mit rekombinanten, durch Punktmutationen veränderten P450_{cam}-Monoxygenasen aus *Pseudomonas putida* (Abbildung 3.6) (Sowden *et al.* 2005).

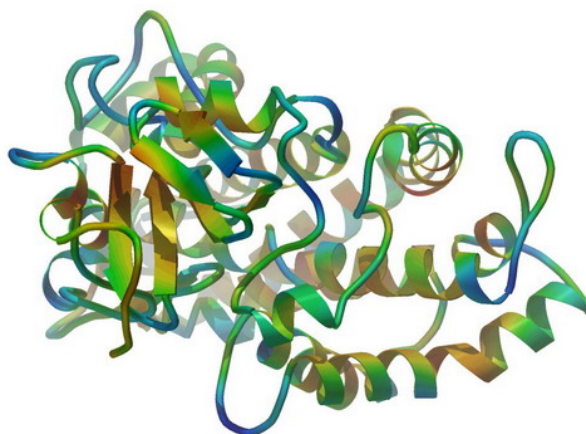


Abbildung 3.6: Cytochrom P450_{cam}-Monoxygenase aus *Pseudomonas putida* (nach Schlichting *et al.* 2000)

β -Nootkatol (38%) und (+)-Nootkaton (47%) bildeten die Hauptprodukte der Transformation (Abbildung 3.7). Nicht geklärt wurde, ob und wie die Nootkatonsynthese über β -Nootkatol als Intermediat verlief.

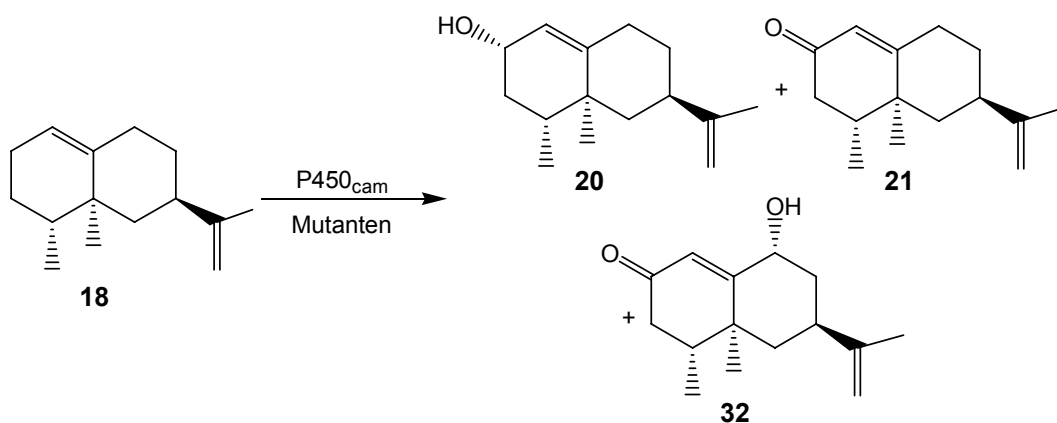


Abbildung 3.7: Produkte der Transformation von (+)-Valencen (**18**) mit P450_{cam}-Mutanten: β -Nootkatol (**20**), (+)-Nootkaton (**21**), (E)-Nootkaton-9-ol (**32**) (modifiziert nach Sowden *et al.* 2005)

Auch für die Biotransformation mit *Chaetomium globosum* (Kaspera *et al.* 2005) wurde die Beteiligung einer P450-Monooxygenase postuliert. Ebenso wurde für die Umsetzung von (+)-Valencen mit mikrosomalen Fraktionen aus Zichorienwurzeln (*Cichorium intybus* L.) in Gegenwart von NADPH (de Kraker *et al.* 2003) eine Katalyse durch Germacren-A-Hydroxylase angenommen. Da in den mikrosomalen Präparationen jedoch auch weitere Enzyme lokalisiert waren, wäre die Katalyse durch andere Enzyme zumindest denkbar. Die Oxidation von (+)-Valencen (**18**) führte zu β -Nootkatol (**20**) als Zwischenprodukt. Unter

Beteiligung einer NAD(P)^+ -abhängigen Dehydrogenase wurde in einem weiteren Schritt β -Nootkatol zu (+)-Nootkaton (**21**) oxidiert. α -Nootkatol (**19**) wurde hingegen nicht nachgewiesen und stellte kein geeignetes Substrat für die im Extrakt vorhandene(n) Dehydrogenase(n) dar (Abbildung 3.8).

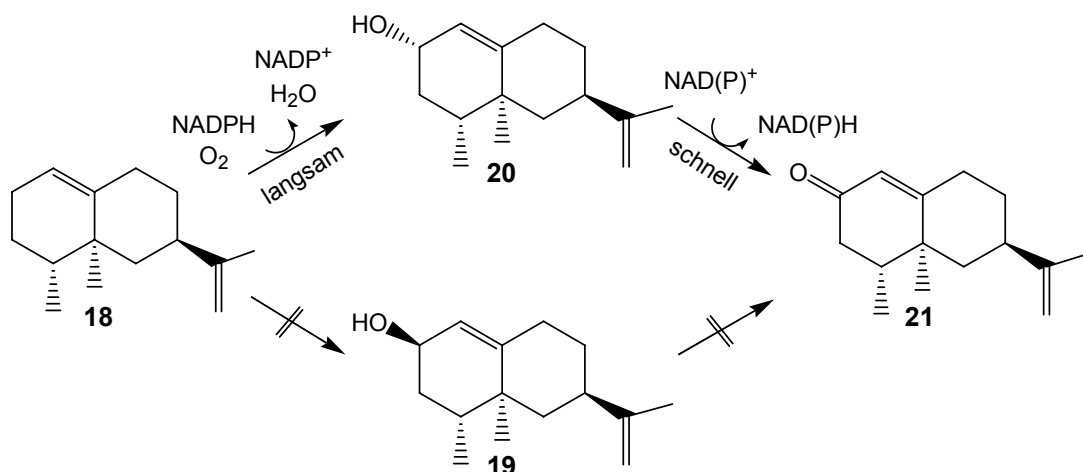


Abbildung 3.8: Bildung von (+)-Nootkaton (**21**) durch Transformation von (+)-Valencen (**18**) über β -Nootkatol (**20**) mit Extrakten aus Zichorienwurzeln (modifiziert nach de Kraker et al. 2003)

Bei der Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* wurde neben (+)-Nootkaton die Bildung von α - und β -Nootkatol beobachtet, wobei jedoch stets ein deutlicher Überschuss an α -Nootkatol quantifiziert wurde (Faktor 2,5 bis 7,4; σ 4; Anhang Tabelle 7.2). Bei der Nootkatonsynthese durch Pflanzenzellkulturen wurde ebenfalls ein circa zweifacher Überschuss an α -Nootkatol festgestellt (Sakamaki et al. 2005). Es scheinen somit unterschiedliche Selektivitäten zu existieren. Rückschlüsse auf den vorliegenden Mechanismus können daraus jedoch noch nicht gezogen werden.

Um das vorliegende System näher zu charakterisieren, wurden den Transformationsansätzen Inhibitoren für Hämenzyme zugesetzt (2.3.4). Der bekannte P450-Inhibitor Proadifen (SKF-525A) (Rossi et al. 1987; van den Brink et al. 1998) hemmte die postulierte P450-Monooxygenasen-katalysierte Transformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* im Vergleich zu einer Kontrolle um 45%. Hingegen beeinträchtigte Proadifen (0,1 mM und 1 mM) die Umsetzung mit Lyophilisaten von *P. sapidus* nicht. Auch Kaliumcyanid (DeLumen und Kazeniac 1976) hemmte die Transformationsaktivität nur gering (1 mM: 70% Aktivität). Die inhibierende Wirkung von Cyanidionen ist darüber hinaus nicht spezifisch für P450-Monooxygenasen. So wurde zum Beispiel eine konzentrationsabhängige Inhibierung einer aus *P. ostreatus* isolierten Lipxygenase (1 mM: 94%, 10 mM: 0% Aktivität) (Kuribayashi et al. 2002) und von Lipxygenasen aus Erdnüssen (Sanders et al. 1975) und Sojabohnen (Johns 1973) beschrieben. Piperonylbutoxid (Masaphy et al. 1996) erniedrigte die Transformationsaktivität ebenfalls nur partiell (1 mM: 79% Aktivität). Lediglich Natriumazid (Kuribayashi et al. 2002) inhibierte die Umsetzung nahezu vollständig (1 mM: 3% Aktivität).

Die Beteiligung einer Cytochrom P450-Monooxygenase wurde ferner durch die Verwendung einer für Hämgruppen empfindlichen Färbemethode (Hämfärbung) nach SDS-PAGE überprüft (Thomas *et al.* 1976; Henne *et al.* 2001). Nach nicht-denaturierender SDS-PAGE wurden die Gele in einer methanolischen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung (TMBZ) inkubiert und durch anschließende Zugabe von Wasserstoffperoxid Hämgruppen als blaugüne Banden visualisiert. Diese Färbemethode war jedoch nicht spezifisch für hämhaltige Enzyme. Zum Beispiel handelt es sich bei der Cytochrom Oxidase / Nitrit Reduktase aus *Nitrosomonas europaea* um ein kupferhaltiges Enzym, welches keine Hämgruppe besitzt (Miller und Wood 1983). Eine Färbung war trotzdem möglich: Bereits vor der Wasserstoffperoxidzugabe wurden intensiv grün gefärbte Banden beobachtet (Miller und Nicholas 1984). Auch war es möglich, eine nichthämeisenhaltige Lipoxygenase aus Sojabohnen zu visualisieren (2.4.9). Sowohl im separierten Überstand aus Lyophilisaten von *P. sapidus* als auch in der über drei chromatographische Stufen gereinigten Enzymprobe wurden nach nicht-denaturierender SDS-PAGE und anschließender Hämfärbung ebenfalls Banden sichtbar. In Analogie zu Miller und Nicholas entstanden jedoch blaugüne Banden bereits vor der H₂O₂-Zugabe. Das untersuchte Vergleichsenzym (Meerrettich-Peroxidase) wies diese Besonderheit nicht auf und wurde, wie für hämhaltige Enzyme beschrieben, erst nach Zugabe von Wasserstoffperoxid sichtbar. Bei der durchgeführten Methode handelte es sich demnach um eine Färbung für Häm- und Metallenzyme. Es wurde postuliert, dass eine Unterscheidung aufgrund des Verhaltens gegenüber Wasserstoffperoxid möglich wäre (Goodhew *et al.* 1986). Ein endgültiger Beweis steht jedoch aus.

Desweiteren wurde auch keine für Cytochrom P450-Monooxygenasen typische UV/VIS-Absorption in der aktiven, gereinigten Fraktion beobachtet (2.4.7).¹⁷ So zeigen Hämenzyme bei circa 400 nm ein deutliches Absorptionsmaximum (Soret-Bande) und weitere Maxima im Bereich zwischen 500 nm und 560 nm (Lottspeich und Engels 2006). Nootkaton ist darüber hinaus als Inhibitor für P450-Monooxygenasen bekannt (Sime *et al.* 1998; Tassaneeyakul *et al.* 2000). Auch wurden die bisher einzigen beschriebenen Transformationen von (+)-Valencen mit P450-Monooxygenasen nicht mit Wildtyp-Enzymen, sondern mit rekombinanten Mutanten erzielt (vergleiche Abbildung 3.7). Eine Beteiligung von nativen P450-Enzymen an der Nootkatonbiogenese wurde somit zwar allgemein postuliert, jedoch bislang nicht bewiesen. Für eine optimale Transformationsleistung benötigen mikrosomale P450-Monooxygenasen die Gegenwart einer Biomembran. Grenzflächenaktive Substanzen (zum Beispiel Cholsäure) sind zum Teil in der Lage, diese zu substituieren (Nakano *et al.* 1995). Bei der Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisat von *P. sapidus* wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet (2.3.6): Die Enzymlösung (separierter Überstand) zeigte nur geringe Aktivitäten. Rekombiniert mit den unlöslichen Zellbestandteilen (desaktivierter Rückstand) wurde die ursprüngliche Aktivität (Transformation mit Lyophilisat) jedoch wieder

¹⁷ Das Fehlen dieser Absorptionsmaxima könnte jedoch auch auf eine zu niedrige Proteinkonzentration zurückgeführt werden.

hergestellt. Ebenso wurde die Aktivität durch den Zusatz von Detergenzien (ASB-C8Ø oder Natriumcholat) zum separierten Überstand deutlich gesteigert (vergleiche 3.4.2.2). Zusammengefasst erscheint die Beteiligung von Cytochrom P450-Monooxygenasen an der Transformation von (+)-Valencen durch Lyophilisate eher unwahrscheinlich.

Laccasen

Neben der enzymatischen Darstellung von Nootkaton durch Cytochrom P450-Monooxygenasen wurde die Darstellung von Valencen-2-hydroperoxid durch Laccasen (*p*-Benzoldiol:Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) aus *Botrytis cinerea* und *Trametes versicolor* (Abbildung 3.9) beschrieben.

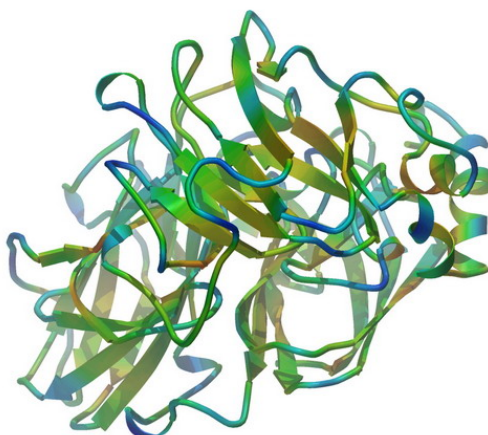


Abbildung 3.9: Laccase aus *Trametes versicolor* (nach Piontek et al. 2002)

Das gebildete Hydroperoxid wurde in einem weiteren Schritt zu Nootkaton oxidiert (Abbildung 3.10) (Huang et al. 1999).

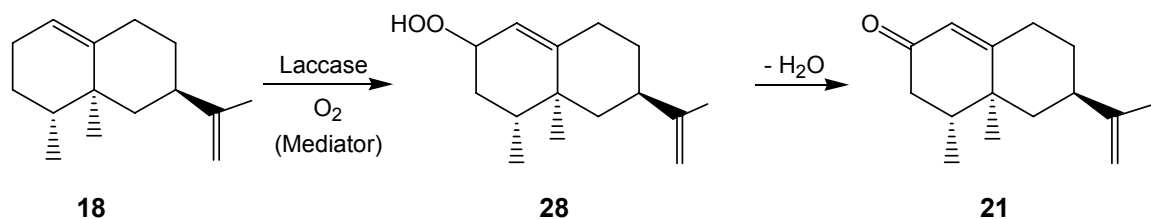


Abbildung 3.10: Mechanismus der Darstellung von Valencen-2-hydroperoxid (**28**) aus (+)-Valencen (**18**) durch Laccasen und anschließende Oxidation zu (+)-Nootkaton (**21**)

Bei Laccasen handelt es sich um kupferhaltige Enzyme, die in einer Vielzahl höherer Pflanzen und Pilze vorkommen. Laccasen sind in der Lage, zahlreiche aromatische Diole zu oxidieren und sind in der Regel an der Lignin-Biosynthese beteiligt. Dabei werden die Substrate in Phenoxyradikale überführt, die schließlich nach einem nicht-enzymatischen Mechanismus weiter reagieren. Parallel wird Sauerstoff zu Wasser reduziert (Abbildung 3.11).

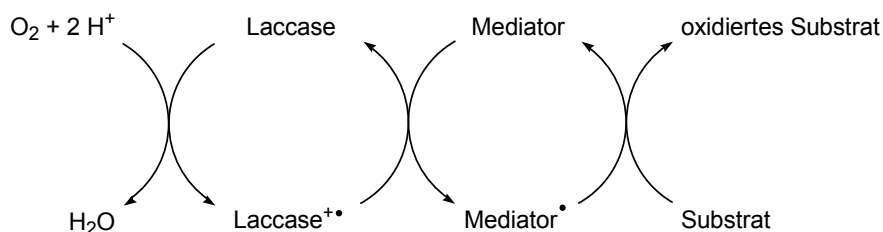


Abbildung 3.11: Mechanismus der durch Laccase katalysierten Oxidation von Substraten mit Hilfe eines Mediators

Bei der Katalyse durch Laccasen aus *B. cinerea* wurde die Ausbeute an Nootkaton in Gegenwart des Mediators 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 0,5 mM) um den Faktor 4 gesteigert (Huang *et al.* 1999). ABTS (2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure] Diammoniumsalz, 0,5 mM) steigerte die Aktivität nur unwesentlich. Hingegen führte der Zusatz von ABTS bei der enzymatischen Transformation von Valencen mit einem Laccasepräparat aus *Trametes* sp. sogar zu einer verminderten Nootkatonausbeute (Kaspera 2004). In der vorliegenden Arbeit erhöhte der Zusatz von Laccase-Mediatoren (HOBt, ABTS, DHBT, je 0,1 mM) zum separierten Überstand aus Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* (Enzymlösung) jeweils die Transformationsaktivität (2.3.6). HOBt wies dabei die größte Steigerung der Nootkatonsynthese auf (Faktor 4). Jedoch wurde nicht die gleiche Aktivitätssteigerung wie durch den Zusatz von desaktiviertem Rückstand erzielt (Faktor 6). Eine Beteiligung von Laccasen an der Oxidation von (+)-Valencen durch Lyophilisate von *P. sapidus* könnte somit vermutet werden. So wurden in Kulturüberständen von *P. sapidus* auch bereits fünf extrazelluläre Laccasen identifiziert (Linke *et al.* 2007), es gelang aber nicht, mit Submerskulturen die Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton zu katalysieren ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$ nach 4 Tagen, Kaspera 2004). Auch die Transformation mit konzentrierten Überständen von Laccase induzierten PSA-Kulturen führte trotz hoher Aktivität lediglich zu maximal 31 mg L^{-1} (+)-Nootkaton (2.3.11). Ein metallkatalysierter Beitrag aufgrund der Induktion mit Kupfer wäre hier ebenfalls denkbar. Im separierten PSA-Lyophilisatüberstand wurde nach isoelektrischer Fokussierung ebenfalls eine Laccase gefunden (2.4.10), diese war hingegen nach der Enzymreinigung nicht mehr nachweisbar. Außerdem war bei der publizierten Synthese von Nootkaton mit Hilfe von Laccasen im Gegensatz zur Transformation mit Lyophilisaten explizit ein zweiter Reaktionsschritt nötig, um das gebildete Hydroperoxid zu Nootkaton zu oxidieren (Huang *et al.* 1999) (vergleiche 3.4.2). Deshalb und aufgrund der niedrigen Transformationsausbeuten trotz hoher Laccaseaktivitäten sowie des Umstandes, dass keine Laccaseaktivität in den gereinigten Enzymproben nachgewiesen wurde, ist eine Beteiligung dieses Enzymtyps an der Oxidation unwahrscheinlich.

Peroxidasen

Neben der Transformation von Valencen durch P450-Monooxygenasen und Laccasen wurde die Oxidation von Valencen durch Singulett-Sauerstoff, der in einem vorhergehenden Schritt durch Peroxidasen generiert wurde, publiziert (Willershausen und Graf 1991b). Peroxidasen (EC 1.11.1) gehören ebenfalls zur Klasse der Oxidoreduktasen und sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. Sie oxidieren ihre Substrate in der Regel mit Hilfe von Wasserstoffperoxid. Die Autoren setzten zum einen konzentrierte Kulturbrühen des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* ein (Ligninperoxidase-Präparate), zum anderen kommerziell erhältliche Lactoperoxidase. Eine tatsächliche Beteiligung der extrazellulären Ligninperoxidase (Abbildung 3.12) an der Nootkatonsynthese kann somit nur vermutet werden. Bei der Transformation wurde zusätzlich die Bildung von Valencenalkoholen als Nebenprodukte beobachtet.

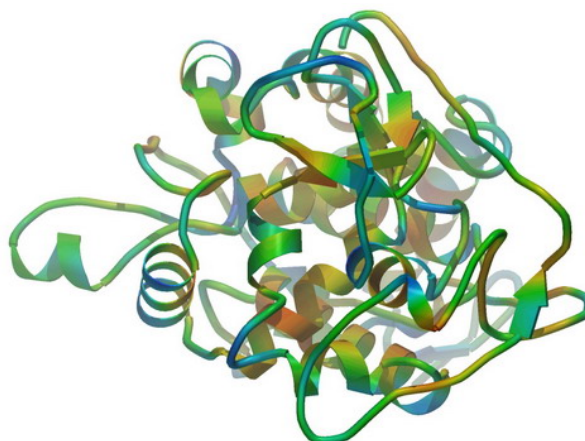


Abbildung 3.12: Ligninperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* (nach Doyle et al. 1998)

Von denselben Autoren wurde gezeigt, dass die Reaktion von Valencen mit Singulett-Sauerstoff durch den Radikalfänger DABCO zu 98% gehemmt wurde (Willershausen und Graf 1991a) (vergleiche 3.4.1). Die Umsetzung von (+)-Valencen durch *Chaetomium globosum*, für die ein Mechanismus ohne Beteiligung von Peroxidasen postuliert wurde, wurde hingegen nicht inhibiert (Kaspera 2004). Die Transformation mit PSA-Lyophilisat wurde ebenfalls nicht beeinflusst (2.3.4). Auch wurde keine bedeutende Aktivitätssteigerung durch H_2O_2 -Zusatz beobachtet (2.3.11). Zusätzlich wurde beschrieben, dass Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff in Deuteriumoxid eine bis zu zehnfach höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen (Kirk et al. 1983). In der vorliegenden Arbeit lieferte die Transformation in Deuteriumoxid hingegen deutlich reduzierte Ausbeuten (2.3.10). Eine Beteiligung von Peroxidasen an der Nootkatonsynthese durch Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* ist daher nicht wahrscheinlich.

Lipoxygenasen

Ein weiterer enzymatischer Weg zur Darstellung von Nootkaton verläuft über eine Cooxidation aufgrund der Bildung von Fettsäurehydroperoxiden durch Lipoxygenasen (Abbildung 3.13) (Muller *et al.* 1998).

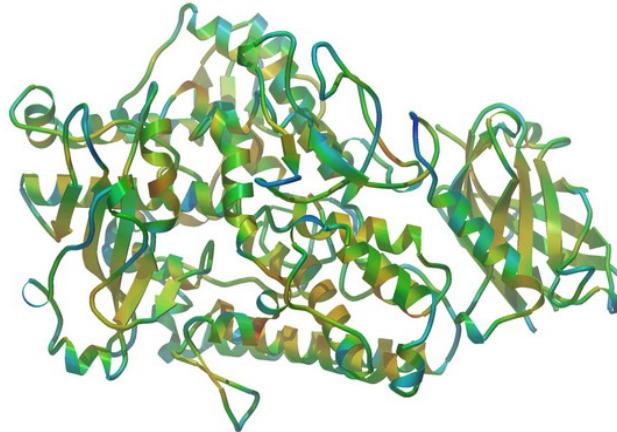


Abbildung 3.13: Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen (nach Tomchick *et al.* 2001)

Bei Lipoxygenasen (Linoleat:Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.13.11.12) handelt es sich um eisenhaltige Dioxygenasen, die jedoch keine Hämgruppen enthalten. Sie kommen in Pflanzen, Pilzen und Tieren vor und katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau molekularen Sauerstoffs in Fettsäuren, die mindestens eine (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur aufweisen (Abbildung 3.14).

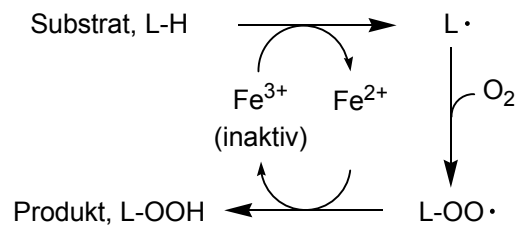


Abbildung 3.14: Substratoxidation durch Lipoxygenasen (modifiziert nach Brash 1999)

Während der Bildung des Hydroperoxids wird die isolierte Doppelbindung des Substrats in ein konjugiertes (Z,E)-Doppelbindungssystem umgelagert (Abbildung 3.15).

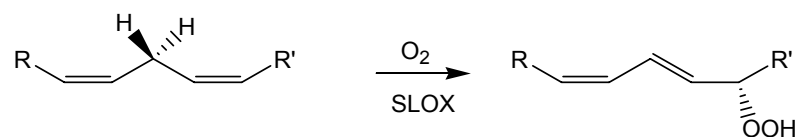


Abbildung 3.15: Umlagerung des Doppelbindungssystems (modifiziert nach Brash 1999);
SLOX = Lipoxygenase aus Sojabohnen

Für Lipoxygenasen aus filamentösen Pilzen sind zur Zeit lediglich 12 Sequenzen aus 6 verschiedenen Ascomyceten bekannt. Obwohl die Aufreinigung einer Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* beschrieben wurde (Kuribayashi *et al.* 2002), wurde bisher noch keine Sequenz aus einem Basidiomyceten veröffentlicht. Lipoxygenasen sind unter anderem in der Lage, die Transformation von Linolsäure zu 10-Hydroperoxyoctadecadiensäure (10-HPOD) zu katalysieren, welche enzymatisch zu Oct-1-en-3-ol gespalten werden kann (Wurzenberger und Grosch 1982; Wurzenberger und Grosch 1984). Bei Oct-1-en-3-ol handelt es sich um ein typisches Pilzaroma mit erdig-pilzigem Geruch. Es ist der Schlüsselaromastoff im Champignon- und Camembertaroma. Die Lipoxygenase, die für den primären Reaktionsschritt zuständig ist, wurde jedoch bisher in der Natur nicht gefunden (Pérez-Gilbert *et al.* 2005a). Alternativ wird die Bildung von Oct-1-en-3-ol über 13-Hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure (13-Z,E-HPOD) postuliert (Tressl *et al.* 1981). Der Mechanismus der Biogenese wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird, dass Lipoxygenasen zusätzlich eine Rolle bei der oxidativen Ausbildung der Ranzigkeit bestimmter Lebensmittel spielen (Gordon 2003), aber auch zur Aromabildung in einigen Früchten beitragen (O'Connor und O'Brien 1991).

Die Cooxidation lieferte nur unter drastischen Bedingungen (70 °C) hohe Ausbeuten an Nootkaton. Eine Umsetzung ohne Zusatz einer Fettsäure war dabei nicht möglich (Muller *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Transformation von (+)-Valencen durch die alleinige Inkubation von (+)-Valencen mit Lipoxygenase aus Sojabohnen in TRIS-Puffer beobachtet. Der Zusatz von Linolsäure steigerte die Nootkatonsynthese um den Faktor 3,5 ($\Sigma \alpha$, β -Nootkatol, (+)-Nootkaton: Faktor 3,3), jedoch wurden insgesamt nur niedrige Produktausbeuten erzielt ($\Sigma 47 \text{ mg L}^{-1}$, 2.2.3). Der Mechanismus dieser Reaktion blieb unklar, zumal eine (Neben-)Reaktion von Lipoxygenasen mit Substraten ohne (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur bisher nicht beschrieben wurde. Die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von Linolsäure führte hingegen zu einer Abnahme der Produktbildung (74% Aktivität, 2.3.11). Hohe Produktausbeuten wurden jedoch mit separiertem Überstand in Gegenwart von Detergenzien erzielt (2.3.6). Zusammenfassend ist eine Darstellung von (+)-Nootkaton durch Cooxidation mit Hilfe von Lyophilisaten von *P. sapidus* wenig wahrscheinlich.

Nach chromatographischer Reinigung des separierten Lyophilisatüberstands über 3 Stufen (2.4.7) wiesen zwei der drei sequenzierten Proteinbanden (63 und 66 kDa) Homologien zu Lipoxygenasen auf (2.5). Möglicherweise handelte es sich um Isoenzyme beziehungsweise um Subeinheiten eines Enzymkomplexes. Das Auftreten von Isoenzymen bei Lipoxygenase ist vor allem in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Bislang wurden zum Beispiel mindestens acht verschiedene Isoenzyme aus Sojabohnen (*Glycine max* L.) (Brash 1999) und drei aus Erdnüssen (*Arachis hypogaea* L.) (Sanders *et al.* 1975) identifiziert. Neben den bereits diskutierten Homologien zu bekannten Peptidsequenzen zeigten die Molekulargewichte der isolierten Enzyme und das pH-Optimum des untersuchten Transformationssystems gute Übereinstimmungen mit einer Lipoxygenase der ariden Trüffelgattung *Terfezia claveryi*

(Pérez-Gilabert *et al.* 2005a) und zu einer Lipoxygenase des eng verwandten Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* (Kuribayashi *et al.* 2002). Das Molekulargewicht dieser beiden Lipoxygenasen betrug ebenfalls 66 kDa. Die Lipoxygenase aus *T. claveryi* besaß ein Optimum bei pH 7,0, das Optimum der Lipoxygenase aus *P. ostreatus* lag bei pH 8,0. Die Transformation von Lyophilisaten von *P. sapidus* zeigte hohe Transformationsausbeuten bei pH 7,5 (2.3.2.1). Jedoch weisen Lipoxygenasen aus Pilzen – im Gegensatz zum Pflanzen- (~ 94 - 104 kDa) und Tierreich (~ 75 - 80 kDa) (Brash 1999) – im Allgemeinen einen relativ breiten Molekulargewichtsbereich auf. So reichen die Angaben von 12 kDa für *Fusarium oxysporum* (Matsuda *et al.* 1976) bis 100 kDa für *Thermomyces lanuginosus* (Li *et al.* 2001).

Nordihydroguajarsäure (NDGA), einer der effektivsten Hemmer von Lipoxygenasen (Kemal *et al.* 1987), inhibierte die untersuchte Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton mit Lyophilisaten von *P. sapidus* vollständig (2.3.4). Die Aktivität der Lipoxygenase aus *T. claveryi* wurde durch NDGA ebenfalls zu 96% gehemmt (Pérez-Gilabert *et al.* 2005b). Jedoch stellt NDGA keinen selektiven Inhibitor dar, die Inhibierung von Cytochrom P450-Monooxygenasen und Peroxidasen wurde ebenfalls beschrieben (Masaphy *et al.* 1996). Auch wurde die Transformation von (+)-Valencen mit Eisen(II)-sulfat ebenfalls vollständig gehemmt (2.2.1). Natriumazid beeinträchtigte bis zu einem 10 mM Zusatz die Lipoxygenase aus *P. ostreatus* nur geringfügig (90% Aktivität) (Kuribayashi *et al.* 2002), die Aktivität des PSA-Lyophilisats wurde hingegen bereits ab 1 mM vollständig inhibiert. Der Eisen(III)-Chelatbildner Natriumthiocyanat wurde als Aktivator für Lipoxygenase beschrieben, beeinflusste die Aktivität einer Lipoxygenase aus *P. ostreatus* jedoch nicht (Kuribayashi *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu wurde die Umsetzung von (+)-Valencen mit PSA-Lyophilisaten nahezu vollständig gehemmt (10 mM: 10% Aktivität). Auf der anderen Seite zeigte das ebenfalls als Inhibitor für Lipoxygenasen beschriebene Aesculetin (1 mM: 109% Aktivität) sowie 1,10-Phenanthrolin (1 mM: 116%, 10 mM: 120% Aktivität) keine Hemmung der Enzymaktivität (2.3.4). Erst ein 33 mM Zusatz von Phenanthrolin führte zur Verminderung der Produktausbeuten (23% Aktivität). Die Gegenwart von Calciumchlorid führte zu einer Verminderung der Aktivität, obwohl eine Steigerung vielfach beschrieben wurde (Joseph *et al.* 1993). Ein Zusatz von Calciumacetat zeigte im Gegensatz keine inhibierende Wirkung (2.3.4). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibitorversuche nicht konsistent waren. Die Wirkung der Inhibitoren ist offensichtlich konzentrationsabhängig und variiert von Enzym zu Enzym stark. Ein sicherer Rückschluss auf einen bestimmten Enzymtyp war somit nicht möglich.

Auch wenn die erhaltenen Peptidsequenzen und weiteren experimentellen Ergebnisse Homologien zu Lipoxygenase aufweisen, kann es sich per Definition nicht um eine direkt katalysierte Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton handeln. Zum einen weist das Substrat (+)-Valencen keine (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur auf, zum anderen wird keine Umlagerung einer Doppelbindung in Bezug auf das Endprodukt beobachtet. Neben der Bildung eines Pentadienylradikals, welches aufgrund des isolierten Doppelbindungssystems zu einer Ausbildung eines delokalisierten π -Elektronensystems führt (Abbildung 3.16), wurde jedoch ein weiterer Mechanismus für Lipoxygenasen postuliert.

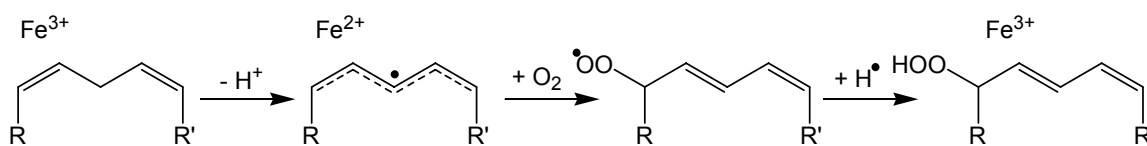


Abbildung 3.16: Mesomeriestabilisierter Mechanismus der durch Lipoxygenase katalysierten Bildung von Hydroperoxiden (modifiziert nach Prigge et al. 1997)

Bei diesem katalysiert das Fe^{3+} der Lipoxygenase die Deprotonierung des Substrats, indem es eine direkte Bindung mit dem resultierenden Carbanion eingeht. Im Folgenden wird molekularer Sauerstoff eingeführt und das Hydroperoxid gebildet (Abbildung 3.17). Eine entsprechende (Z,Z)-Penta-1,4-dien-Struktur wird für diesen Schritt prinzipiell nicht benötigt.

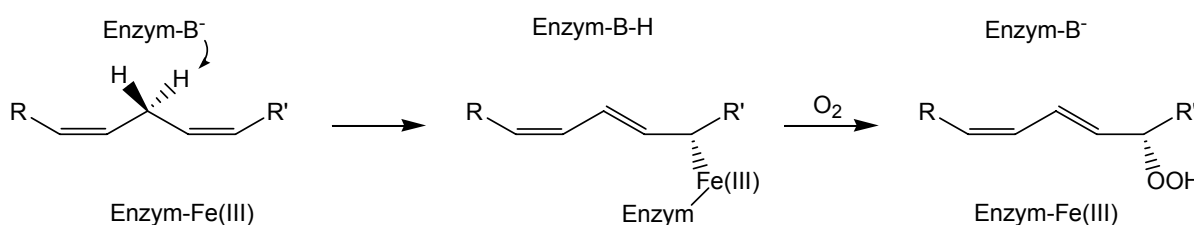


Abbildung 3.17: Alternativer Organo-Eisen-Mechanismus (modifiziert nach Corey und Nagata 1987)

In Analogie würde dies bei der Transformation von (+)-Valencen (**18**) zu 2-Isopropenyl-8,8a-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalin-4a-yl-hydroperoxid (**33**) führen. Jedoch erfolgte der Angriff dann an einem tertiären und nicht an einem sekundären Kohlenstoffatom. Durch eine Umlagerung und anschließende Oxidation wäre die Bildung von (+)-Nootkaton (**21**) denkbar (Abbildung 3.18).

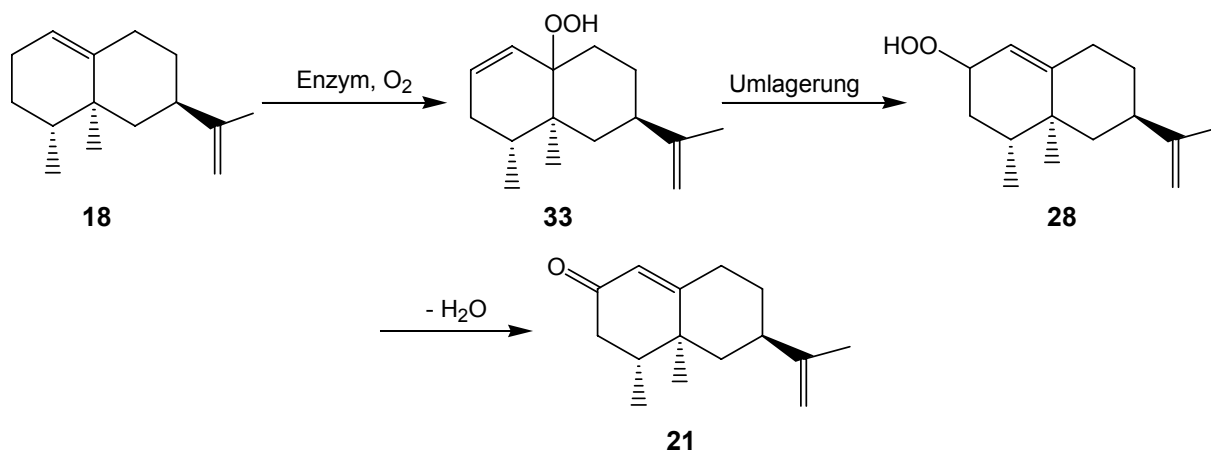


Abbildung 3.18: Hypothetische enzymatische Bildung von 2-Isopropenyl-8,8a-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalin-4a-yl-hydroperoxid (**33**) aus (+)-Valencen (**18**), Schenck-Umlagerung zum Valencen-2-hydroperoxid (**28**) und anschließende Oxidation zu (+)-Nootkaton (**21**)

Die Allylumlagerung von Hydroperoxiden wurde zuerst am Beispiel des Cholesterols in Chloroform beschrieben (Schenck *et al.* 1958). Kupfer(II)-salze beschleunigten diese Umlagerung und führten direkt zum entsprechenden Keton. Die bei Raumtemperatur nahezu quantitativ verlaufende Schenck-Umlagerung von **33** zu **28** wurde in unpolaren Lösungsmitteln gezeigt (Davies und Davison 1989). Inwieweit diese Umlagerung auch in wässrigen Systemen ablaufen kann, ist nicht bekannt. Eine analoge Umlagerung wurde für den entsprechenden Alkohol gezeigt (Shaffer *et al.* 1975). Die Photooxygenierung von (+)-Valencen durch Singulett-Sauerstoff und anschließende Reduktion des Hydroperoxids (**33**) führte mit 44-prozentiger Ausbeute zu 2-Isopropenyl-8,8a-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalin-4a-ol (**34**). Dieses wurde an Kieselgel zu Nootkatol (**27**; 87%) umgelagert und durch anschließende Oxidation quantitativ in (+)-Nootkaton (**21**) überführt (Abbildung 3.19).

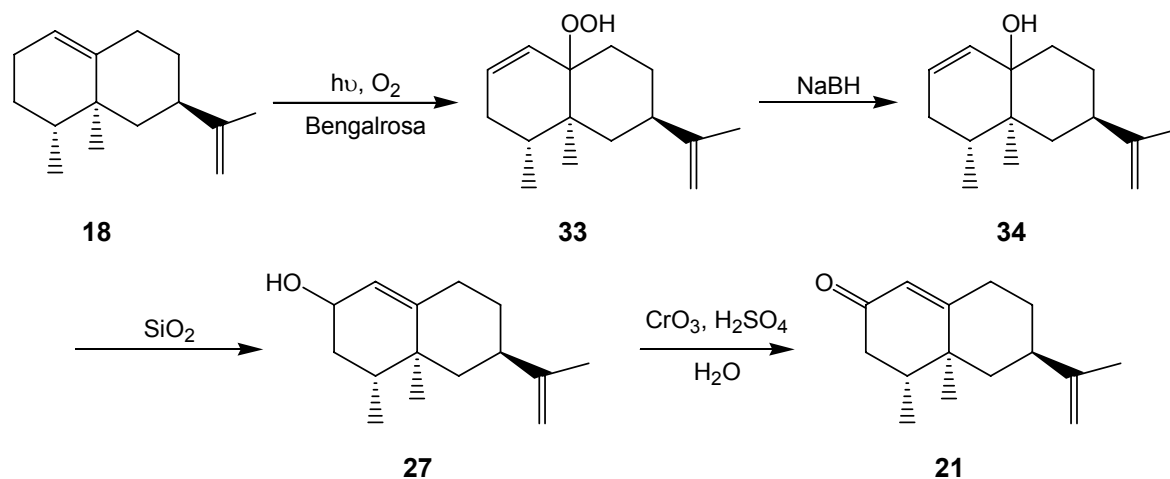


Abbildung 3.19: Darstellung von (+)-Nootkaton (**21**) durch Photooxygenierung von (+)-Valencen (**18**) über 2-Isopropenyl-8,8a-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalin-4a-yl-hydroperoxid (**33**), 2-Isopropenyl-8,8a-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalin-4a-ol (**34**) und Nootkatol (**27**) (modifiziert nach Shaffer *et al.* 1975)

Da sowohl der beschriebene Mechanismus als auch die Cooxidation eher unwahrscheinlich sind, wäre schließlich noch die Katalyse durch Dioxygenasen denkbar.

Dioxygenasen

Bei Dioxygenasen (Sauerstoff-Oxidoreduktasen EC 1.13.11, EC 1.14.11, EC 1.14.12 und weitere) handelt es sich um Eisen (als Schwefel-Eisen-Komplex oder als Hämgruppe) oder Kupfer enthaltende Enzyme, die eine Untergruppe der Oxygenasen bilden. Dioxygenasen katalysieren im Gegensatz zu den Monooxygenasen den Einbau beider Atome des molekularen Sauerstoffs in das Substratmolekül (Nelson und Cox 2005). Dabei entstehen in der Regel vicinale Diole, aber auch die Bildung von Hydroperoxiden (vergleiche Lipooxygenasen) ist möglich. Diese Definition scheint jedoch ungenügend zu sein: Bestimmte Dioxygenasen sind zusätzlich in der Lage, die Monooxygenierung eines breiten Substratspektrums zu katalysieren (Resnick *et al.* 1996; Bowers *et al.* 1999; Boyd *et al.* 2003; Boyd *et al.* 2006). Bisher wurde über Monohydroxylierungen von Methyl- und Methylengruppen berichtet, die durch Aryl-, Vinyl-, Carbonylgruppen, Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome aktiviert waren. Interessant ist die beschriebene Monohydroxylierung von Indan (**35**) und Inden (**38**) zu den entsprechenden einwertigen Alkoholen (**36**, **40**) mit Hilfe einer Toluol-Dioxygenase (EC 1.14.12.11) aus *Pseudomonas putida* UV4 (Abbildung 3.20). Bei der Oxidation von Indan wurde unter anderem zusätzlich das Keton (**37**) gebildet. Bei Inden wurde neben primären Alkoholen auch das vicinale Diol (**39**) erhalten.

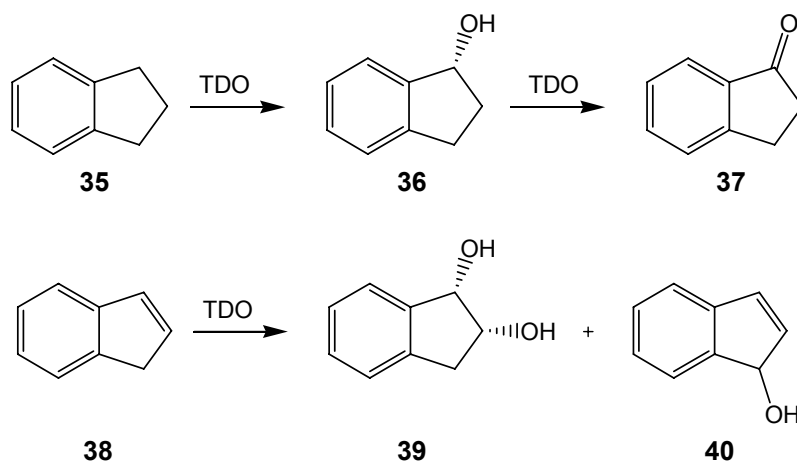


Abbildung 3.20: Oxygenierung von Indan (**35**) und Inden (**38**) durch Toluol-Dioxygenase (TDO) (modifiziert nach Bowers *et al.* 1999 und Boyd *et al.* 2003)

Analoge Reaktionen wurden ebenfalls für eine Naphthalin-Dioxygenase (EC 1.14.12.12, Abbildung 3.21) beschrieben (Resnick *et al.* 1996).

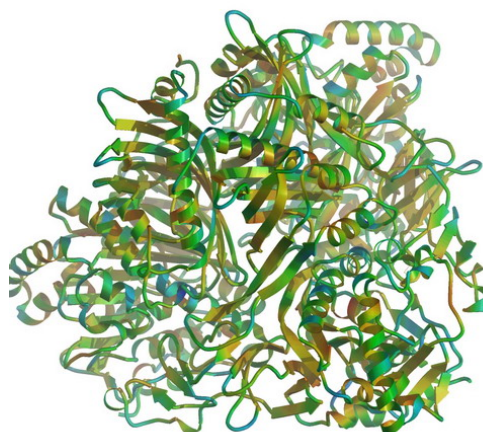


Abbildung 3.21: Naphthalin-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* (nach Kauppi et al. 1998)

Der Mechanismus dieser Monohydroxylierungen konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Die Beteiligung einer Dioxygenase an der Biotransformation von (+)-Valencen wird aufgrund der diskutierten Erkenntnisse für möglich gehalten, obwohl die Monohydroxylierung an allylischer Position ohne Aktivierung durch einen Elektronendonator bisher nicht beschrieben wurde. Ein endgültiger Beweis steht aus.

3.5 Optimierung der Nootkatonbiogenese

Mit *Pleurotus sapidus* stand ein oxidasestarker Basidiomycet zur Verfügung, aus dem durch Lyophilisierung ein potenter Biokatalysator zur Synthese von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen gewonnen werden konnte. Neben der Charakterisierung des Transformationssystems (2.3) wurde parallel die Nootkatonbiogenese optimiert.

Um das Verfahren wirtschaftlicher zu gestalten, wurde zuerst überprüft, ob zur Umsetzung niedrigere Valencenqualitäten eingesetzt werden können. Bei äquimolarer Dosierung mit 70-prozentiger Qualität wurden im Vergleich zu 90-prozentigem (+)-Valencen ähnliche Ausbeuten erzielt (Σ 92%, 2.6.1.1). Zur weiteren Prozessoptimierung wurde das Transformationssystem (vergleiche 5.6.2.1 und 5.6.3.1) modifiziert, um Änderungen der Enzymaktivität besser erfassen und optimieren zu können. So wurde die Menge des eingesetzten Biokatalysators auf 25 mg (1,5 mL Puffer)⁻¹ halbiert und die Transformationsdauer auf 4 Stunden reduziert, da die Kinetik sich zu diesem Zeitpunkt in einer linearen Phase befand (2.6.1.2). Anschließend wurde die Kulturführung optimiert (2.6.2). Maximale Lyophilisat ausbeuten und Aktivitäten wurden am vierten Kulturtag erzielt. Zu diesem Zeitpunkt waren noch circa 50% der zugesetzten Glucose im Medium nachweisbar.

3.5.1 Optimierung der Medienzusammensetzung

Bei der Optimierung der Nährlösung zur Anzucht des ausgewählten Organismus' müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen können durch eine geänderte Zusammensetzung die Enzymkonzentrationen, dadurch die Produktausbeuten und somit die Wirtschaftlichkeit erhöht werden. Zum anderen kann eine Modifikation des Mediums direkt zur einer Kosteneinsparung führen. Ideal wäre die Kombination beider Aspekte.

In der Literatur ist bisher nur wenig über die spezifischen Nährstoffansprüche von Basidiomyceten in Submerskultivierung bekannt. Für *Pleurotus sapidus* lagen keine Daten vor. Deshalb wurde zur Anzucht von *P. sapidus* ein Vollmedium (SNL-H, 5.4.1) verwendet, dessen Zusammensetzung 1959 publiziert wurde (Sprecher 1959). Lediglich der Zusatz von Thiamin (2 mg L^{-1}) wurde durch die Verwendung eines Hefeextrakts substituiert. Neben Asparagin ($4,5 \text{ g L}^{-1}$), stellte die verwendete Glucose (30 g L^{-1}) den größten Kostenfaktor dar. In einem ersten Schritt wurde daher der Glucosegehalt des Mediums reduziert. Der Glucosegehalt konnte bei gleichbleibender Nootkatonsynthese um 50% auf 15 g L^{-1} reduziert werden. Eine weitere Reduzierung führte hingegen zu einem stark verminderten Wachstum und zum Verlust der Aktivität (2.6.2.2).

Im Folgenden wurde Glucose durch Melasse, ein Nebenprodukt der Zuckerherstellung substituiert. Die Verwendung von Melasse zur Anzucht von Pilzen wurde bereits vielfach publiziert (Lindberg und Hansson 1991; Lee *et al.* 2000; Ali *et al.* 2002; Steluti *et al.* 2004) und im Gegensatz zu Glucose ist diese sehr preisgünstig zu erwerben. Die verwendete Melasse enthielt neben Glucose (circa 60 g L^{-1}) weitere Zucker wie zum Beispiel Fructose und Palatinose in hohen Konzentrationen (Tabelle 3.8). Die PalatinoseTM-Melasse wurde daher in Bezug auf die Glucosekonzentration deutlich geringer dosiert.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der verwendeten PalatinoseTM-Melasse (Südzucker)

Substanz	Konzentration / g L^{-1}
Fructose	82,0
Glucose	60,3
Saccharose	17,3
Palatinose	309,7
Trehalulose	205,8
Isomaltose	34,3
DP-3	5,9
Isomelezitose	12,6

Sowohl in Bezug auf das Wachstum als auch in Bezug auf die Enzymaktivität des Lyophilisats wurden die besten Ergebnisse mit einem Melassegehalt von 100 mL L^{-1} erzielt (NL-M, 5.4.1). Der vollständige Ersatz von Glucose durch Melasse war somit problemlos möglich (2.6.2.3).

Neben der Optimierung der Kohlenstoffquelle bestand ein weiteres Ziel in der Optimierung der Stickstoffquelle. In Analogie zur Kohlenstoffquelle wird zwischen autotrophen und heterotrophen Organismen unterschieden. Autotrophe Pilze sind in der Lage, anorganischen Stickstoff, zum Beispiel Ammoniumnitrat (Graham *et al.* 1976), zu verwerten. Heterotrophe Pilze benötigen hingegen eine organische Stickstoffquelle, zum Beispiel eine Aminosäure, für ihr Wachstum. Zusätzlich zum Ersatz der Glucose des Hauptkulturmediums durch Melasse wurde untersucht, ob L-Asparagin als Stickstoffquelle durch Ammoniumnitrat substituiert werden kann. Dies war durch die Verwendung der Nährlösung NL-MA (5.4.1) ebenfalls ohne Einbußen des Wachstums und der Produktausbeuten möglich (2.6.2.4). Tabelle 3.9 stellt zusammenfassend die Kosten für das Standardmedium (SNL-H) und das optimierte Kulturmedium NL-MA vergleichend gegenüber. Zugrunde gelegt wurde dabei ein Preis von 1 € kg⁻¹ Melasse und die Kosten für Laborchemikalien biochemischer / molekularbiologischer beziehungsweise technischer Qualität (für NH₄NO₃). Durch den Ersatz der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wurde somit eine signifikante Senkung der Kosten des Kulturmediums von circa 70% erzielt.

Tabelle 3.9 Kostenvergleich zwischen SNL-H- und optimiertem Kulturmedium (NL-MA) für *P. sapidus*

SNL-H Medium	Dosierung L ⁻¹	Preis kg ⁻¹ [€]	Preis g ⁻¹ [€]	Preis L ⁻¹ Medium [€]
Glucose-Monohydrat	30,0 g	21	0,02	0,63
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g	220	0,22	0,99
Hefeextrakt	3,0 g	144	0,14	0,43
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	37,25	0,04	0,06
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g	121	0,12	0,06
Spurenelementlösung	1,0 mL			
Summe				2,17

NL-MA Medium	Dosierung L ⁻¹	Preis kg ⁻¹ [€]	Preis g ⁻¹ [€]	Preis L ⁻¹ Medium [€]
Melasse	100 mL	1	0,001	0,10
Ammoniumnitrat	2,4 g	3,64	0,004	0,01
Hefeextrakt	3,0 g	144	0,14	0,43
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	37,25	0,04	0,06
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g	121	0,12	0,06
Spurenelementlösung	1,0 mL			
Summe				0,66

4 Ausblick

Die Synthese von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen mittels Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* erfolgt in einem mehrstufigen Prozess: Produktion der Biomasse und des Enzyms, Herstellung des aktiven Biokatalysators durch Lyophilisierung des Pilzmyzels, Transformation des Substrats und Abtrennung des beziehungsweise der Zielprodukte. Jeder dieser Schritte bietet Optimierungspotenzial. Durch die Modifikation des Nährmediums des Basidiomyceten können zum einen Wachstum und Enzymsproduktion gesteigert werden, zum anderen ist eine Kostenoptimierung möglich. Letzteres wurde bereits durch Modifikation des Mediums erreicht. Der Mechanismus der Erzeugung eines aktiven Biokatalysators durch Lyophilisierung ist hingegen noch nicht geklärt und die Bedingungen der Gefriertrocknung nicht optimiert. Enzymstabilisierende Zusätze, Variation der Prozessparameter und alternativ andere Trocknungsverfahren wären denkbar. Auch wurden bestimmte Parameter der Transformation wie zum Beispiel Temperatur und Rührgeschwindigkeit bislang nicht untersucht und vertiefende Experimente etwa zur Sauerstoffsättigung, zum Substrat/Enzymverhältnis und zur Auswahl des Transformationsmediums wären möglich. Zur besseren Substratverfügbarkeit, aber auch zur Produktabtrennung könnten darüber hinaus Zweiphasensysteme untersucht werden. Eine Steigerung der Ausbeuten durch Transformation in organischen Lösungsmitteln oder mit immobilisiertem Katalysator ist ebenfalls denkbar.

Nach Identifizierung des (+)-Valencen oxidierenden Enzyms ist eine gezielte Optimierung aller Prozessschritte möglich. Verschiedene Hinweise auf die Enzymklasse wurden bereits erhalten, eine Reinigung bis zur elektrophoretischen Homogenität wurde jedoch nicht erzielt. In einem nächsten Schritt kann das beziehungsweise die entsprechenden Gene auf molekularer Ebene charakterisiert und anschließend heterolog in geeigneten Systemen wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert werden. Parallel wären Versuche zum Scale-up der Anzucht des Produktionsstammes denkbar. Eine Vielzahl verschiedener Bioreaktortypen (z. B. Rührkessel- und Airliftreaktoren) stehen dazu zur Verfügung.

Analoge Überlegungen treffen auf die Oxyfunktionalisierung von α -Pinen durch ausgewählte Basidiomyceten zu. Im durchgeführten Screening wurden eine Vielzahl potenter Aromastoffe identifiziert. Die Identifizierung weiterer terpenoider Transformationsprodukte ist Gegenstand aktueller Arbeiten (Rinne 2007). Außerdem wurden bereits cDNAs von Cytochrom P450-Monooxygenasen aus *P. sapidus* isoliert, die vermutlich an der Oxidation von α -Pinen beteiligt sind (Bouws 2007). Darüber hinaus wäre eine Erhöhung der Selektivität der Produktbildung wünschenswert.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen (Tabelle 5.1) wurden von folgenden Quellen bezogen:

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

Tabelle 5.1: Eingesetzte Mikroorganismen

Organismus	Stamm-Nr.	Verwendung	Transformation durch
<i>Marasmius scorodoni</i>	CBS 137.83	Biotransformation α -Pinen	Submerskulturen, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Cystoderma carcharias</i>	CBS 157.47	Biotransformation α -Pinen	Submerskulturen, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Cyathus striatus</i>	DSMZ 1652	Biotransformation α -Pinen	Submerskulturen, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Trametes versicolor</i>	WAG EIK E39	Biotransformation α -Pinen	Submerskulturen, konzentrierte Kulturen, Lyophilisate
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266	Biotransformation (+)-Valencen	Lyophilisate

5.2 Chemikalien

5.2.1 Referenzverbindungen und Substrate

Tabelle 5.2: Referenzverbindungen und Substrate

Substanz	Reinheit	Hersteller
BHT	purum; $\geq 99,0\%$	Fluka, Neu-Ulm
(-)-Carveol	Isom. 97%	Aldrich, Taufkirchen
(-)-Myrtenal	purum; $> 95\%$	Fluka
(-)- <i>cis</i> -Myrtenol	puriss; $> 99\%$	Fluka
(+)-Nootkaton	$\geq 99,0\%$	Fluka
(\pm)- α -Pinen	purum; 96%	Sigma, Taufkirchen
(-)- <i>trans</i> -Pinocarveol	purum; 98%	Fluka
Thymol	$> 99\%$	Fluka
(+)-Valencen	$\geq 90\%$	Fluka
(+)-Valencen	$\geq 70\%$	Döhler, Darmstadt
(+)-Valencen	$\geq 30\%$	Döhler
(+)- <i>cis</i> -Verbenol	95%	Fluka
(-)-Verbenon	puriss; $> 99\%$	Fluka

5.2.2 Bestandteile der Nährlösungen

Tabelle 5.3: Bestandteile der Kulturmedien

Substanz	Reinheit	Hersteller
Agar-Agar	f. Mikrobiol.	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumnitrat	chemisch rein	Riedel-de Haën, Seelze
L-Asparagin-Monohydrat	99%	Merck KGaA
EDTA	Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Reag. Ph. Eur.	Riedel-de Haën
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. Mikrobiol.	Merck KGaA
Hefeextrakt	f. Mikrobiol.	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	f. Mikrobiol.	Merck KGaA
Kupfersulfat-Pentahydrat	99%	J T Baker, Deventer, NL
Lignin, organosolv		Aldrich
Magnesiumsulfat-Hydrat	reinst	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	p.a.	Riedel-de Haën
Palatinose™-Melasse		Südzucker, Mannheim/Ochsenfurt

5.2.3 Sonstige Chemikalien

Tabelle 5.4: Sonstige Chemikalien

Substanz	Reinheit	Hersteller
ABTS	purum; ≥ 99,0% (HPLC)	Fluka
Acrylamid	reinst, 2x krist.; ≥ 98,0%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aesculetin	≥ 98,0% (HPLC)	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat	> 98%	Carl Roth GmbH
ASB-C8Ø	> 97%	Calbiochem, San Diego (CA), USA
BIS-TRIS	Pufferan®; ≥ 99%	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	ACS, Reag. Ph Eur	Merck KGaA
Calciumacetat-Hydrat	reinst DAC	Merck KGaA
Calciumchlorid-Dihydrat	Reag. Ph. Eur.	Riedel-de Haën, Seelze
Cholsäure Natriumsalz	purum; ≥ 97,0% (NT)	Fluka
Citronensäure-Monohydrat	p.a. ACS; ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH
Coomassie® Brillantblau G 250	reinst	Serva, Heidelberg
Coomassie® Brillantblau R 250	reinst	Serva
Deuteriumoxid	99,9 Atom% D	Aldrich
DHBT	purum; ≥ 98%	Fluka
o-Dianisidin-Dihydrochlorid	purified for use with peroxidase and peroxidase-coupled reactions	Sigma-Aldrich
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	purum; ≥ 95,0% (NT)	Fluka
2,6-Dimethoxyphenol	99%	Aldrich
1,4-Dithiothreitol	f. d. Biochemie	Merck KGaA
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Ph. Eur.; ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH
Essigsäure	puriss. p.a.; 99,5%	Fluka
Formaldehyd 37%	zur Synthese	Merck KGaA
Glycerol	Ph. Eur.; ≥ 98%	Carl Roth GmbH
Glycin	f. d. Elektrophorese	Merck KGaA
L-Histidin	für biochemische Zwecke	Merck KGaA
1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat	purum; ≥ 98% (T)	Fluka
Kaliumcyanid	zur Analyse	Merck KGaA

Substanz	Reinheit	Hersteller
Kaliumhydroxid	rein	Merck KGaA
Kieselgel 60	0,063 - 0,200 mm; f. d. Säulenchromatographie	Merck KGaA
Linolsäure	techn.; 60 - 74%	Fluka
Meerrettich-Peroxidase	693 U mg ⁻¹	Fluka
N,N'-Methylenbisacrylamid	2x krist.	Carl Roth GmbH
MOPS	99,5%	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat	p.a.	Merck KGaA
Natriumazid	BioChemika Ultra; > 99,5%	Fluka
Natriumcarbonat	p.a.	Merck KGaA
Natriumchlorid	p.a.; ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	reinst Ph Eur; ≥ 98,0%	Merck KGaA
Natriumsulfat	98%	Carl Roth GmbH
Natriumsulfid-Hydrat	66 - 63%	Carl Roth GmbH
Natriumthiocyanat	purum; ≥ 97,5%	Riedel-de Haën
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Reag. Ph Eur	Merck KGaA
Nordihydroguajaretsäure	~95% (HPLC)	Fluka
1,10-Phenanthrolin-Monohydrat	Reag. Ph. Eur	Merck KGaA
Piperonylbutoxid	techn.; ≥ 90% (GC)	Fluka
Proadifen-Hydrochlorid	≥ 95%	Sigma
SDS	≥ 99%	Carl Roth GmbH
L- α -Lecithin aus Sojabohnen	~99% (TLC)	Sigma
Lipoxygenase aus Sojabohnen	BioChemika; 9,2 U mg ⁻¹	Fluka
Silbernitrat	Reag. Ph Eur	Merck KGaA
TEMED	f. d. Elektrophorese; 99%	Carl Roth GmbH
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	≥ 99%	Sigma-Aldrich
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	p.a. ACS; ≥ 99%	Carl Roth GmbH
TRIS-Base	Pufferan [®] ; ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH
TRIS-HCl	Pufferan [®] ; ≥ 99%	Carl Roth GmbH
Wasserstoffperoxid 30%	puriss. p.a. ACS; ≥ 30%	Fluka

5.2.4 Lösungsmittel

Die Lösungsmittel (Tabelle 5.5) wurden nach Gebrauch redestilliert und wie die Fassware über eine Füllkörperkolonne destillativ gereinigt. Nach Reinheitsüberprüfung wurden die Redestillate erneut eingesetzt. Diethylether wurde jeweils vor Gebrauch destilliert, durch KOH stabilisiert und lichtgeschützt gelagert.

Tabelle 5.5: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Verwendung	Lieferant
Aceton	redest.	Reinigung	Carl Roth GmbH
Diethylether	redest.	Extraktion, Säulenchromatographie	Carl Roth GmbH
Ethanol, vergällt	99%	Desinfektion	Kraul & Wilkening & Stelling, Hannover
Ethanol, unvergällt	96%	Proteinpräzipitation	Kraul & Wilkening & Stelling
Ethanol	99,9%	FPLC	Merck KGaA
Methanol	redest.	SDS-PAGE, IEF	BASF, Ludwigshafen
Methanol	99,8%, HPLC	HPLC	J. T. Baker
Pentan	redest.	Extraktion, Säulenchromatographie	Carl Roth GmbH

5.2.5 Gase

Für den Kompressor wurde Luft durch Ansaugen über einen Staubfilter der Raumluft entnommen. Nach der Kompression wurde die Luft getrocknet und zusätzlich über eine Silicagelsäule (5 x 30 cm) geleitet.

Tabelle 5.6: Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendung
Helium	5.0	Westfalen, Münster	Trägergas GC-MS
Stickstoff	5.0	Westfalen	Spülgas, Schutzgas, Detektorgas
Wasserstoff	5.0	Westfalen	Trägergas, Detektorgas

5.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Hier nicht aufgeführte Geräte werden in den jeweiligen Methoden spezifiziert.

Tabelle 5.7: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S	H&P, Oberschleißheim
Autoklav	5075 ELV	Systec, Wetzlar
Brutschrank	UM 500	Memmert, Schwabach
Destillationskolonne	Vigreux	LAT, Garbsen
Eissystem	ACM 35 Scotsman	Frimont, Mailand, IT
E-Pure-Wasseranlage	D4632S	Barnsted, Leverkusen
Gefriertrocknungsanlage	Lyovac [®] GT2	Finnaqua, Huerth
Gefriertrocknungsanlage	VaCo 2	Zirbus Technology, Bad Grund
Gefriertruhe	GT36	Bauknecht, Schondorf
Laborbrenner	Gasprofi 2, WDL Tec	Wartewig, Arenshausen
Lichtmikroskop	Will H-500	Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	LAMS-1003	IDL GmbH & Co.KG, Nidderau
pH-Meter	Ultra Basic UB5	Denver Instruments, Göttingen
Rotationsverdampfer	Laborata 4002	Heidolph, Rust
Inkubationsschüttler	Infors HAT	Infors, Einsbach
Steril-Werkbank	CA-RE 4	Clean-Air, Hilden
Superfreezer	VX 350 Series 2	Jouan GmbH, Fernwald
Ultraschallbad	Sonorex 510 H	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax	TP 18/10, 170 W	IKA, Staufen
Umlaufkühler	FC 600 W	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus, Osterode
Zentrifuge	Sorval RT7 Plus	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus

5.3.1.1 Rührkesselreaktor

Tabelle 5.8: Rührkesselreaktor, Meredos, Bovenden

Kulturgefäß	3,5 L
pH-Elektrode	Schott Steamline SL 80-325 pH
Druckluft	Membrankompressor (Druck 0,6 bar), sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart [®] 2000, 0,2 µm)
Abluft	PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm) als Sterilbarriere
Standardbedingungen	24 °C, 200 U min ⁻¹ - 400 U min ⁻¹
Belüftung	Luftrohr (a. D. 11 mm), 10 L h ⁻¹ bei 2,5 L Füllvolumen

5.4 Kultivierung der Basidiomyceten

5.4.1 Nährlösungen

Die einzelnen Bestandteile (Tabelle 5.9) wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit 0,5 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt. Das Medium wurde in Erlenmeyerkolben überführt, mit Cellulosestopfen verschlossen und mit Aluminiumfolie abgedeckt. Bei der Kultivierung im Reaktor wurde das Medium in den entsprechenden Rührkessel überführt. Anschließend wurde die Nährlösung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bei der Herstellung von melassehaltigem Medium wurde die Melasse mit 0,5 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt, separat autoklaviert und später steril hinzugegeben.

Tabelle 5.9: Zusammensetzung der Nährlösungen; Glc = D-(+)-Glucose-Monohydrat, Asn = L-Asparagin-Monohydrat, MgSO₄ = Magnesiumsulfat-Hydrat, Hefe = Hefeextrakt, SE-Lsg = Spurenelementlösung (Tabelle 5.10), c = Konzentration, * = modifiziert nach Sprecher 1959

	Glc c / g L ⁻¹	Melasse c / mL L ⁻¹	Asn c / g L ⁻¹	NH ₄ NO ₃ c / g L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ c / g L ⁻¹	MgSO ₄ c / g L ⁻¹	Hefe c / g L ⁻¹	SE-Lsg c / mL L ⁻¹
SNL-H*	30	0	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-G ₀₀	0	0	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-G ₁₀	10	0	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-G ₁₅	15	0	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-M ₀₁₀	0	10	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-M ₀₂₅	0	25	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-M, NL-M ₁₀₀	0	100	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-M ₁₅₀	0	150	4,5	0,0	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-MA _{1,2}	0	100	0,0	1,2	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-MA, NL-MA _{2,4}	0	100	0,0	2,4	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-MA _{4,8}	0	100	0,0	4,8	1,5	0,5	3,0	1,0
NL-MA _{7,2}	0	100	0,0	7,2	1,5	0,5	3,0	1,0

Tabelle 5.10: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Substanz	Konzentration / g L ⁻¹
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,080
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,090
MnSO ₄ · H ₂ O	0,030
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,005
EDTA	0,400

5.4.2 SNL-H-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem SNL-H-Medium nach 5.4.1 zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

5.4.3 Kulturführung (Transformation von α -Pinen)

5.4.3.1 Stammkultivierung

Von dem verwendeten Pilz-Stamm wurden jeweils zwei Stammkulturen auf Agarplatten mit SNL-H-Agar-Medium (5.4.2) angelegt. Dazu wurde je eine Agarplatte mit einem ca. 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenen Agarstück beimpft, mit Parafilm® verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C kultiviert (Taubert *et al.* 2000). Nachdem die Platten zur Hälfte mit Myzel bewachsen waren, wurde die Kultur bei 4 °C gelagert. Diese Stammkulturen wurden mindestens alle 6 Monate nach dem gleichen Verfahren überimpft.

5.4.3.2 Homogenisierung der Kulturen

Pilzmyzel von Agarplatten oder aus flüssigen Kulturmedien wurde steril direkt im Kulturmedium mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator für ca. 20 s bei niedriger Drehgeschwindigkeit homogenisiert.

5.4.3.3 Vorkulturen

Ein myzelbewachsenes Agarstück (ca. 1 cm²) der Stammkultur (5.4.3.1) wurde mit Hilfe eines sterilen Spatels in einen Erlenmeyerkolben (500 mL) mit 200 mL SNL-H-Medium (5.4.1) überführt, homogenisiert (5.4.3.2) und je nach Organismus zwischen 6 und 9 Tagen (2.1.1, Tabelle 2.1) bei 24 °C und 150 U min⁻¹ inkubiert.

5.4.3.4 Anzucht und Ernte von Biomasse

Im Rührkesselreaktor (5.3.1.1) wurden 2,3 L SNL-H-Medium (5.4.1) mit 200 mL einer zuvor homogenisierten Vorkultur (5.4.3.3) inokuliert. Nach 1 - 6 Tagen wurde der Rührkesselinhalt geerntet. Dazu wurde der Inhalt des Reaktors durch ein Baumwolltuch filtriert. Das erhaltene Pilzmyzel wurde zweimal mit je 400 mL 0,9%iger NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und für weitere Experimente verwendet. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilwerkbank und die verwendeten Geräte und Lösungen wurden zuvor 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.4.3.5 Submerskulturen und Biokonzentrate mit vermindertem Glucosegehalt

Für die Submerskultur wurden 100 mL Kulturmedium (NL-G₁₀, 5.4.1) in einem Erlenmeyerkolben (300 mL) mit 5 g Biofeuchtmasse aus der Reaktorkultivierung (5.4.3.4) steril inokuliert und anschließend homogenisiert (5.4.3.2). Für die Kulturführung als Biokonzentrat wurden analog 50 mL Kulturmedium mit 50 g Biofeuchtmasse inokuliert. Die Biomasse wurde jedoch nicht homogenisiert. Nach 24-stündiger Agitation bei 24 °C und 150 U min⁻¹ erfolgte die Substratdosierung (5.6.1.1).

5.4.3.6 Herstellung von Lyophilisaten

Je 50 g Biofeuchtmasse aus der Rührkesselreaktorkultivierung (5.4.3.4) wurden in ein steriles Becherglas (250 mL) eingewogen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gefriertrocknung erfolgte für 2 - 4 Tage (Anlage Finaqua

Lyovac GT2) bei Raumtemperatur und 2×10^{-5} bar. Das Lyophilisat wurde ausgewogen, mit einem Glasstab zerkleinert, in sterile FalconTM-Tubes überführt und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

5.4.4 Kulturführung (Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung)

Die Stammkultivierung, Homogenisierung und Anzucht der Vorkultur (4 Tage) von *Pleurotus sapidus* erfolgte analog zur Kulturführung für die α -Pinentransformation (5.4.3).

5.4.4.1 Anzucht von Biomasse

Im Rührkesselreaktor (5.3.1.1) wurden 2,3 L SNL-H-Medium (5.4.1) mit 200 mL homogener (5.4.3.2) Vorkultur inokuliert. Nach 3 - 5 Tagen wurde der Rührkesselreaktorinhalt geerntet. Dazu wurde dieser durch ein Baumwolltuch filtriert. Das erhaltene Pilzmyzel wurde zweimal mit je 400 mL 0,9%iger NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und für weitere Experimente verwendet.¹⁸ Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilwerkbank und die eingesetzten Geräte und Lösungen wurden zuvor 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.4.4.2 Herstellung von Lyophilisaten

Wenn nicht anders angegeben, wurden je 50 g Biofeuchtmasse aus der Rührkesselreaktor-kultivierung (5.4.4.1) in ein autoklaviertes Becherglas (250 mL) eingewogen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lyophilisierung erfolgte anfangs für 2 - 5 Tage (Anlage Finaqua Lyovac GT2) bei Raumtemperatur und 2×10^{-5} bar. Später wurde auf die Verwendung von flüssigem Stickstoff verzichtet, bis zu 100 g Biofeuchtmasse in eine Glaspetrischale (Durchmesser 14 cm) eingewogen und bei -20 °C tiefgefroren. Anschließend wurde 3 - 7 Tage lyophilisiert (Anlage VaCo 2 von Zirbus Technology). Die Stellflächentemperatur betrug -20 °C, die Temperatur der Kühlspirale -45 °C. Das erhaltene Lyophilisat wurde ausgewogen, mit einem Glasstab zerkleinert, in sterile FalconTM-Tubes überführt und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

5.4.4.3 Anzucht von Laccase-haltigen Kulturen

Die Kulturführung erfolgte nach Linke *et al.* (2007). Zur Induktion wurde Lignin und $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ verwendet.

5.4.5 Kulturführung (Transformation von (+)-Valencen: Optimierung)

Die Stammkultivierung und die Homogenisierung der Kulturen erfolgte analog zur Kulturführung für die α -Pinentransformation (5.4.3).

¹⁸ Unter 2.3.2.3 wurde festgestellt, dass ein Natriumchloridzusatz zum Transformationspuffer die Aktivität verringerte, daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit destilliertes Wasser zum Spülen verwendet.

5.4.5.1 Vorkulturen

Ein myzelbewachsenes Agarstück (ca. 1 cm²) der Stammkulturen (5.4.3.1) wurde mit Hilfe eines sterilen Spatels in 230 mL SNL-H-Medium (5.4.1) überführt, homogenisiert (5.4.3.2) und 4 Tage bei 24 °C und 150 U min⁻¹ inkubiert.

5.4.5.2 Adaption von *Pleurotus sapidus* an (+)-Valencen

Eine Vorkultur wurde wie unter 5.4.5.1 beschrieben angesetzt und 7 Tage bei 24 °C und 150 U min⁻¹ inkubiert. Das SNL-H-Medium (5.4.1) der Vorkultur wurde nach dem Inokulieren stufenweise bis zur angegebenen Konzentration mit (+)-Valencen (Döhler, ≥ 70%) versetzt. Mit der Kultur wurden SNL-H-Agar-Platten (5.4.2) inokuliert. Der adaptierte *Pleurotus*-Stamm wurde anschließend analog 5.4.5.1, 5.4.5.4 kultiviert. Den Vorkulturen wurde die jeweilige Konzentration (+)-Valencen (Döhler, ≥ 70%) zugesetzt.

5.4.5.3 Anzucht von Biofeuchtmasse in Schüttelkolben (500 mL)

In einem Erlenmeyerkolben (500 mL) wurden für die Hauptkultur 230 mL Nährmedium (5.4.1) mit 20 mL homogenisierter (5.4.3.2) Vorkultur (5.4.5.1) inokuliert. Anschließend wurde 4 Tage bei 24 °C und 150 U min⁻¹ kultiviert.

5.4.5.4 Anzucht von Biomasse in Schüttelkolben (300 mL)

Für die Hauptkultur wurden in einem Erlenmeyerkolben (300 mL) mit 10 mL homogenisierter (5.4.3.2) Vorkultur (5.4.5.1, 5.4.5.2) 115 mL Nährmedium inokuliert. Anschließend wurde 4 Tage bei 24 °C und 150 U min⁻¹ kultiviert.

5.4.5.5 Ernte der Hauptkulturen zur Herstellung von Lyophilisaten

Nach dem Beenden der Kulturführung (5.4.5.3) wurde die Biofeuchtmasse bestimmt (5.5.2) und gewaschen. Dazu wurde das abzentrifugierte Pilzmyzel in 100 mL gekühltem destilliertem Wasser suspendiert und 10 min zentrifugiert (4.000 U min⁻¹, 3.313 x g, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Die Herstellung des Lyophilisats erfolgte nach 5.4.5.7.

5.4.5.6 Ernte der Hauptkulturen zur Herstellung von Lyophilisaten

Nach dem Beenden der Kulturführung (5.4.5.4) wurde die Biofeuchtmasse bestimmt (5.5.2) und gewaschen. Dazu wurden 25 mL der abzentrifugierten Zellmasse in ein FalconTM-Tube (50 mL) überführt, in 25 mL gekühltem destilliertem Wasser suspendiert und 10 min zentrifugiert (3.500 U min⁻¹, 2.537 x g, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Die Herstellung des Lyophilisats erfolgte nach 5.4.5.7.

5.4.5.7 Herstellung von Lyophilisaten

10 g Zellmasse wurden in ein Kristallisierschälchen (200 mL) eingewogen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei -20 °C eingeforen. Die Lyophilisierung erfolgte anfangs für 2 - 4 Tage (Anlage Finaqua Lyovac GT2) bei Raumtemperatur und 2 x 10⁻⁵ bar. Später wurde

die Gefriertrocknungsanlage VaCo 2 von Zirbus Technology verwendet. Die Stellflächen-temperatur betrug $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Kondensatortemperatur $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Dauer der Lyophilisierung betrug 2 - 3 Tage. Das erhaltene Lyophilisat wurde ausgewogen, mit einem Glasstab zerkleinert, in sterile FalconTM-Tubes überführt und bis zur Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.5 Bestimmung von Kulturparametern

5.5.1 Biofeuchtmasse nach Kultivierung im Rührkesselreaktor

Die Bestimmung der Feuchtmasse erfolgte aus dem Rührkesselreaktoransatz (5.4.3.4, 5.4.4.1) durch Auswiegen nach Filtration durch ein Baumwolltuch nach 5 min Wartezeit.

5.5.2 Biofeuchtmasse nach Kultivierung im Schüttelkolben

Das Pilzmyzel der Hauptkultur (5.4.5.4) wurde durch Zentrifugation (10 min , 4.000 U min^{-1} , 3.313 x g , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) von der Nährlösung abgetrennt. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die Zellmasse im Zentrifugenbecher ausgewogen.

5.5.3 Trockenmasse nach Gefriertrocknung

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte durch Auswiegen nach der Gefriertrocknung (5.4.3.6, 5.4.4.2, 5.4.5.7 und 5.4.5.6).

5.5.4 Glucosegehalt - Photometrisch (UV)

Nach dem Beenden der Kulturführung (5.4.5.4) wurde der Glucosegehalt im Kulturüberstand enzymatisch mittels D-Glucosemonohydrat-Test (10 716 251 035; R-Biopharm AG, Darmstadt) nach Herstelleranweisung bestimmt.

5.5.5 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturmedien und Puffer wurde mit einem kalibrierten pH-Meter (5.3) bestimmt.

5.5.6 Laccase-Aktivität (VIS)

Die Bestimmung der Laccase-Aktivität im Kulturüberstand (5.4.4.3) wurde nach Linke *et al.* (2007) durchgeführt. Der Testansatz enthielt $850\text{ }\mu\text{L}$ $0,1\text{ M}$ Natriumtartrat, $\text{pH } 4,5$, $100\text{ }\mu\text{L}$ 5 mM ABTS (in E-Pure-Wasser) und $50\text{ }\mu\text{L}$ Probe.

5.5.7 Überprüfung auf Kontamination

Durch Beobachtung des Kulturwachstums wurde routinemäßig auf eine Kontamination geprüft. Aufgrund des schnelleren Wachstums von Hefen und Bakterien hätten diese für eine Trübung des Kulturmediums gesorgt. Zusätzlich wurde eine Probe mit Hilfe eines hitzesterilisierten Drigalski-Spatels auf eine SNL-H-Platte (5.4.2) ausgestrichen. Die Platte wurde vier Tage bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet und täglich visuell auf Kontamination hin untersucht. Gegebenenfalls wurde eine vermutete Kontamination zusätzlich durch Mikroskopie überprüft.

5.6 Transformationen

5.6.1 Transformation von α -Pinen

5.6.1.1 Submerskulturen und Biokonzentrate

1 mmol (139 mg, 162 μ L) α -Pinen wurde zur Kultur (5.4.3.5) dosiert und 48 h bei 24 °C und 150 U min⁻¹ transformiert. Anschließend erfolgte die Extraktion nach 5.7.1.1.

5.6.1.2 Lyophilisate

In einem Erlenmeyerkolben (30 mL) wurden 500 mg Lyophilisat (5.4.3.6) in 15 mL 100 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) 1 h rehydratisiert und mit 1 mmol (139 mg, 162 μ L) α -Pinen versetzt. Anschließend wurde 20 h bei 24 °C und 150 U min⁻¹ transformiert. Danach erfolgte die Extraktion nach 5.7.1.2.

5.6.1.3 Blindwerte

Der chemische Blindwert wurde analog zu den jeweiligen Biotransformationsversuchen (5.6.1.1 und 5.6.1.2) parallel bestimmt. Lediglich auf die Zugabe der Biofeuchtmasse (5.4.3.4) oder des Lyophilisats (5.4.3.6) wurde verzichtet.

5.6.2 Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung

5.6.2.1 Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Transformation in Schraubdeckelgläschen (4 mL) in horizontaler Lage bei 150 U min⁻¹ und 24 °C für 24 h durchgeführt. Die Transformation wurde durch Zugabe von 1 μ L (4,1 μ mol) (+)-Valencen (Fluka, \geq 90%) zu 50 mg Lyophilisat (5.4.4.2) in 1,5 mL Puffer gestartet. Ggf. wurde vor der Zugabe des Lyophilisats noch ein genannter Zusatz in der aufgeführten Konzentration eingewogen. Nach dem Ende der Transformation wurde nach 5.7.1.4 extrahiert.

5.6.2.2 Transformation mit vorheriger Rehydratisierung der Lyophilisate

Die Transformation wurde analog 5.6.2.1 durchgeführt, nur wurde nach der Zugabe des Puffers zum Lyophilisat und vor dem Start der Transformation für die angegebene Zeit in horizontaler Lage bei 150 U min⁻¹ und 24 °C rehydratisiert.

5.6.2.3 Transformation mit separierten Komponenten oder Enzymlösungen

Die Transformation wurde analog 5.6.2.1 durchgeführt. Anstelle des Lyophilisats wurde die entsprechende separierte Komponente (5.6.2.8) oder Enzymlösung (u. a. 5.4.4.3, 5.8) verwendet. Ggf. wurde ein genannter Zusatz in der aufgeführten Konzentration zugegeben.

5.6.2.4 Inkubation von (+)-Valencen

Die Inkubation erfolgte analog 5.6.2.1. Auf die Zugabe des Lyophilisats wurde verzichtet. Stattdessen wurde die angegebene Menge des Metallsalzes und / oder einer anderen Verbindung eingewogen.

5.6.2.5 Blindwerte

Der chemische Blindwert wurde analog zu den jeweiligen Transformationsversuchen (5.6.2.1 - 5.6.2.4) parallel durchgeführt. Lediglich auf die Zugabe des entsprechenden Katalysators (z. B. Lyophilisat, separierte Komponente, Enzymlösung, Metallsalz) wurde verzichtet. Lag der Katalysator gelöst vor, wurde die Lösung durch das entsprechende Volumen des verwendeten Puffers ersetzt.

5.6.2.6 Rehydratisierung von Lyophilisat

Wenn nicht anders angegeben, wurde 1 g Lyophilisat (5.4.4.2) mit 30 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 1 h in horizontaler Lage bei 150 U min^{-1} und $24 \text{ }^\circ\text{C}$ rehydratisiert.

5.6.2.7 Hitzeinaktivierung

Die Probe wurde in einem fest verschlossenen Reaktionsgefäß (2,0 mL) für 30 min im kochenden Wasserbad desaktiviert.

5.6.2.8 Separation des Lyophilisats durch Zentrifugation

Das Lyophilisat wurde zunächst rehydratisiert (5.6.2.6), anschließend für 60 min zentrifugiert ($27.940 \text{ U min}^{-1}$, $100.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand nach Membranfiltration ($0,45 \mu\text{m}$ Porengröße, 25 mm, PET, Carl Roth GmbH) in 1,5 mL-Aliquots (*Überstand, separiert*) für die direkte Verwendung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt oder bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ im Superfreezer gelagert. Der Zentrifugationsrückstand (*Rückstand, separiert*) wurde anschließend in 30 mL des zur Separation verwendeten Puffers resuspendiert, in 1,5 mL-Aliquots aufgeteilt, desaktiviert (5.6.2.7, *Rückstand, desaktiviert*) und zur späteren Verwendung bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zum Teil wurde der separierte Rückstand dreimal hintereinander in je 30 mL frischem Puffer resuspendiert, erneut 15 min zentrifugiert ($27.940 \text{ U min}^{-1}$, $100.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), nach dem letzten Waschschrift aliquotiert (je 1,5 mL, *Rückstand, gewaschen*) und eventuell zusätzlich desaktiviert (5.6.2.7, *Rückstand, desaktiviert*).

5.6.2.9 Rekombination von separiertem Lyophilisat

Zur Rekombination von zuvor separiertem Lyophilisat (5.6.2.8) wurden 1,5 mL des suspendierten Rückstandes (*Rückstand, separiert*; *Rückstand, desaktiviert*; *Rückstand, gewaschen*) für 10 min zentrifugiert ($13.000 \text{ U min}^{-1}$, $16.060 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), der klare Überstand verworfen, das erhaltene Pellet in 1,5 mL separiertem Überstand resuspendiert und anschließend analog 5.6.2.1 zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt.

5.6.2.10 Rekombination von Enzymlösungen mit Rückstand

Die Rekombination wurde analog 5.6.2.9 durchgeführt. Anstelle des separierten Überstandes wurde die Enzymlösung (u. a. 5.8) verwendet. Bei einem geringeren Volumen wurde diese zuvor mit 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 ad 1,5 mL aufgefüllt.

5.6.2.11 Supplementierung von Konzentraten mit Spurenelementen

Lyophilisat wurde zur Separation (5.6.2.8) 30 min zentrifugiert. Anschließend wurden je 3 mL des separierten Überstandes auf ca. 400 μ L konzentriert (5.6.2.12). Ein Aliquot des Konzentrats wurde mit Puffer aufgefüllt; der anderen Hälfte wurden zusätzlich 15 μ L einer Spurenelementlösung (5.4.1, Tabelle 5.10) zugesetzt. Die Transformationsansätze wurden mit gewaschenem, desaktiviertem Rückstand rekombiniert (5.6.2.10) sowie mit 10 μ L (+)-Valencen versetzt. Die Transformation erfolgte für 24 h analog 5.6.2.1.

5.6.2.12 Ultrafiltration

Zur Konzentrierung, Umpufferung oder Entsalzung von separierten Überständen (5.6.2.8) oder anderen Enzymlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, die in Tabelle 5.11 aufgeführten Filtrationseinheiten eingesetzt.

Tabelle 5.11: Verwendete Filtrationseinheiten; MWCO = Ausschlussgröße

Filtrationseinheit	Hersteller	MWCO / Da	für Volumina / mL
Amicon Ultra Plus-4	Millipore	10.000	≤ 4
Vivaspin 15R	Vivascience	10.000	> 4 - 15
Centricon Plus-70	Millipore	10.000	20 - 70

Die Durchführung erfolgte nach den entsprechenden Herstelleranweisungen. Zur Umpufferung und Entsalzung wurde dreimal mit einem der Probe identischen Volumen der entsprechenden Lösung gespült.

5.6.2.13 Gewinnung von Filtrat

Separierter Überstand (5.6.2.8) wurde um den Faktor 14 konzentriert (5.6.2.12). Mit dem Filtrat wurden zuvor umgepufferte, konzentrierte FPLC-Fraktionen ad 1,5 mL aufgefüllt.

5.6.2.14 Anreicherung von Sauerstoff

Durch 30 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 wurde mit einer Kerzenfritte (Porengröße 3, 16 - 40 μ m) 10 min Sauerstoff geleitet. Der so behandelte Puffer wurde zur Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisat (5.4.4.2) nach 5.6.2.1 eingesetzt.

5.6.2.15 Abreicherung von Sauerstoff

Zur Abreicherung des Sauerstoffs im Transformationspuffer wurden 30 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 für 30 min im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurde mit Hilfe einer Kerzenfritte (Porengröße 3, 16 - 40 μ m) 30 min Stickstoff durch den Puffer geleitet und der Kopfraum mit Stickstoff gesättigt. Der so behandelte Puffer wurde zur Transformation des Substrats mit

Lyophilisat (5.4.4.2) nach 5.6.2.1 eingesetzt. Zusätzlich wurde nach dem Einwiegen des Lyophilisats in das Schraubdeckelgläschen der Kopfraum mit N₂ begast und der Puffer sowie das Substrat unter fortdauernder Kopfraumbegasung zugegeben. Anschließend wurde das Vial sofort fest verschlossen.

5.6.3 Transformation von (+)-Valencen: Optimierung

5.6.3.1 Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Transformation in Schraubdeckelgläschen (4 mL), in horizontaler Lage bei 150 U min⁻¹ und 24 °C für 4 h durchgeführt. Die Biokatalyse wurde durch Zugabe von 1,4 µL (+)-Valencen (Döhler, ≥ 70%) zu 25 mg Lyophilisat (5.4.5.7) in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 und 1 g Glasperlen gestartet. Anschließend wurde nach 5.7.1.5 extrahiert.

5.6.3.2 Blindwerte

Analog zur entsprechenden Biotransformation (5.6.3.1) wurden Blindwerte mitgeführt. Hierfür wurden 25 mg Lyophilisat (5.4.5.7, 5.4.5.6) und 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 in ein Schraubdeckelgläschen (4 mL) gefüllt und der Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min im Wasserbad gekocht.

5.7 Probenvorbereitungen

5.7.1 Kapillargaschromatographie (GC)

5.7.1.1 Extraktion der Submerskulturen und Biokonzentrate (Transformation von α -Pinen)

Nach der Transformation wurde die Biofeuchtmasse vom Kulturüberstand durch Zentrifugation (4.000 U min⁻¹, 3.313 x g, 10 min, RT) abgetrennt. Anschließend wurde sowohl der Überstand als auch die separierte Biofeuchtmasse jeweils dreimal mit je 50 mL Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) extrahiert. Bei Emulsionsbildung wurde diese durch Zusatz von Natriumchlorid und/oder Ethanol gebrochen. Die organischen Phasen beider Extraktionen wurden vereint, über Nacht über Natriumsulfat getrocknet und anschließend an einer Vigreux-Kolonnen (Wasserbadtemperatur 42 °C) eingeeengt. Der erhaltene Gesamtextrakt wurde mit internem Standard (60 µg BHT) versetzt und gaschromatographisch untersucht (5.10.2.1, 5.10.2.3).

5.7.1.2 Extraktion der Lyophilisate (Transformation von α -Pinen)

Die Extraktion der lyophilisierten Kulturen (5.6.1.2) erfolgte analog zur Extraktion der Submerskulturen und Biokonzentrate (5.7.1.1). Jedoch wurde nur der separierte Überstand dreimal mit je 25 mL Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) extrahiert.

5.7.1.3 Extraktion der Blindwerte (Inkubation von α -Pinen)

Die Extraktion der Blindwerte (5.6.1.3) erfolgte analog zur Extraktion der Submerskulturen und Biokonzentrate (5.7.1.1) oder Lyophilisate (5.7.1.2). Auf die Zentrifugation wurde jedoch verzichtet.

5.7.1.4 Mikroextraktion der Lyophilisate

(Transformation von (+)-Valencen: Charakterisierung)

Die Mikroextraktion erfolgte direkt in dem für die Transformation (5.6.2) verwendeten Schraubdeckelgläschen. Der Ansatz wurde mit 100 μ L internem Standard (500 - 1500 mg L⁻¹ Thymol in Pentan/Diethylether, 1:1,12 v/v) und 2 mL Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) versetzt, 10 s gevortext, 5 min bei 150 U min⁻¹ horizontal und anschließend 3 min per Hand geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 4.000 U min⁻¹, 3.313 x g, 4 °C) wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch untersucht (5.10.2.2).

5.7.1.5 Mikroextraktion der Lyophilisate

(Transformation von (+)-Valencen: Optimierung)

Nach Ende der Transformation (5.6.3) wurden die Proben direkt in dem verwendeten 4 mL-Schraubdeckelgläschen mit 100 μ L internem Standard (750 mg L⁻¹ Thymol in Pentan/Diethylether, 1:1,12 v/v) und 2 mL Pentan/Diethylether (1:1,12; v/v) versetzt. Es wurde 30 s gevortext, 10 min bei 150 U min⁻¹ horizontal geschüttelt, die organische Phase nach Zentrifugation (10 min, 4.000 U min⁻¹, 3.313 x g, 4 °C) über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch untersucht (5.10.2.2).

5.7.2 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 13.000 U min⁻¹, 16.060 x g, 4 °C) und der Überstand in die FPLC (5.10.4) injiziert. Wenn nötig, wurde die Probe zusätzlich membranfiltriert (0,45 μ m Porengröße, 25 mm, PET, Carl Roth GmbH).

5.8 Enzymreinigung über mehrere chromatographische Stufen

5.8.1 Dreistufenreinigung mittels FPLC

Viermal 5 mL separierter Überstand aus Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.8) wurde jeweils in die FPLC injiziert und mit Hilfe des schwachen Anionenaustauschers DEAE FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.21). Die Fraktionen 09 - 24 der vier FPLC-Läufe wurden vereint (Reinigungsstufe 1, *DEAE-Pool*), mit 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert (Centricon Plus-70, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf 2,5 mL konzentriert (5.6.2.12). Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation (5.7.2) entfernt. 2,0 mL des umgepufferten *DEAE-Pools* wurden erneut in die FPLC injiziert und mittels des starken Kationenaustauschers SP Sepharose FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.23). Die Fraktionen 07 - 11 wurden vereint (Reinigungsstufe 2, *SP-FF-Pool*), mit 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert (Amicon

Ultra-15, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf 300 μ L konzentriert (5.6.2.12). 200 μ L des umgepufferten *SP-FF-Pools* wurden in die FPLC injiziert und durch Gelfiltration an einer Superdex-200-Säule getrennt (Reinigungsstufe 3, 5.10.4.2). Nach der letzten Reinigungsstufe wurden jeweils 0,5 mL der Fraktionen 08, 09 und 12 - 22 mit deaktiviertem Rückstand kombiniert (5.6.2.10) und nach Zugabe von 1 μ L (+)-Valencen für 20 h transformiert (5.6.2.3).

5.8.2 Dreistufenreinigung mittels FPLC für SDS-PAGE

Zweimal 40 mL separierter Überstand aus Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.8) wurde in die FPLC injiziert und mit Hilfe des schwachen Anionenaustauschers DEAE FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.22). Die Fraktionen 05 - 16 wurden jeweils vereint (*DEAE-Pool*), mit 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert (Centricon Plus-70, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf ca. 5,3 mL konzentriert (5.6.2.12). Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (5.7.2). Zweimal 5,0 mL des umgepufferten *DEAE-Pools* wurden in die FPLC injiziert und jeweils mit Hilfe des starken Kationenaustauschers SP Sepharose FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.23). Die Fraktionen 07 - 10 wurden vereint (*SP-FF-Pool*), mit 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert (Amicon Ultra-15, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf 275 μ L konzentriert (5.6.2.12). 200 μ L des umgepufferten *SP-FF-Pools* wurden in die FPLC injiziert und durch Gelfiltration an einer Superdex-200-Säule getrennt und Fraktionen á 1,0 mL gesammelt. Die Fraktionen 12 - 19 wurden mit E-Pure-Wasser umgepuffert und auf 80 μ L konzentriert. Diese Konzentrate wurden zur denaturierenden SDS-PAGE (5.11.1) mit anschließender Silberfärbung (5.11.4), zur nicht-denaturierenden SDS-PAGE (5.11.2) mit anschließender spezifischer Färbung für Häm-/Metallenzyme (5.11.5) und für die Sequenzierung ausgewählter Proteinbanden eingesetzt.

5.8.3 Dreistufenreinigung mittels FPLC für IEF

Zweimal 20 mL separierter Überstand aus Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (5.6.2.8) wurde in die FPLC injiziert und mit Hilfe des schwachen Anionenaustauschers DEAE FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.22). Die Fraktionen 05 - 16 beider Läufe wurden vereint (*DEAE-Pool*), mit 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert (Centricon Plus-70, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf 5,6 mL konzentriert (5.6.2.12). Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (5.7.2). 5,0 mL des umgepufferten *DEAE-Pools* wurden in die FPLC injiziert und mit Hilfe des starken Kationenaustauschers SP Sepharose FF getrennt (5.10.4.1, Tabelle 5.23). Die Fraktionen 07 - 10 wurden vereint (*SP-FF-Pool*), mit 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 umgepuffert (Amicon Ultra-15, Ausschlussgröße 10 kDa) und auf 305 μ L konzentriert (5.6.2.12). 200 μ L des umgepufferten *SP-FF-Pools* wurden in die FPLC injiziert, durch Gelfiltration an einer Superdex-200-Säule getrennt und Fraktionen á 1,0 mL gesammelt. Die Fraktionen 12 - 19 wurden mit E-Pure-Wasser umgepuffert und auf 100 μ L konzentriert. Diese Konzentrate wurden zur isoelektrischen Fokussierung mit anschließender Silberfärbung eingesetzt (5.12.2).

5.9 Weitere Methoden

5.9.1 UV/VIS-Spektroskopie

Tabelle 5.12: UV/VIS-Spektroskopie

Photometer	Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 12 mit temperiertem Küvettenhalter
Datenaufnahme	UV WinLab (Perkin Elmer), Version 2.0
Küvetten	Schichtdicke: 1 cm

5.9.2 Reduktion von Valencenhydroperoxiden

3 mg Natriumsulfid und 2 mg Natriumhydroxid wurden in 5 mL destilliertem Wasser gelöst und langsam unter stetigem Rühren im Eisbad mit 20 μL (+)-Valencen versetzt. Es wurde weitere 15 min gerührt, 1,5 mL der Reaktionslösung nach 5.7.1.4 extrahiert und zur gaschromatographischen Analyse (5.10.2.2) eingesetzt (modifiziert nach Moore *et al.* 1956).

5.9.3 Vakuumdestillation von (+)-Valencen

10 mL (+)-Valencen (Döhler, $\geq 70\%$) wurden mit Hilfe einer Destillationsbrücke (Ölbadtemperatur ca. 138 °C) unter Vakuum (13 mbar) gereinigt. Der Verlauf wurde verworfen, der Hauptlauf gesammelt und als Substrat zur Transformation eingesetzt (5.6.2.1).

5.9.4 Proteinpräzipitation

5.9.4.1 Präzipitation (1,5 mL separierter Überstand)

Zur Fällung der Enzyme wurde auf -20 °C gekühlter Ethanol verwendet. Je 1,5 mL des separierten PSA-Lyophilisatüberstands (5.6.2.8) wurden tropfenweise unter stetigem Vortexen mit einem definierten Volumen des kalten Lösungsmittels versetzt (Tabelle 5.13) und für 2 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (4.000 U min^{-1} , 3.313 x g, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 1,5 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 resuspendiert und nach 5.6.2.3 transformiert. Optional wurde die Suspension zusätzlich 15 min zentrifugiert (13.000 U min^{-1} , 16.060 x g, 4 °C), das Pellet verworfen und dann der klare Überstand zur Transformation (5.6.2.3) eingesetzt.

Tabelle 5.13: Ethanolfällung mit 1,5 mL Überstand

Endkonzentration EtOH / %	Volumen EtOH / mL	Endkonzentration EtOH / %	Volumen EtOH / mL
10	0,170	50	1,500
20	0,380	60	2,250
30	0,640	70	3,500
40	1,000	80	6,000

5.9.4.2 Präzipitation (15 mL separierter Überstand)

Zur Fällung der Proteine wurde auf -20 °C gekühlter Ethanol verwendet. 15 mL separierter Überstand (5.6.2.8) wurden mit je 22,5 mL Ethanol tropfenweise unter stetigem Vortexen auf eine Ethanolendkonzentration von 60% (v/v) eingestellt, 2 h bei -20 °C gelagert und anschließend 15 min zentrifugiert (27.900 U min^{-1} , 20.000 x g , 4 °C). Das Präzipitat wurde in 1,0 mL 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 suspendiert und erneut 15 min zentrifugiert (13.000 U min^{-1} , 16.060 x g , 4 °C). Der klare Überstand wurde zur SDS-PAGE (5.11.1) eingesetzt, und das Pellet wurde verworfen.

5.10 Chromatographie

5.10.1 Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (LC)

Die Reinigung des (+)-Valencen-Standards (Fluka, $\geq 90\%$) erfolgte durch Trennung nach Polarität an einer Kieselgelsäule (250 x 20 mm, Bettvolumen: 31 mL) bei Raumtemperatur. Kieselgel 60 wurde zuvor bei 150 °C für 24 h getrocknet, durch eine definierte Wasserzugabe von 4,0% (w/w) auf die Aktivitätsstufe I - II nach Brockmann eingestellt (Brockmann und Schodder 1941) und anschließend für 12 h durch kontinuierliche Rotation (Rotationsverdampfer, 5.3) homogenisiert. Nach Befüllen der Säule wurde mit Pentan equilibriert und 20 μL (+)-Valencen aufgegeben. Anschließend wurde (+)-Valencen mit 3 x 32 mL Pentan eluiert, das Eluat am Rotationsverdampfer eingengt und mittels GC-FID (5.10.2.2) untersucht.

5.10.2 Kapillargaschromatographie (HRGC)

Die Identifizierung der α -Pinentransformationsprodukte erfolgte mittels GC-FID und GC-MS auf polaren Trennsäulen (5.10.2.1, Tabelle 5.14 und 5.10.2.3). Die Quantifizierung wurde auf der polaren Trennsäule mittels GC-FID (5.10.2.1, Tabelle 5.14) durchgeführt. Die Quantifizierung von α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol mittels FID erfolgte anfangs nach On-Column-Injektion auf einer polaren Trennsäule (5.10.2.1, Tabelle 5.14) und später mit einem Kaltaufgabesystem und polarer Trennsäule (5.10.2.2).

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

Tabelle 5.14: GC-FID (on-column) mit polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Fisons Instruments GC 8000 Series
Injektor	cold on-column, 40 °C
Trennsäule	J&W Innowax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 μm Filmdicke
Detektor	FID, 250 °C ; Gase: H_2 : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trägergas	H_2 ; Vordruck: 50 kPa; Fluss: $2,0\text{ mL min}^{-1}$
Integrator	Carlo Erba Strumentazione EL 480
Datenaufnahme	ChromCard (CE Instruments), Version 1.21
Temperaturprogramme	α -Pinen: 40 °C (3 min), 3 °C min^{-1} - 240 °C (10 min) (+)-Valencen: 40 °C (2 min), 5 °C min^{-1} - 150 °C (0 min), 3 °C min^{-1} - 222 °C (0 min), 10 °C min^{-1} - 240 °C (10 min)

Tabelle 5.15: GC-FID (on-column) mit unpolarer Trennsäule

Gaschromatograph	Fisons Instruments GC 8000 Series
Injektor	cold on-column, 40 °C
Trennsäule	Varian WCOT Fused Silica CP SIL 8CB, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 350 °C; Gase: H ₂ : 50 kPa, Luft: 100 kPa
Trägergas	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluss: 2,0 mL min ⁻¹
Integrator	Fisons Instruments EL 980
Datenaufnahme	ChromCard (CE Instruments), Version 1.21
Temperaturprogramm	(+)-Valenzen: 40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 320 °C (10 min)

5.10.2.2 HRGC mit Kaltaufgabesystem und Flammenionisationsdetektor (FID)

Tabelle 5.16: GC-FID (KAS) mit polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Hewlett Packard HP 6890 Series GC Systems
Injektor	Gerstel KAS 4 + Gerstel Controller 505
KAS-Parameter	splitless (0,5 min); 60 °C (0 min), 12 °C s ⁻¹ - 240 °C (3 min)
KAS-Liner	Gerstel Glasverdampferrohr mit Verwirbelungseinstichen
Trennsäule	Varian WCOT Fused Silica CP Wax 52CB, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 250 °C Gase: H ₂ : 40 mL min ⁻¹ , Luft: 450 mL min ⁻¹ , N ₂ : 45 mL min ⁻¹
Trägergas	H ₂ , Vordruck: 58,4 kPa, Fluss: 1,5 ml min ⁻¹ (konstant)
Datenaufnahme	Hewlett Packard HP GC ChemStation, Version Rev. A.0504 [273]
Temperaturprogramm	40 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ - 150 °C (0 min), 3 °C min ⁻¹ - 222 °C (0 min), 10 °C min ⁻¹ - 240 °C (10 min)
Autosampler	Hewlett Packard HP 6890 Series Injector (Enhanced Parameters)

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

Tabelle 5.17: GC-MS mit polarer Säule

Gaschromatograph	Fisons Instruments GC 8000 Series
Injektor	cold on-column, 40 °C
Trennsäule	Phenomenex ZB-Wax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	Fisons Instruments MD 800
Trägergas	He, Vordruck: 50 kPa, Fluss: 1,8 mL min ⁻¹
Temperaturen	Ionenquelle: 200 °C, Interface: 230 °C, Quadrupol: 100 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation: 70 eV
Massenbereich	m/z 33 - 300
Datenaufnahme	Xcalibur (Thermo), Version 1.19
Temperaturprogramme	siehe GC-FID (5.10.2.1)

5.10.2.4 Berechnung der Kováts-Indizes

Die Kováts-Indizes wurden wie folgt berechnet:

$$KI = 100 \times z + 100 \frac{\lg t_{R'x} - \lg t_{R'z}}{\lg t_{R'+1} - \lg t_{R'z}} \quad [2]$$

- z = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert
- t_{R'x} = Netto-Retentionszeit des Analyten
- t_{R'z} = Netto-Retentionszeit des Alkans, das vor dem Analyten eluiert
- t_{R'z+1} = Netto-Retentionszeit des Alkans, das nach dem Analyten eluiert

Der Alkanreihenstandard enthielt alle homologen n-Alkane von C10 bis C25.

5.10.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Tabelle 5.18: HPLC-UV/VIS

Pumpe	Hewlett Packard Ti-Series 1050
UV/VIS-Detektor	Hewlett Packard Series 1050
Autosampler	Ti-Series 1050
Flussrate	1,5 mL min ⁻¹
Injektionsventil	20 µL Probenschleife
Säule	Macherey Nagel Nucleosil CC250/4,6 100-5 RP18 mit Vorsäule Macherey Nagel Nucleosil 8/4 100-5 RP18
Fließmittel	Methanol/Wasser (90/10 v/v) isokratisch

5.10.4 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Proben wurden nach 5.7.2 zur Injektion in die FPLC (Tabelle 5.19) vorbereitet. Die chromatographische Reinigung erfolgte bei 4 °C. Die verwendeten Puffer wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

Tabelle 5.19: FPLC mit UV-Detektor

FPLC-System	Biologic Duo Flow Chromatography System (Bio-Rad) mit Biologic Fraktionssammler Modell 2128 (Bio-Rad)
Datenaufnahme	Biologic Duo Flow Workstation (Bio-Rad), Version 3.00
Detektionswellenlänge	280 nm

5.10.4.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Tabelle 5.20: Enzymreinigung mittels DEAE, linearer Gradient; 2 mL Probenvolumen

Säule	HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, SE)
Säulenvolumen (CV)	20 mL
Startpuffer (A)	20 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer (B)	20 mM TRIS-HCl + 1,0 M NaCl, pH 7,5
Spülpuffer (C)	20 mM TRIS-HCl + 2,0 M NaCl, pH 7,5
Probenschleife	2,0 mL
Flussrate	3,0 mL min ⁻¹
Elutionsprogramm	0,25 CV 100% Puffer A Probeninjektion: 4 mL mit Puffer A 3 CV 100% Puffer A linearer Gradient über 3 CV: 0 - 100% Puffer B 2 CV 35% Puffer C 5 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

Tabelle 5.21: Enzymreinigung mittels DEAE, Stufengradient; $2 \text{ mL} \leq \text{Probenvolumen} \leq 5 \text{ mL}$

Säule	HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen (CV)	20 mL
Startpuffer (A)	20 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer (B)	20 mM TRIS-HCl + 0,2 M NaCl, pH 7,5
Spülpuffer (C)	20 mM TRIS-HCl + 2,0 M NaCl, pH 7,5
Probenschleife	2,0 mL oder 5,0 mL
Flussrate	$5,0 \text{ mL min}^{-1}$
Elutionsprogramm	2 CV 100% Puffer A Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Puffer A) 7 CV 100% Puffer A 6 CV 35% Puffer B 5 CV 100% Puffer B 4 CV 100% Puffer C 5 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

Tabelle 5.22: Enzymreinigung mittels DEAE, Stufengradient; $5 \text{ mL} < \text{Probenvolumen} \leq 40 \text{ mL}$

Säule	HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen (CV)	20 mL
Startpuffer (A)	20 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer (B)	20 mM TRIS-HCl + 0,2 M NaCl, pH 7,5
Spülpuffer (C)	20 mM TRIS-HCl + 2,0 M NaCl, pH 7,5
Flussrate	$5,0 \text{ mL min}^{-1}$
Elutionsprogramm	2 CV 100% Puffer A Probenaufnahme über Pumpe B (Port 4) Spülen: 1 x Probenvolumen (Port 4) mit Puffer A 7 CV 100% Puffer A 6 CV 35% Puffer B 5 CV 100% Puffer B 4 CV 100% Puffer C 5 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

Tabelle 5.23: Enzymreinigung mittels SP FF; $1 \text{ mL} \leq \text{Probenvolumen} \leq 5 \text{ mL}$

Säule	HiTrap SP Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen (CV)	1 mL
Startpuffer (A)	20 mM Natriumcitrat, pH 3,0
Elutionspuffer (B)	20 mM Natriumcitrat + 1,0 M NaCl, pH 3,0
Probenschleife	2,0 mL oder 5,0 mL
Flussrate	$1,0 \text{ mL min}^{-1}$
Elutionsprogramm	5 CV 100% Puffer A Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Puffer A) 10 CV 100% Puffer A Linearer Gradient von 100% Puffer A (0% Puffer B) auf 0% Puffer A (100% Puffer B) über 15 CV 5 CV 100% Puffer B 10 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

5.10.4.2 Gelfiltrationschromatographie (GF)

Tabelle 5.24: Enzymaufreinigung mittels Superdex 200

Säule	Superdex 200 10/300 GL (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen	ca. 20 mL
Trennbereich	10 - 600 kDa
Probenschleife	200 μ L
Flussrate	0,5 mL min ⁻¹
Laufpuffer	200 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionsprogramm	Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Laufpuffer) 1,5 CV 100% Laufpuffer
Fraktionsgröße	1,0 bzw. 2,0 mL

Kalibration der Gelfiltrationssäule

Die Kalibration der Gelfiltrationssäule wurde mit Hilfe von Standardproteinen zweier Gelfiltration-Kalibrationskits (High Molecular Weight und Low Molecular Weight, Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Logarithmus der Molekulargewichte wurde gegen die resultierenden K_{AV} -Werte aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5 verwendet. Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens wurde jedoch nicht der mitgelieferte Standard Blue Dextran 2000 herangezogen, da dieser Farbstoff unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig von der Säule eluierte. Stattdessen wurde die Retentionszeit des Dimers von Thyroglobulin (1.338 kDa) als Ausschlussvolumen definiert. Es wurden folgende Standards zur Kalibration eingesetzt: Ribonuclease A (13,7 kDa), Chymotrypsinogen A (25,0 kDa), Ovalbumin (43,0 kDa), Albumin (67,0 kDa), Aldolase (158,0 kDa), Catalase (232,0 kDa), Ferritin (440,0 kDa), Thyroglobulin (669,0 kDa).

5.11 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

5.11.1 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Für die PAGE wurde ein Mini-Twin-System (Biometra) verwendet. Zur Herstellung 12%iger SDS-Trenngele (Tabelle 5.28) wurden folgende wässrige (E-Pure) Lösungen verwendet (Tabelle 5.25 - Tabelle 5.27) (modifiziert nach Laemmli 1970):

Tabelle 5.25: Zusammensetzung der Stammlösungen

<i>Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS)</i>	
APS	400 g L ⁻¹
Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert	
<i>Lower-TRIS, 4x</i>	
TRIS-Base	181,7 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹
eingestellt auf	pH 8,8

<i>Upper-TRIS, 4x</i>	
TRIS-Base	60,55 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹
eingestellt auf	pH 6,8

Tabelle 5.26: Zusammensetzung des Auftragspuffers

TRIS-HCl, pH 6,8	0,1 M
DTT	0,2 M
SDS	40 g L ⁻¹
Bromphenolblau	2 g L ⁻¹
Glycerol	200 g L ⁻¹
Der Puffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert	

Tabelle 5.27: Zusammensetzung des Laufpuffers, 10x

TRIS-Base	30,3 g L ⁻¹
Glycin	144,0 g L ⁻¹
SDS	10,0 g L ⁻¹

Tabelle 5.28: Pipettierschema zur Herstellung der 12%igen SDS-Gele (3 Gele)

<i>Trenngel (12%ig)</i>	
E-Pure-Wasser	5,340 mL
Lower-TRIS	4,500 mL
Acrylamid (40% w/v) in H ₂ O	5,260 mL
Bisacrylamid (2% w/v) in H ₂ O	2,805 mL
APS	45,0 µL
TEMED	22,5 µL
<i>Sammelgel (6%ig)</i>	
E-Pure-Wasser	2,367 mL
Upper-TRIS	1,125 mL
Acrylamid (40% w/v) in H ₂ O	657 µL
Bisacrylamid (2% w/v) in H ₂ O	351 µL
APS	22,5 µL
TEMED	9,0 µL

Durchführung:

Für die denaturierende PAGE wurden 30 µL Probe mit 24 µL Auftragspuffer (Tabelle 5.26) versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 6 µL 1 M DTT-Lösung versetzt. Bis zur PAGE wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Zur Elektrophorese wurde das entsprechende Probenvolumen direkt auf das Sammelgel gegeben. Bis die Proben in das Trenngel übergetreten waren, betrug die Stromstärke pro Gel 10 mA (konstant), dann wurde die Stromstärke auf 20 mA (konstant) pro Gel bis zum Ende der Elektrophorese erhöht. Der Standard (Precision Plus Protein Unstained Standard, Bio-Rad, München) enthielt Proteine der Molekulargewichte: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 und 10 kDa.

5.11.2 SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Zur SDS-PAGE wurden die Lösungen nach 5.11.1 verwendet. Jedoch wurde die Zusammensetzung des Auftragspuffers (Tabelle 5.29) modifiziert.

Tabelle 5.29: Zusammensetzung des Auftragspuffers

TRIS-HCl, pH 6,8	0,1 M
SDS	20 g L ⁻¹
Bromphenolblau	2 g L ⁻¹
Glycerol	200 g L ⁻¹
Der Puffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert	

Durchführung:

Zur Vorbereitung der Probe wurde ein definiertes Volumen mit dem gleichen Volumen an Auftragspuffer (Tabelle 5.29) versetzt und anschließend direkt zur Elektrophorese eingesetzt. Das verwendete SDS-Gel (5.11.1, Tabelle 5.28) wurde über Nacht bei 1 mA (konstant) konditioniert und die Proteine anschließend mit einer Stromstärke von 10 mA (konstant) während der gesamten SDS-PAGE getrennt. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Standard (Precision Plus Protein Prestained Standard, Bio-Rad) enthielt Proteine der Molekulargewichte: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 und 10 kDa.

5.11.3 Coomassiefärbung

Für die Färbung mit Coomassie[®] Brillantblau R 250 wurden folgende wässrigen (E-Pure) Lösungen verwendet:

Tabelle 5.30: Lösungen für die Färbung mit Coomassie[®] R

<i>Färbelösung</i>	
Ethanol	40%
Essigsäure (99,5%)	10%
Coomassie [®] Brillantblau R 250	1 g L ⁻¹
<i>Entfärbelösung</i>	
Ethanol	25%
Eisessig	8%

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel für 1 h unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (Tabelle 5.30) inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal mit E-Pure-Wasser gewaschen und der Hintergrund durch Inkubieren in der Entfärbelösung bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Proteinbanden aufgehellt und dokumentiert.

5.11.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung (modifiziert nach Blum *et al.* 1987) wurden folgende wässrigen (E-Pure) Lösungen verwendet:

Tabelle 5.31: Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung

Lösung I	Methanol	50%
	Essigsäure (99,5%)	12%
	Formaldehyd (37%)	0,5 mL L ⁻¹
Lösung II	Ethanol	30%
Lösung III	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	0,2 g L ⁻¹
Lösung IV	AgNO ₃	2 g L ⁻¹
	Formaldehyd (37%)	0,75 mL L ⁻¹
Lösung V	Na ₂ CO ₃	60 g L ⁻¹
	Formaldehyd (37%)	0,5 mL L ⁻¹
	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	10 mg L ⁻¹
Lösung VI	Methanol	10%
	Eisessig	12%

Die Lösungen III-V wurden jeweils kurz vor der Verwendung hergestellt.

Durchführung:

1. SDS-Gel 20 min in Lösung I fixieren
2. Zweimal 10 min in Lösung II waschen
3. SDS-Gel 1 min in Lösung III inkubieren
4. Dreimal je 20 s in E-Pure-Wasser waschen
5. SDS-Gel 20 min in Lösung IV inkubieren
6. Zweimal 20 s in E-Pure-Wasser waschen
7. Entwicklung des SDS-Gels in Lösung V, bis der gewünschte Färbegrad der Proteinbanden erreicht ist
8. Durch Inkubation in Lösung VI für 10 min Färbung abbrechen
9. Mit E-Pure-Wasser zweimal 5 min waschen
10. Gefärbtes SDS-Gel dokumentieren

5.11.5 Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung)

Die Hämfärbung (modifiziert nach Thomas *et al.* 1976 und Henne *et al.* 2001) wurde nur nach SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt (5.11.2). Für die Hämfärbung wurden folgende Lösungen verwendet:

Tabelle 5.32: Zusammensetzung der Lösungen für die Hämfärbung

Lösung I	6,3 mM methanolische TMBZ-Lösung
Lösung II	0,25 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0
Lösung III (Färbelösung)	Lösung I/Lösung II (3/7 v/v)
Lösung IV (Lagerlösung)	Lösung II/Isopropanol (7/3 v/v)

Lösung I und III wurden jeweils kurz vor der Verwendung hergestellt.

Durchführung:

1. SDS-Gel 45 min - 1 h in Lösung III im Dunkeln inkubieren
2. H₂O₂ (30%ig) bis zur Endkonzentration von 30 mM zugeben und für 1 min inkubieren
3. Dreimal je 20 s in E-Pure-Wasser waschen
4. Gefärbtes SDS-Gel dokumentieren
5. Ggf. SDS-Gel in Lösung IV lagern

5.12 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Tabelle 5.33: Isoelektrische Fokussierung

Flachgel-Elektrophoresekammer	Multiphor II (Pharmacia LKB, Freiburg)
Spannungsquelle	Multi Drive XL (Pharmacia LKB)
Umlaufkühler	Thermomix [®] BU + Frigomix [®] U-2 (B. Braun, Melsungen)

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden Polyacrylamidgele (Servalyt[®] Precotes[®] 3 - 6, 125 mm x 125 mm x 300 µm) mit einem immobilisierten pH-Gradienten (pH 3 - 6) der Firma Serva (Heidelberg) verwendet. Die Vorbereitung der Gele wurde gemäß der Herstelleranweisung durchgeführt.

Durchführung:

Die Proben wurden, wenn eine Salzkonzentration > 50 mM erwartet wurde, mittels Ultrafiltrationseinheiten entsalzt (5.6.2.12). Das Volumen der Proben betrug 10 µL. Das Auftragsvolumen des Standards (Low range pl, Amersham Biosciences) betrug 2 µL. Elektrophoresebedingungen (pro Gel): 2000 V, 6 mA, 12 W, 3500 Vh.

5.12.1 Coomassiefärbung

Die Färbung der Gele nach isoelektrischer Fokussierung mit Coomassie G erfolgte analog zur Färbung von SDS-Gelen (5.11.3), jedoch wurde für die Färbelösung Coomassie[®] Brillantblau G 250 verwendet.

5.12.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung der IEF-Gele erfolgte nach 5.11.4.

5.12.3 Aktivitätsfärbung für Laccasen

Nach isoelektrischer Fokussierung wurden die Polyacrylamidgele in a) 5 mM ABTS-Lösung (in 100 mM Natriumtartratpuffer, pH 4,5) in Gegenwart von 0,2 mM H₂O₂ und b) 6 mM DMOP-Lösung (in 100 mM Natriumtartratpuffer, pH 4,5) bis zur deutlich eintretenden Färbung inkubiert. ABTS-Lösung färbt sowohl Laccasen als auch Peroxidasen an, DMOP-Lösung hingegen nur Laccasen .

5.13 Entsorgungshinweise

5.13.1 Biologisches Material

Durch Autoklavieren (121 °C, 40 min) wurden sämtliche Kulturen und Kulturreste vor der Entsorgung sterilisiert. Das Medium wurde filtriert und in das Laborabwasser gegeben. Feste Bestandteile wurden in den Laborabfall überführt.

5.13.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Durch die verwendeten Aufbereitungsverfahren (Mikroextraktion) sowie durch die, wenn möglich, destillative Reinigung und Wiederverwendung von Lösungsmitteln wurde der Verbrauch auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenerter Lösungsmittel konnte vollständig verzichtet werden. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden nach folgenden Gruppen getrennt gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel

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

6 Literaturverzeichnis

Ali, S.; Ikram-UI-Haq; Qadeer, M. A.; Iqbal, J. (2002) Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor, *Electron J Biotechnol* **5**, 65–78.

Andersen, N. H. (1970) Biogenetic implications of the antipodal sesquiterpenes of vetiver oil, *Phytochemistry* **9**, 145–151.

Andrews, R. E.; Parks, L. W.; Spence, K. D. (1980) Some Effects of Douglas Fir Terpenes on Certain Microorganisms, *Appl Environ Microbiol* **40**, 301–304.

Aromenverordnung: Bekanntmachung der Neufassung der Aromenverordnung vom 02. Mai 2006, BGBl I Nr. 23 vom 15. Mai 2006, 1127–1137.

Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. (2001) Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses. Weinheim, Wiley-VCH.

Bell, S. G.; Chen, X.; Sowden, R. J.; Xu, F.; Williams, J. N.; Wong, L.-L.; Rao, Z. (2003) Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450_{cam}, *J Am Chem Soc* **125**, 705–714.

Bell, S. G.; Sowden, R. J.; Wong, L.-L. (2001) Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450_{cam} for monoterpene oxidation, *Chem Commun (Camb)*, 635–636.

Berger, R. G.; Bont, J. A. M. de; Eggink, G.; Fonseca, M. M. da; Gehrke, M.; Gros, J.-B.; Keulen, F. van; Krings, U.; Larroche, C.; Leak, D. J.; Werf, M. J. van der (1999) Biotransformations in the flavour industry, In: Swift, K. A. D. (Hg.) Current Topics in Flavours and Fragrances. Towards a New Millennium of Discovery. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 139–170.

Berger, R. G.; Latza, E.; Neuser, F.; Onken, J. (2000) Terpenes and amino acids as progenitors of volatile flavours in microbial transformation reactions, In: Schieberle, P.; Engel, K.-H. (Hg.) Frontiers of flavour science. The proceedings of the Ninth Weurman Flavour Research Symposium, held in Freising, Germany on 22 - 25 June 1999. Garching, Dt. Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 394–399.

Bhattacharyya, P. K.; Prema, B. R.; Kulkarni, B. D.; Pradhan, S. K. (1960) Microbiological transformation of terpenes: hydroxylation of α -pinene, *Nature* **187**, 689–690.

Bhosale, S. H.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V. (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase, *Microbiol Rev* **60**, 280–300.

Bielig, H. J.; Askar, A.; Treptow, P. (1972) Aromaveränderungen in Orangensaft, *Dtsch Lebensmitt Rundsch* **68**, 173–175.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8**, 93–99.

Bouws, H. (2007) Dissertation in Vorbereitung, Leibniz Universität Hannover.

Bowers, N. I.; Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Goodrich, P. A.; Grocock, M. R.; Blacker, A. J.; Goode, P.; Dalton, H. (1999) Stereoselective benzylic hydroxylation of 2-substituted indanes using toluene dioxygenase as biocatalyst, *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **11**, 1453–1462.

Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Bowers, N. I.; Boyle, R.; Harrison, J. S.; Lee, K.; Bugg, T. D.; Gibson, D. T. (2003) Stereochemical and mechanistic aspects of dioxygenase-catalysed benzylic hydroxylation of indene and chromane substrates, *Org Biomol Chem* **1**, 1298–1307.

Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Bowers, N. I.; Dalton, H.; Garrett, M. D.; Harrison, J. S.; Sheldrake, G. N. (2006) Dioxygenase-catalysed oxidation of disubstituted benzene substrates: benzylic monohydroxylation versus aryl *cis*-dihydroxylation and the *meta* effect, *Org Biomol Chem* **4**, 3343–3349.

Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J Biol Chem* **274**, 23679–23682.

Brink, H. (J.) M. van den; Gorcom, R. F. M. van; Hondel, C. A. M. J. J. van den; Punt, P. J. (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi, *Fungal Genet Biol* **23**, 1–17.

Brockmann, H.; Schodder, H. (1941) Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption, *Ber Dtsch Chem Ges* **74B**, 73–78.

Brown, L. M.; Springer, J.; Bower, M. (1992) Chemical Substitution for 1,1,1-Trichloroethane and Methanol in an Industrial Cleaning Operation, *J Hazard Mater* **29**, 179–188.

Busmann, D.; Berger, R. G. (1994) Oxyfunctionalization of α - and β -pinene by selected basidiomycetes, *Z Naturforsch [C]* **49**, 545–552.

Call, H. P.; Mucke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process), *J Biotechnol* **53**, 163–202.

Carvalho, C. C. C. R. de; Fonseca, M. M. R. da (2006) Biotransformation of terpenes, *Biotechnol Adv* **24**, 134–142.

Choi, W. J.; Lee, E. Y.; Cho, M. H.; Choi, C. Y. (1997) Enhanced production of *cis,cis*-muconate in a cell-recycle bioreactor, *J Ferment Bioeng* **84**, 70–76.

Christopher, J.; Pistorius, E.; Axelrod, B. (1970) Isolation of an isozyme of soybean lipoxygenase, *Biochim Biophys Acta* **198**, 12–19.

Chung, T. Y.; Eiserich, J. P.; Shibamoto, T. (1993) Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi, *J Agric Food Chem* **41**, 1693–1697.

Corey, E. J.; Nagata, R. (1987) Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase, *J Am Chem Soc* **109**, 8107–8108.

Croteau, R.; Satterwhite, D. M.; Wheeler, C. J.; Felton, N. M. (1989) Biosynthesis of monoterpenes, *J Biol Chem* **264**, 2075–2080.

- Crowell, P. L. (1999) Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes, *J Nutr* **129**, 775S–778S.
- Dastur, K. P. (1973) A stereoselective approach to eremophilane sesquiterpenes. A synthesis of (\pm)-nootkatone, *J Am Chem Soc* **95**, 6509–6510.
- Davies, A. G.; Davison, I. G. E. (1989) The rearrangements of allylic hydroperoxides derived from (+)-valencene, *J Chem Soc Perkin Trans II* **7**, 825–830.
- DeLumen, B. O.; Kazeniac, S. J. (1976) Staining for lipoxygenase activity in electrophoretic gels, *Anal Biochem* **72**, 428–432.
- Dewick, P. M. (2002) The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds, *Nat Prod Rep* **19**, 181–222.
- Dhavlkar, R. S.; Albroscheit, G. (1973) Mikrobiologische Umsetzung von Terpenen: Valencen, *Dragoco Rep* **12**, 251–258.
- Doyle, W. A.; Blodig, W.; Veitch, N. C.; Piontek, K.; Smith, A. T. (1998) Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* **37**, 15097–15105.
- Draczynska-Lusiak, B.; Siewinski, A. (1989) Enantioselectivity of the metabolism of some monoterpenic components of coniferous tree resin by *Armillariella mellea* (honey fungus), *J Basic Microbiol* **29**, 269–275.
- Drawert, F.; Berger, R. G.; Godelmann, R. (1984) Regioselective biotransformation of valencene in cell suspension cultures of *Citrus* sp., *Plant Cell Rep* **3**, 37–40.
- Dyk, M. S. van; Rensburg, E. van; Moleleki, N. (1998) Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp., *Biotechnol Lett* **20**, 431–436.
- Erdélyi, B.; Szabó, A.; Seres, G.; Birincsik, L.; Ivanics, J.; Szatzker, G.; Poppe, L. (2006) Stereoselective production of (S)-1-aryl- and 1-arylethanol by freshly harvested and lyophilized yeast cells, *Tetrahedron Asymmetry* **17**, 268–274.
- Erdtman, H.; Hirose, Y. (1962) The Chemistry of the Natural Order Cupressales, *Acta Chem Scand* **16**, 1311–1314.
- Faber, K. (2000) Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. Berlin, Springer.
- Farooq, A.; Tahara, S.; Choudhary, M. I.; Atta-ur-Rahman; Ahmed, Z.; Husnu, C. B.; Demirci, F. (2002) Biotransformation of (-) α -pinene by *Botrytis cinerea*, *Z Naturforsch [C]* **57**, 303–306.
- Fichan, I.; Larroche, C.; Gros, J. B. (1999) Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids, *J Chem Eng Data* **44**, 56–62.
- Fisher, C.; Scott, T. R. (1997) Food Flavours: Biology and Chemistry. Cambridge, Royal Society of Chemistry, Information Services.

- Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I. (2003) Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy, *J Agric Food Chem* **51**, 1382–1386.
- Furusawa, M.; Hashimoto, T.; Noma, Y.; Asakawa, Y. (2005) Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene, by biotransformation, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **53**, 1513–1514.
- Gandolfi, R.; Converti, A.; Pirozzi, D.; Molinari, F. (2001) Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*, *J Biotechnol* **92**, 21–26.
- Goodhew, C. F.; Brown, K. R.; Pettigrew, G. W. (1986) Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes, *Biochim Biophys Acta* **852**, 288–294.
- Gordon, M. H. (2003) The development of oxidative rancidity in foods, In: Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (Hg.) Antioxidants in food. Practical applications. Cambridge, Woodhead Publishing, 7–20.
- Graham, D. C.; Steinkraus, K. H.; Hackler, L. R. (1976) Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media, *Appl Environ Microbiol* **32**, 381–387.
- Griffiths, E. T.; Bociek, S. M.; Harries, P. C.; Jeffcoat, R.; Sissons, D. J.; Trudgill, P. W. (1987) Bacterial metabolism of α -pinene: pathway from α -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P18.3, *J Bacteriol* **169**, 4972–4979.
- Guenther, A.; Hewitt, C. N.; Erickson, D.; Fall, R.; Geron, C.; Graedel, T.; Harley, P.; Klinger, L.; Lerdau, M.; McKay, W. A.; Pierce, T.; Scholes B.; Steinbrecher, R.; Tallamraju, R.; Taylor, J.; Zimmerman, P. (1995) A global model of natural volatile organic compound emissions, *J Geophys Res* **100**, 8873–8892.
- Guo, L.-Q.; Lin, J.-Y.; Lin, J.-F. (2007) Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China, *Food Chem* **100**, 643–649.
- Hänning, J. (2006) Enzymatische Oxidation von Terpenkohlenwasserstoffen zu Aromastoffen, Diplomarbeit, Fachhochschule Hannover-Ahlem.
- Hardebusch, B. (2006) Terpenbiotransformation durch Enzyme aus Basidio- und Ascomyceten, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Haring, H. G.; Rijkens, F.; Boelens, H.; Gen, A. van der (1972) Olfactory Studies on Enantiomeric Eremophilane Sesquiterpenoids, *J Agric Food Chem* **20**, 1018–1021.
- Henne, K. R.; Kunze, K. L.; Zheng, Y.-M.; Christmas, P.; Soberman, R. J.; Rettie, A. E. (2001) Covalent Linkage of Prosthetic Heme to CYP4 Family P450 Enzymes, *Biochemistry* **40**, 12925–12931.
- Henningsen, R.; Gale, B. L.; Straub, K. M.; DeNagel, D. C. (2002) Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics* **2**, 1479–1488.

- Huang, R.; Christenson, P. A.; Labuda, I. M. (2001) Process for the preparation of nootkatone by laccase catalysis, *Patent US 6200786*.
- Hummel, W.; Kula, M.-R. (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds, *Eur J Biochem* **184**, 1–13.
- Hunter, G. L. K.; Brogden, W. B., Jr. (1965a) Analysis of the terpenes and sesquiterpenes in some citrus oils, *J Food Sci* **30**, 383–387.
- Hunter, G. L. K.; Brogden, W. B., Jr. (1965b) Conversion of Valencene to Nootkatone, *J Food Sci* **30**, 876–878.
- Johns, E. B. (1973) Lipoxygenase mediated pentane production, Thesis (Ph. D.), North Carolina State University at Raleigh.
- Joseph, P.; Srinivasan, S. N.; Kulkarni, A. P. (1993) Purification and partial characterization of lipoxygenase with dual catalytic activities from human term placenta, *Biochem J* **293**, 83–91.
- Kaspera, R. (2004) Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Kaspera, R.; Krings, U.; Nanzad, T.; Berger, R. G. (2005) Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*, *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 477–483.
- Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase, *Structure* **6**, 571–586.
- Kelsey, R. G.; Hennon, P. E.; Huso, M.; Karchesy, J. J. (2005) Changes in heartwood chemistry of dead yellow-cedar trees that remain standing for 80 years or more in southeast Alaska, *J Chem Ecol* **31**, 2653–2670.
- Kemal, C.; Louis-Flamberg, P.; Krupinski-Olsen, R.; Shorter, A. L. (1987) Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity, *Biochemistry* **26**, 7064–7072.
- Keulen, F. van; Correia, C. N.; Fonseca, M. M. R. da (1998) Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*, *J Mol Catal B-Enzym* **5**, 295–299.
- Kim, T. H.; Kubica, G. P. (1973) Preservation of mycobacteria: 100% viability of suspensions stored at -70 C, *Appl Environ Microbiol* **25**, 956–960.
- Kirk, T. K.; Nakatsubo, F.; Reid, I. D. (1983) Further study discounts role for singlet oxygen in fungal degradation of lignin model compounds, *Biochem Biophys Res Commun* **111**, 200–204.
- Kosjek, B.; Stampfer, W.; Deursen, R. van; Faber, K.; Kroutil, W. (2003) Efficient production of raspberry ketone via 'green' biocatalytic oxidation, *Tetrahedron* **59**, 9517–9521.

- Kraft, P.; Bajgrowicz, J. A.; Denis, C.; Fráter, G. (2000) Allerlei Trends: die neuesten Entwicklungen in der Riechstoffchemie, *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger* **112**, 3106–3138.
- Kraker, J.-W. de; Schurink, M.; Franssen, M. C. R.; König, W. A.; Groot, A. de; Bouwmeester, H. J. (2003) Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots, *Tetrahedron* **59**, 409–418.
- Kramer, H. E. A.; Maute, A. (1973) Sensitized Photooxygenation: Change from type I (radical) to type II (singlet oxygen) mechanism, *Photochem Photobiol* **17**, 413–423.
- Kuraishi, C.; Yamazaki, K.; Susa, Y. (2001) Transglutaminase: Its utilization in the food industry, *Food Reviews International* **17**, 221–246.
- Kuribayashi, T.; Kaise, H.; Uno, C.; Hara, T.; Hayakawa, T.; Joh, T. (2002) Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*, *J Agric Food Chem* **50**, 1247–1253.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685.
- Langrand, G.; Triantaphylides, C.; Baratti, J. (1988) Lipase catalyzed formation of flavour esters, *Biotechnol Lett* **10**, 549–554.
- Latza, E. (1999) Biotechnologie von Aromastoffen: Transformation von α -Pinen mit *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 und Trennverfahren mit Zeolithen, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Lee, S.-J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee, K.-G. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chem* **91**, 131–137.
- Lee, T. H.; Aoki, H.; Sugano, Y.; Shoda, M. (2000) Effect of molasses on the production and activity of dye-decolorizing peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec1, *J Biosci Bioeng* **89**, 545–549.
- Li, D.-C.; Lui, Z.-W.; Lu, J. (2001) Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Mycol Res* **105**, 190–194.
- Lindberg, A.-M.; Hansson, L. (1991) Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources, *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 26–28.
- Lindmark-Henriksson, M.; Isaksson, D.; Sjödin, K.; Högberg, H.-E.; Vaněk, T.; Valterová, I. (2003) Transformation of α -pinene Using *Picea abies* Suspension Culture, *J Nat Prod* **66**, 337–343.
- Lindmark-Henriksson, M.; Isaksson, D.; Vaněk, T.; Valterová, I.; Högberg, H.-E.; Sjödin, K. (2004) Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture, *J Biotechnol* **107**, 173–184.

- Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R. G. (2007) Laccase isolation by foam fractionation-New prospects of an old process, *Enzyme Microb Technol* **40**, 273–277.
- Lottspeich, F.; Engels, J. W. (2006) Bioanalytik. München, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- Luckner, M. (1990) Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals. Berlin, Springer.
- Lynen, F. (1967) Biosynthetic pathways from acetate to natural products, *Pure Appl Chem* **14**, 137–167.
- MacLafferty, F. W.; Tureček, F. (1995) Interpretation von Massenspektren. Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.
- MacLeod, W. D., Jr.; Buiges, N. (1964) Sesquiterpenes. I. Nootkatone, A New Grapefruit Flavor Constituent, *J Food Sci* **29**, 565–568.
- Majetich, G.; Behnke, M.; Hull, K. (1985) A Stereoselective Synthesis of (±)-Nootkatone and (±)-Valencene via an Intramolecular Sakurai Reaction, *J Org Chem* **50**, 3615–3618.
- Mangone, C. P.; N.Pereyra, E.; Argimón, S.; Moreno, S.; Baldessari, A. (2002) Chemo- and stereoselective reduction of β -keto esters by spores and various morphological forms of *Mucor rouxii*, *Enzyme Microb Technol* **30**, 596–601.
- Mao, L.; Henderson, G.; Bourgeois, W. J.; Vaughn, J. A.; Laine, R. A. (2006) Vetiver oil and nootkatone effects on the growth of pea and citrus, *Ind Crops Prod* **23**, 327–332.
- Marshall, J. A.; Ruden, R. A. (1971) The stereoselective total synthesis of racemic nootkatone, *J Org Chem* **36**, 594–596.
- Masaphy, S.; Henis, Y.; Levanon, D. (1996) Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity, *Appl Environ Microbiol* **62**, 3587–3593.
- Matsuda, Y.; Satoh, T.; Beppu, T.; Arima, K. (1976) Purification and properties of Co^{2+} requiring heme protein having lipoxygenase activity from *Fusarium oxysporum*, *Agric. Biol. Chem.* **40**, 963–976.
- McGarvey, D. J.; Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism, *Plant Cell* **7**, 1015–1026.
- Miller, D. J.; Nicholas, D. J. (1984) 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/ H_2O_2 staining is not specific for heme proteins separated by gel electrophoresis, *Anal Biochem* **140**, 577–580.
- Miller, D. J.; Wood, P. M. (1983) The Soluble Cytochrome Oxidase of *Nitrosomonas europaea*, *J Gen Microbiol* **129**, 1645–1650.
- Miyazawa, M.; Tougo, H.; Ishihara, M. (2001) Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*, *Nat Prod Lett* **15**, 205–210.

- Miyazawa, M.; Watanabe, H.; Kameoka, H. (1997) Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a *p*-Menthane Skeleton, *J Agric Food Chem* **45**, 677–679.
- Molinari, F.; Gandolfi, R.; Converti, A.; Zilli, M. (2000) Mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*: An efficient catalyst for acetylation in organic solvent, *Enzyme Microb Technol* **27**, 626–630.
- Moore, R. N.; Golumbic, C.; Fisher, G. S. (1956) Autoxidation of α -Pinene, *J Am Chem Soc* **78**, 1173–1176.
- Moshonas, M. G.; Shaw, P. E. (1979) Composition of Essence Oil from Overripe Oranges, *J Agric Food Chem* **27**, 1337–1339.
- Muller, B.; Dean, C.; Schmidt, C.; Kuhn, J.-C. (1998) Process for the Preparation of Nootkatone, *Patent* US 5847226.
- Nakano, R.; Konami, H.; Sato, H.; Ito, O.; Shimizu, T. (1995) Marked detergents effects on safranine T-mediated photo-induced electron transfer in cytochrome *P*-450 1A2, *Biochim Biophys Acta* **1252**, 245–250.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, W. H. Freeman and Company.
- Njoroge, S. M.; Mungai, H. N.; Koaze, H.; Phi, N. T. L.; Sawamura, M. (2006) Volatile constituents of mandarin (*Citrus reticulata* blanco) peel oil from Burundi, *J Essent Oil Res* **18**, 659–662.
- O'Connor, T. P.; O'Brien, N. M. (1991) Significance of lipoxygenase in fruits and vegetables, In: Fox, P. F. (Hg.) *Food enzymology*, 1. New York, Elsevier Applied Science, 337–372.
- Oddou, J.; Stentelaire, C.; Lesage-Meessen, L.; Asther, M.; Colonna Ceccaldi, B. (1999) Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high- density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*, *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 1–6.
- Ohloff, G. (1971) Präparative Möglichkeiten mit Singulett-sauerstoff, *Nachr Chem Techn* **24**, 446–448.
- Ohloff, G. (1994) *Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives*. Berlin, Springer.
- Okuda, M.; Sonohara, H.; Takigawa, H.; Tajima, K.; Ito, S. (1994) Nootkatone manufacture with *Rhodococcus* from valencen, *Patent* JP 06303967A.
- Onken, J. (1998) *Biotechnologie lipophiler Substrate in wässrigen Systemen: Terpenttransformationen durch Basidiomyceten als Modell*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Onken, J.; Berger, R. G. (1999) Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor, *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 158–163.

- Ortuño, A.; García-Puig, D.; Fuster, M. D.; Pérez, M. L.; Sabater, F.; Porras, I.; García-Lidón, A.; Río, J. A. del (1995) Flavanone and Nootkatone Levels in Different Varieties of Grapefruit and Pummelo, *J Agric Food Chem* **43**, 1–5.
- Oviedo, C.; Contreras, D.; Freer, J.; Rodríguez, J. (2003) A screening method for detecting iron reducing wood-rot fungi, *Biotechnol Lett* **25**, 891–893.
- Pearson, W. R.; Wood, T.; Zhang, Z.; Miller, W. (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences, *Genomics* **46**, 24–36.
- Pérez-Gilabert, M.; Sánchez-Felipe, I.; Morte, A.; García-Carmona, F. (2005b) Kinetic properties of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps: Effect of inhibitors and activators, *J Agric Food Chem* **53**, 6140–6145.
- Pérez-Gilabert, M.; Sánchez-Felipe, I.; García-Carmona, F. (2005a) Purification and partial characterization of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps, *J Agric Food Chem* **53**, 3666–3671.
- Pesaro, M.; Bozzato, G.; Schudel, P. (1968) Total synthesis of racemic Nootkatone, *Chem Commun (Camb)*, 1152–1154.
- Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, *J Biol Chem* **277**, 37663–37669.
- Prema, B. R.; Bhattacharyya, P. K. (1962) Microbiological Transformation of Terpenes: II. Transformation of α -Pinene, *Appl Microbiol* **10**, 524–528.
- Prigge, S. T.; Boyington, J. C.; Faig, M.; Doctor, K. S.; Gaffney, B. J.; Amzel, L. M. (1997) Structure and mechanism of lipoxygenases, *Biochimie* **79**, 629–636.
- Ranke, H. (2006) Das Gilgamesch-Epos: Der älteste überlieferte Mythos der Geschichte. Wiesbaden, Marixverlag.
- Rao, S. C. V.; Rao, R.; Agrawal, R. (2003) Enhanced production of verbenol, a highly valued food flavourant, by an intergeneric fusant strain of *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum*, *Biotechnol Appl Biochem* **37**, 145–147.
- Resnick, S. M.; Lee, K.; Gibson, D. T. (1996) Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816, *J Ind Microbiol Biotechnol* **17**, 438–457.
- Rinne, S. (2007) Dissertation in Vorbereitung, Leibniz Universität Hannover.
- Río, J. A. del; Ortuño, A.; Puig, D. G.; Iborra, J. L.; Sabater, F. (1991) Accumulation of the sesquiterpenes nootkatone and valencene by callus cultures of *Citrus paradisi*, *Citrus limonia* and *Citrus aurantium*, *Plant Cell Rep* **10**, 410–413.

- Río, J. A. del; Ortuño, A.; García-Puig, D.; Porrás, I.; García-Lidón, A.; Sabater, F. (1992) Variations of nootkatone and valencene levels during the development of grapefruit, *J Agric Food Chem* **40**, 1488–1490.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, *Nat Prod Rep* **16**, 565–574.
- Romano, D.; Ferrario, V.; Molinari, F.; Gardossi, L.; Montero, J. M. S.; Torre, P.; Converti, A. (2006) Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-*O*-isopropylidene-glycerol by esterification with dry mycelia of moulds, *J Mol Catal B-Enzym* **41**, 71–74.
- Romano, A.; Romano, D.; Molinari, F.; Gandolfi, R.; Costantino, F. (2005) A new chemoenzymatic synthesis of D-cloprostenol, *Tetrahedron Asymmetry* **16**, 3279–3282.
- Rossi, M.; Markovitz, S.; Callahan, T. (1987) Defining the active site of cytochrome P-450: the crystal and molecular structure of an inhibitor, SKF-525A, *Carcinogenesis* **8**, 881–887.
- Rothenberg, G.; Yatziv, Y.; Sasson, Y. (1998) Comparative autoxidation of 3-Carene and α -Pinene: Factors governing regioselective hydrogen abstraction reactions, *Tetrahedron* **54**, 593–598.
- Sacchetti, J. C.; Poulter, C. D. (1997) Creating isoprenoid diversity, *Science* **277**, 1788–1789.
- Sachan, A.; Ghosh, S.; Mitra, A. (2006) Biotransformation of *p*-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*, *Lett Appl Microbiol* **42**, 35–41.
- Sakamaki, H.; Itoh, K.-i.; Taniai, T.; Kitanaka, S.; Takagi, Y.; Chai, W.; Horiuchi, C. A. (2005) Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*, *J Mol Catal B-Enzym* **32**, 103–106.
- Salvador, J. A. R.; Clark, J. H. (2002) The allylic oxidation of unsaturated steroids by *tert*-butyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts, *Green Chemistry* **4**, 352–356.
- Sanders, T. H.; Pattee, H. E.; Singleton, J. A. (1975) Lipoxygenase isozymes of peanut, *Lipids* **10**, 681–685.
- Sauer, A. M.; Crowe, W. E.; Laine, R. A.; Henderson, G. (2006) Efficient And Economic Assymmetric Synthesis Of Nootkatone, Tetrahydronootkatone, Their Precursors And Derivatives, *Patent* US 7112700 B1.
- Savithiry, N.; Gage, D.; Fu, W.; Oriel, P. (1998) Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425, *Biodegradation* **9**, 337–341.
- Sawamura, M.; Kuriyama, T. (1988) Quantitative determination of volatile constituents in the pummelo (*Citrus grandis* Osbeck forma Tosa-buntan), *J Agric Food Chem* **36**, 567–569.

- Schäffer, A. A.; Aravind, L.; Madden, T. L.; Shavirin, S.; Spouge, J. L.; Wolf, Y. I.; Koonin, E. V.; Altschul, S. F. (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements, *Nucleic Acids Res* **29**, 2994–3005.
- Schenck, G. O.; Neumüller, O.-A.; Wolfgang, E. (1958) Zur photosensibilisierten Autoxydation der Steroide: Δ^5 -Steroid-7 α -hydroperoxyde und -7-ketone durch Allylumlagerung von Δ^6 -Steroid-5 α -hydroperoxyden, *Justus Liebigs Ann Chem* **618**
- Schieberle, P.; Grosch, W. (1989) Potent odorants resulting from the peroxidation of lemon oil, *Z Lebensm Unters Forsch* **189**, 26–31.
- Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. (2000) The Catalytic Pathway of Cytochrome P450cam at Atomic Resolution, *Science* **287**, 1615–1622.
- Schrader, J.; Berger, R. G. (2001) Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds, In: Rehm, H.-J.; Reed, G. (Hg.) *Biotechnology. Special processes*, 10. Weinheim, Wiley-VCH, 374–422.
- Schulte-Elte, K.-H.; Fracheboud, M. G.; Ohloff, G. (1974) Procédé pour la préparation d'une cétone bicyclique, *Patent* CH 541533.
- Seemann, T. (2006) Biotechnologische Darstellung von Grapefruit-Aroma: Hausarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Examensarbeit, Leibniz Universität Hannover.
- Shaffer, G. W.; Eschinasi, E. H.; Purzycki, K. L.; Doerr, A. B. (1975) Oxidations of Valencene, *J Org Chem* **40**, 2181–2185.
- Sharon-Asa, L.; Shalit, M.; Frydman, A.; Bar, E.; Holland, D.; Or, E.; Lavi, U.; Lewinsohn, E.; Eyal, Y. (2003) Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene, *Plant J* **36**, 664–674.
- Shoji, N.; Umeyama, A.; Asakawa, Y.; Takemoto, T.; Nomoto, K.; Ohizumi, Y. (1984) Structural determination of nootkatol, a new sesquiterpene isolated from *Alpinia oxyphylla* Miquel possessing calcium-antagonistic activity, *J Pharm Sci* **73**, 843–844.
- Shukla, O.; Bhattacharyya, P. K. (1968) Microbiological Transformations of Terpenes: Part XI - Pathways of Degradation of α - & β -Pinenes in a Soil Pseudomonad (PI-Strain), *Indian J Biochem* **5**, 92–101.
- Sikkema, J.; Bont, J. A. M. de; Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol Rev* **59**, 201–222.
- Sime, J. T.; Cheetham, P. S. J.; Gradley, M. L.; Banister, N. E. (2000) Use of sesquiterpenes for inhibiting oxidative enzymes, *Patent* US 6054490.

- Singh, S. K.; Upadhyay, R. C.; Yadav, M. C.; Tiwari, M. (2004) Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushroom mycelial cultures, *Curr Sci* **87**, 568–570.
- Sowden, R. J.; Yasmin, S.; Rees, N. H.; Bell, S. G.; Wong, L.-L. (2005) Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{cam} and P450_{BM-3}, *Org Biomol Chem* **3**, 57–64.
- Sprecher, E. (1959) Über die Guttation bei Pilzen, *Planta* **53**, 565–574.
- Steluti, R. M.; Giese, E. C.; Piggato, M. M.; Sumiya, A. F. G.; Covizzi, L. G.; Job, A. E.; Cardoso, M. S.; Corradi Da Silva, M. D. L.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. (2004) Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features, *J Basic Microbiol* **44**, 480–486.
- Tan, C. S. (1997) Preservation of fungi, *Cryptogam, Mycol* **18**, 157–163.
- Tassaneeyakul, W.; Guo, L.-Q.; Fukuda, K.; Ohta, T.; Yamazoe, Y. (2000) Inhibition Selectivity of Grapefruit Juice Components on Human Cytochromes P450, *Arch Biochem Biophys* **378**, 356–363.
- Taubert, J.; Krings, U.; Berger, R. G. (2000) A comparative study on the disintegration of filamentous fungi, *J Microbiol Methods* **42**, 225–232.
- Thomas, P. E.; Ryan, D.; Levin, W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Anal Biochem* **75**, 168–176.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tomchick, D. R.; Phan, P.; Cymborowski, M.; Minor, W.; Holman, T. R. (2001) Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1, *Biochemistry* **40**, 7509–7517.
- Torii, S.; Inokuchi, T.; Handa, K. (1982) Functionalization of *trans*-Decalin. V. A Synthesis of (±)-Nootkatone and (±)-Valencene from 4β,4a β-Dimethyl-Δ^{6,7}-octalin-1-one Ethylene Acetal, *Bull Chem Soc Jpn* **55**, 887–890.
- Torres, M.; Dolcet, M. M.; Sala, N.; Canela, R. (2003) Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases, *J Agric Food Chem* **51**, 3328–3333.

- Tressl, R.; Bahri, D.; Engel, K.-H. (1981) Lipid oxidation in fruits and vegetables, In: Teranishi, R.; Barrera-Benitez, H. (Hg.) Quality of selected fruits and vegetables of North America. Based on a Symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the Second Chemical Congress of the North American Continent (180th ACS National Meeting), Las Vegas, Nev., August 24-29, 1980. ACS symposium series, 170. Washington, DC, American Chemical Society, 213–232.
- Trudgill, P. W. (1994) Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes, In: Ratledge, C. (Hg.) Biochemistry of microbial degradation. Dordrecht, Kluwer, 33–61.
- Urlacher, V. B.; Lutz-Wahl, S.; Schmid, R. D. (2004) Microbial P450 enzymes in biotechnology, *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 317–325.
- Veddeler, B. (2004) Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Watanabe, M.; Sasaki, K.; Nakashimada, Y.; Nishio, N. (1998) High density cell culture of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. with self-flocculated cells, *Biotechnol Lett* **20**, 1113–1117.
- Werf, M. J. van der; Bont, J. A. M. de; Leak, D. J. (1997) Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **55**, 147–177.
- Willershausen, H.; Graf, H. (1991b) Enzymatische Transformation von Valencen zu Nootkaton, *Chemiker-Zeitung* **115**, 358–360.
- Willershausen, H.; Graf, H. (1991a) Metallkatalytische Transformation von Valencen zu Nootkaton, *Chemiker-Zeitung* **115**, 356–358.
- Wilson, C. W., III; Shaw, P. E. (1978) Synthesis of Nootkatone from Valencene, *J Agric Food Chem* **26**, 1430–1432.
- Wong, D. W. S. (1989) Mechanism and Theory in Food Chemistry. New York, Van Nostrand Reinhold.
- Wright, S. J.; Caunt, P.; Carter, D.; Baker, P. B. (1986) Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*, *Appl Microbiol Biotechnol* **23**, 224–227.
- Wurzenberger, M.; Grosch, W. (1982) The enzymic oxidative breakdown of linoleic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*), *Z Lebensm Unters Forsch* **175**, 186–190.
- Wurzenberger, M.; Grosch, W. (1984) The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*), *Biochim Biophys Acta* **794**, 25–30.
- Yanami, T.; Miyashita, M.; Yoshikoshi, A. (1980) Synthetic study of (+)-nootkatone from (-)- β -pinene, *J Org Chem* **45**, 607–612.
- Yoo, S. K.; Day, D. F.; Cadwallader, K. R. (2001) Bioconversion of α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN, *Process Biochem* **36**, 925–932.

Zhu, B. C.; Henderson, G.; Chen, F.; Maistrello, L.; Laine, R. A. (2001) Nootkatone is a repellent for Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*), *J Chem Ecol* **27**, 523–531.

Zhu, B. C.; Henderson, G.; Sauer, A. M.; Yu, Y.; Crowe, W.; Laine, R. A. (2003) Structure-activity of valencenoid derivatives and their repellence to the Formosan subterranean termite, *J Chem Ecol* **29**, 2695–2701.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Biotransformation von α -Pinen; BW = Blindwert für Submers- und konzentrierte Kultur, Sub = Submerskultur, KBM = Kultur mit konzentrierter Biomasse, Lyo = Lyophilisat, BWLyo = Blindwert für Lyophilisate, c = Konzentration, s = Standardabweichung, n.b. = nicht bestimmbar

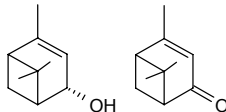
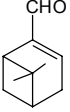
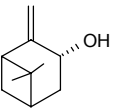
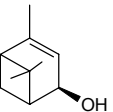
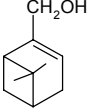
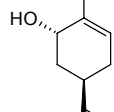
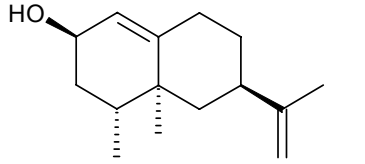
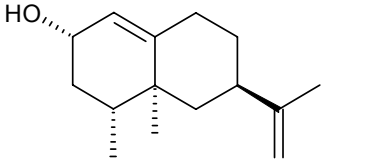
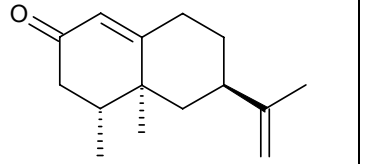
																			
		c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %
<i>M. scorodonius</i>	BW	5,6	0,76	14	0,30	0,010	3,4	0,74	0,020	2,7	0,302	0,0060	2,0	0,85	0,022	2,6	0,086	0,0015	1,7
	Sub	13,6	0,72	5,3	0,07	0,011	16	0,980	0,0053	0,54	0,16	0,011	6,9	2,1	0,12	5,7	0,37	0,021	5,7
	KBM	31,3	0,80	2,6	n.b.			0,8	0,29	39	0,11	0,011	11	11	2,9	25	1,33	0,026	1,9
	Lyo	56,9	0,54	0,95	1,833	0,0029	0,16	8,77	0,053	0,61	1,64	0,017	1,0	6,26	0,038	0,61	0,948	0,0037	0,39
	BWLyo	11,1	0,66	5,9	0,71	0,050	7,0	1,7	0,11	6,4	0,47	0,010	2,2	1,66	0,048	2,9	0,47	0,029	6,2
<i>C. carcharias</i>	BW	7,6	0,10	1,3	0,336	0,0036	1,1	0,8338	0,00010	0,0	0,339	0,0019	0,57	1,002	0,0077	0,77	0,099	0,0017	1,7
	Sub	8,0	0,31	3,8	0,09	0,012	13	n.b.			0,24	0,024	10	0,32	0,021	6,6	n.b.		
	KBM	14,91	0,039	0,26	n.b.			n.b.			0,24	0,027	11	0,21	0,036	17	n.b.		
	Lyo	42	4,5	11	3,0	0,35	11	1,6	0,20	12	1,2	0,33	28	3,6	0,42	12	1,14	0,065	5,7
	BWLyo	12,07	0,074	0,61	0,738	0,0028	0,38	1,86	0,045	2,4	0,52	0,021	3,9	1,76	0,014	0,80	0,496	0,0039	0,78
<i>C. striatus</i>	BW	5,85	0,071	1,2	0,200	0,0000	0,0	0,700	0,0000	0,0	0,300	0,0000	0,0	0,85	0,071	8,3	0,100	0,0000	0,0
	Sub	15,0	0,85	5,7	n.b.			1,52	0,024	1,6	0,59	0,026	4,5	1,26	0,039	3,1	0,074	0,0064	8,7
	KBM	29,37	0,077	0,26	n.b.			2,65	0,071	2,7	1,5	0,32	22	2,54	0,025	1,0	n.b.		
	Lyo	40,4	0,42	1,1	1,8	0,16	8,8	5,6	0,28	5,1	1,8	0,21	12	5,7	0,16	2,8	0,96	0,013	1,4
	BWLyo	13	1,2	9,1	0,700	0,0000	0,0	2,3	0,21	9,4	0,65	0,071	11	1,5	0,14	9,4	0,58	0,041	7,1
<i>T. versicolor</i>	BW	6,3	0,40	6,4	0,2068	0,00093	0,45	0,797	0,0035	0,44	0,37	0,037	9,8	1,00	0,030	3,0	0,099	0,0016	1,7
	Sub	15,4	0,48	3,1	n.b.			1,5	0,13	9,0	1,4	0,20	15	1,78	0,088	4,9	0,24	0,027	11
	KBM	85	39	45	n.b.			4	2,8	72	1,74	0,061	3,5	4	2,1	46	2,5	0,64	26
	Lyo	74,6	7,55	10	1,9	0,11	5,7	7,9	0,76	9,6	2,45	0,071	2,9	5,7	0,51	8,9	1,5	0,22	15
	BWLyo	13,3	1,20	9,1	0,69	0,007	1,1	2,3	0,21	9,4	0,65	0,071	11	1,5	0,11	7,1	0,58	0,041	7,1

Tabelle 7.2: Transformation von Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*; Transformation von 1 μL Valencen mit 50 mg Lyophilisat in 1,5 mL Puffer für ca. 24 h; Exp. = Bioreaktoransatz; c = Konzentration; s = Standardabweichung; Σ = Summe Gehalte α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkaton; MOPS^a = 100 mM MOPS, pH 7,0; MOPS^b = 20 mM MOPS, pH 7,0; TRIS = 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5; BIS-TRIS = 20 mM BIS-TRIS, pH 6,5; NaAc = 20 mM Na-Acetat, pH 6,0; TRIS, pH 8,5 = 20 mM TRIS-HCl, pH 8,5; * = Reaktorkultivierung erfolgte in NL-MA

Exp.	(+)Valencen V / μL	Puffer	α -Nootkatol			β -Nootkatol			(+)Nootkaton			Σ c / mg L ⁻¹
			c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	c / mg L ⁻¹	s / mg L ⁻¹	s / %	
7	10	MOPS ^a	50	4,3	8,6	18	1,3	6,8	126	11	9,1	194
8	10	MOPS ^a	95	3,7	3,9	34,4	0,34	1,0	217	11	5,2	346
8	10	MOPS ^a	84	1,6	1,9	30,6	0,26	0,9	185	2,0	1,1	300
8	10	MOPS ^b	86	10	12	19	1,5	7,7	229,2	0,64	0,28	335
9	10	MOPS ^b	82	3,0	3,7	25	7,3	29	181	6,8	3,8	288
9	10	MOPS ^b	107	22	20	25	11	46	303	47	16	436
9	10	TRIS	111	7,3	6,6	31,3	0,51	1,6	307	17	5,4	448
9	10	BIS-TRIS	70	11	16	28	6,7	24	157	32	21	255
9	10	TRIS	110	3,9	3,6	39	1,1	2,7	317	1,5	0,46	466
9	5	TRIS	90	3,5	3,9	25	1,7	6,6	320	5,4	1,7	436
9	1	TRIS	49	1,4	2,8	9,5	0,15	1,6	225	1,6	0,7	284
10	1	TRIS	76	3,3	4,3	21	1,7	8,1	241	1,3	0,6	338
10	1	NaAc	52	12	24	13	4,3	32	185	41	22	250
10	1	TRIS, pH 8,5	46	3,9	8,6	6	0,9	15	244	3,6	1,5	296
10	1	TRIS	53	14	27	13	4,7	36	190	40	21	256
10	1	TRIS	65	12	18	15	3,5	23	234	28	12	315
10	1	TRIS	53	6,1	11	11	2,3	21	218	6,9	3,2	282
10	1	TRIS	63	1,7	2,7	13,3	0,13	1,0	266	13	4,7	342
11	1	TRIS	46	5,4	12	11	2,3	20	148	6,2	4,2	205

														
Exp.	(+) - Valencen V / μL	Puffer	α -Nootkatol			β -Nootkatol			(+)-Nootkaton			Σ c / mg L^{-1}		
			c / mg L^{-1}	s / mg L^{-1}	s / %	c / mg L^{-1}	s / mg L^{-1}	s / %	c / mg L^{-1}	s / mg L^{-1}	s / %			
12	1	TRIS	64	3,3	5,1	21	1,7	8,3	163	12	7,3	248		
12	5	TRIS	117	8,4	7,2	38	2,6	7,0	284	16	5,6	439		
13	1	TRIS	14	2,0	14	3,4	0,21	6,2	58	5,3	9,2	76		
13	1	TRIS	34	1,7	5,1	9	0,9	9,1	90	1,0	1,1	133		
13	1	TRIS	51,4	0,26	0,5	16,8	0,69	4,1	111	1,4	1,3	179		
14	1	TRIS	46	6,3	14	8	1,4	18	204	19	9,4	258		
14	1	TRIS	39	3,9	10	6	1,1	18	183	2,5	1,3	228		
14	1	TRIS	35	6,4	18	6	1,5	25	157	19	12	198		
14	1	TRIS	50	2,8	5,5	11	0,7	6,0	174	4,8	2,8	235		
14	1	TRIS	67	4,2	6,2	17	2,2	13	218	3,6	1,7	303		
14	1	TRIS	48	6,6	14	12	1,5	13	151	21	14	210		
14	1	TRIS	45	3,9	8,7	10	1,8	17	155	5,4	3,5	210		
14	1	TRIS	54	1,1	2,1	11	0,8	7,1	211	7,9	3,7	275		
14	1	TRIS	49	9,1	19	13	3,1	25	173	26	15	234		
15*	1	TRIS	40	1,4	3,5	12,3	0,48	3,9	89	3,3	3,7	141		
17	1	TRIS	43	3,4	7,8	14	1,7	12	114	2,5	2,2	172		
18*	1	TRIS	44	6,9	16	9	1,7	19	233	27	12	285		
18*	1	TRIS	33,1	0,05	0,15	5,39	0,024	0,45	168,7	0,64	0,38	207		
18*	1	TRIS	44	5,6	13	11	2,9	27	136	8,1	6,0	190		

Lebenslauf

Marco Alexander Fraatz

geboren am 15. März 1976 in Hamburg

Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule Anna-Susanna-Stieg, Hamburg
1986 - 1995	Gesamtschule Julius-Leber, Hamburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Sep. 1995 - Sep. 1996	BROT FÜR DIE WELT, Diakonisches Werk, Hamburg
-----------------------	---

Studium und Ausbildung

Okt. 1996 - Okt. 1997	Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH)
Okt. 1997 - Okt. 1999	Grundstudium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg
Okt. 1999 - März 2002	Hauptstudium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg Abschluss: Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung
Feb. 2001 - Nov. 2001	Diplomarbeit
Mai 2002 - Okt. 2002	Praktikum bei Unilever Research & Development Vlaardingen in den Niederlanden in der Abteilung Taste and Flavour
Nov. 2002 - Apr. 2003	Praktikum im Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg
Mai 2003 - Aug. 2003	Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung Abschluss: Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung Akademischer Grad: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker mit Diplom
Sep. 2003 - Jun. 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover und Promotion unter Leitung von Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, Marco Alexander Fraatz, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und benutzte Hilfsmittel sowie zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Marco Alexander Fraatz