

# Lebensmittelchemie 2012

Neben der Identifizierung von Aromastoffen durch die molekulare Sensorik sind die Aufklärung ihrer Biosynthese sowie ihre biotechnische Produktion ins Zentrum der Aromastoffforschung gerückt.

◆ Geruch und Geschmack vermitteln die Qualität eines Lebensmittels. Den Geruch bestimmen flüchtige Aromastoffe, die heute vielen industriell hergestellten Lebensmitteln zugesetzt werden, um herstellungsbedingte Verluste auszugleichen oder das Aroma abzurunden. Der Verbraucher akzeptiert dabei eher natürliche Aromen. Der Begriff „natürlich“ darf nach EU-Recht allerdings nur dann zur Bezeichnung eines Aromas verwendet werden, wenn es ausschließlich Aromaextrakte oder natürliche Aromastoffe enthält.<sup>1)</sup> Dazu zählen biotechnisch erzeugte Aromastoffe, die in puncto Nachhaltigkeit für Aromenhersteller eine Alternative sind zu den klassischen natürlichen Aromen aus pflanzlichen Rohstoffen wie ätherischen Ölen. Biotechnische Verfahren dienen vermehrt dazu, strukturell komplexe Aromastoffe billiger und in größeren Mengen herzustellen, als dies mit chemischen Synthesen oder durch Pflanzenextraktion möglich ist.<sup>2)</sup>

Fortschritte in Enzymtechnik, Gentechnik, Bioprozess-Monitoring und Produktisolierung bieten viel versprechende Möglichkeiten für biotechnische Aromastoffproduktion.<sup>3)</sup> Spezifische Strategien sind hierfür aber nur dann weiterzuentwickeln, wenn Enzymologie und Regulation der Aromastoffbiosynthese auf molekularer Ebene verstanden sind. Daher ist die biochemische Forschung zur Aufklärung von Biosynthesewegen in Pflanzen ein wichtiger Bestandteil der Aromabiotechnik.

## Biosynthese des Weinaromas

◆ Terpene, vor allem Mono- und Sesquiterpene sowie die C<sub>13</sub>-Norisoprenoide, sind wichtige Aromastoffe in Früchten und in Pflanzen, die ätherische Öle akkumulieren. Bis vor wenigen Jahren war Lehrmeinung, dass der universelle biochemische Baustein aller Terpene, Isopentenylidiphosphat IPP, aus Acetyl-Coenzym A im Mevalonsäure-Weg (MVA) entsteht. Erst in den 1990er Jahren wurde ein alternativer Biosyntheseweg in Bakterien, Algen und Pflanzen entdeckt. Dieser wird nach dem ersten spezifischen Intermediat als Methylerythritol-4-phosphat-Weg (MEP) bezeichnet und enthält oftmals die geschwindigkeitsbestimmenden enzymatischen Schlüsselreaktionen der Aromastoffbiosynthese (Abbildung 1 C, S. 346). Diese Entdeckung ebnet heute den Weg zu rekombinanten, hochproduktiven Pflanzen durch Überexpression der Schlüsselenzyme und zur heterologen Expression ganzer pflanzlicher Biosynthesewege in Bakterien und Hefen durch metabolic engineering.<sup>4)</sup>

In der Weinpflanze *Vitis vinifera* verursacht ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) des Schlüsselenzyms 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (VvDXS; Abbildung 1 A) im MEP-Weg erhöhte Akkumulation der Monoterpenalkohole Linalool, Nerol und Geraniol in den Beeren der Muskat-Varietäten.<sup>5)</sup>

An Position 284 haben Muskat-Varietäten Asparagin anstelle von

Lysin. Dies steigert die katalytische Effizienz des Enzyms und erklärt das sortenspezifische blumig-süße Aroma (Abbildung 1 B). Untersuchungen zur genomischen Organisation, Phylogenie und Enzymologie der Terpensynthase-Genfamilie (VvTPS) belegen ebenfalls die Bedeutung der terpenoiden Verbindungen für die Weinpflanze.<sup>6)</sup> Die Familie umfasst wahrscheinlich mehr als 69 Mono- und Sesquiterpensynthasen, von denen 39 durch heterologe Expression funktionell charakterisiert wurden. Die VvTPS ist somit eine der größten Genfamilien des Sekundärmetabolismus der Weinpflanze, in der die TPS zum Blütenduft, zur Aromabildung in den Beeren und wahrscheinlich auch zur Resistenz und Verteidigung gegen Schädlinge beitragen. Die Sesquiterpene entstehen selektiv in der Beerenhaut und reichern sich während der Reifung in der Cuticula an.<sup>7)</sup> Die Sesquiterpensynthase-Aktivität steigt vor allem in der letzten Reifephase,<sup>8)</sup> wobei die Rebsorten anhand ihrer Sesquiterpenprofile unterscheidbar sind (Abbildung 2).

## Schlüsselkomponenten des Erdbeeraromas

◆ Im Unterschied zum Aroma des Weins wird das Erdbeeraroma neben verschiedenen Fruchtestern vor allem durch zwei 3(2H)-Furanone geprägt. Den letzten und entscheidenden Schritt der enzymatischen Esterbildung, die Reaktion kurzketziger Alkohole mit CoA-aktivierten Fettsäuren, katalysieren Alkohol-Acyl-CoA-Transferasen.<sup>9,10)</sup> Diese

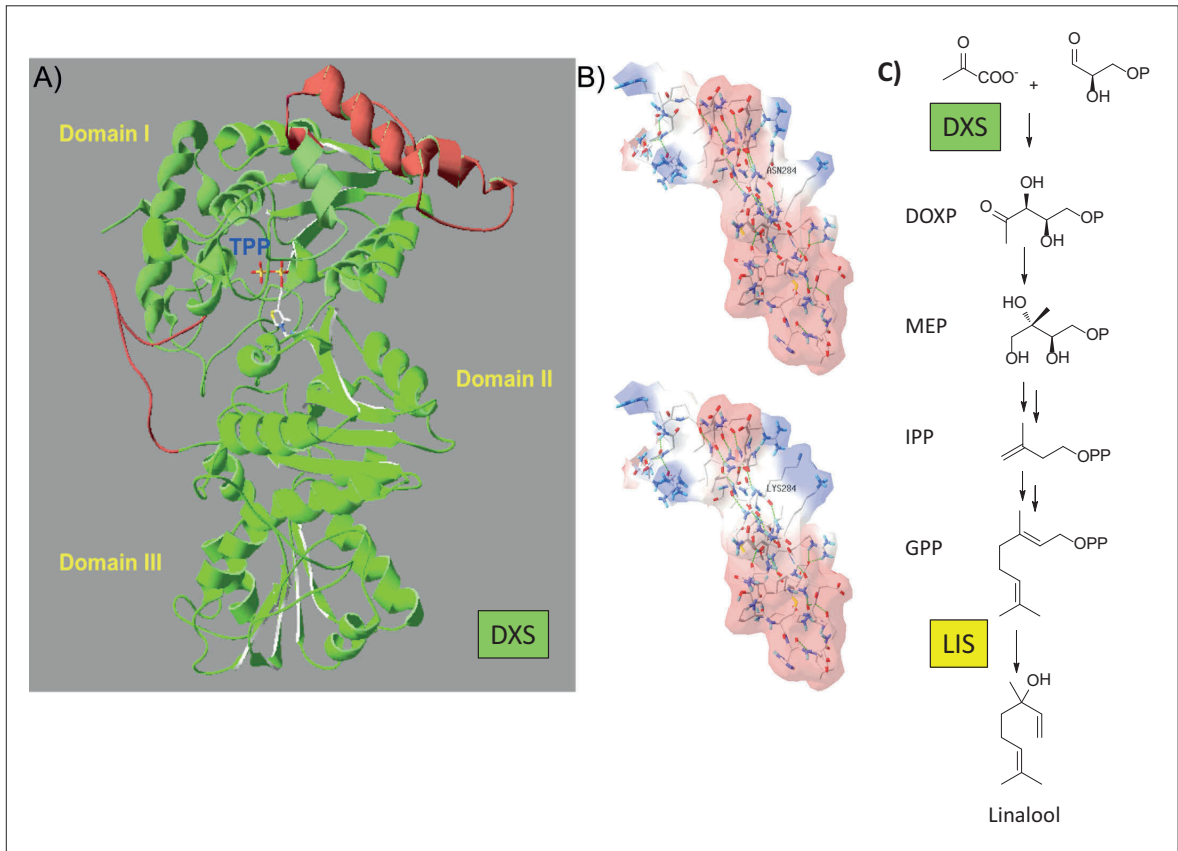


Abb. 1. A) Dreidimensionale, modellierte Struktur der 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) aus der Weinrebe (*Vitis vinifera*), B) Änderung des elektrostatischen Oberflächenpotenzials durch die Asparagin-Lysin-Substitution (K284N). DXS ist ein dimeres Protein und besteht aus drei Domänen (I,II,III). Das Coenzym Thiaminpyrophosphat (TPP) wird zwischen den Domänen I und II im aktiven Zentrum gebunden. Die Mutation K284N befindet sich in der roten Linkerregion zwischen zwei beta-Faltblättern der Domäne I.<sup>5)</sup> DXS katalysiert die Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. C) MEP – Methylerythritol-4-phosphat, IPP – Isopentenylidiphosphat, GPP – Geranylidiphosphat, LIS – Linaloolsynthase

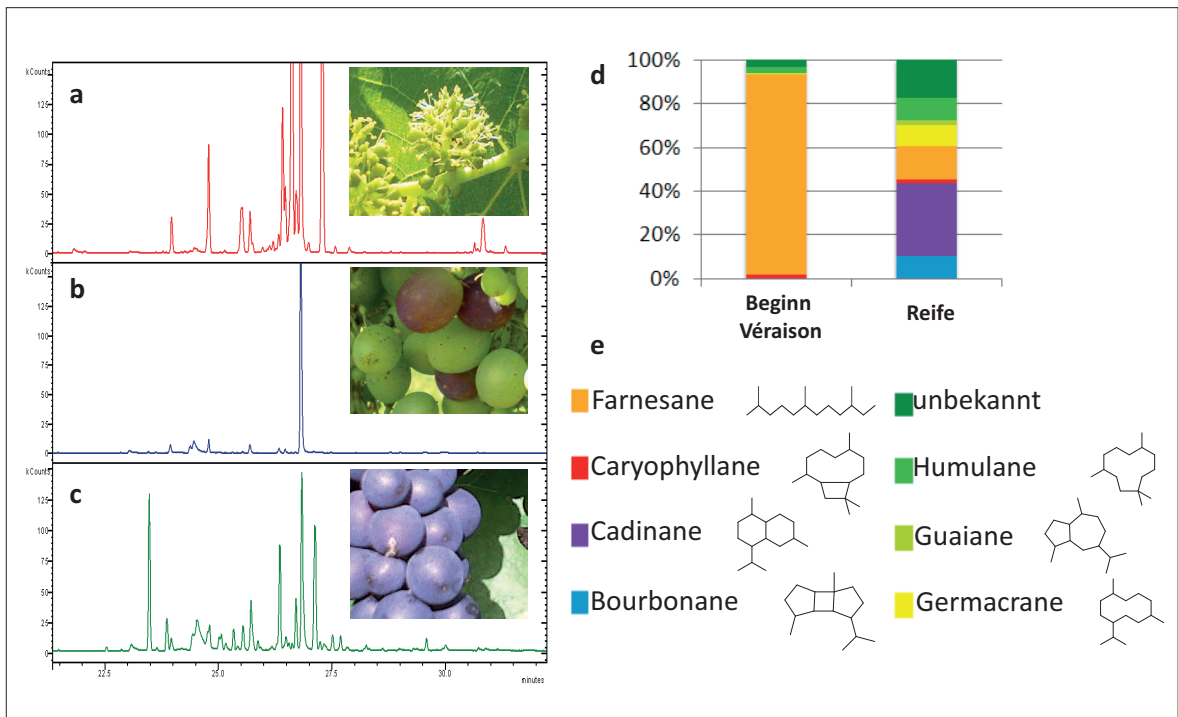


Abb. 2. Headspace-GC-MS-Analyse der flüchtigen Verbindungen in *Vitis vinifera* (Rebsorte Syrah) von der Blüte (a), über den Beginn der Reife (Véraison, b), bis zur vollen Reife (c). Bei fast allen detektierten Verbindungen handelt es sich um Sesquiterpenkohlenwasserstoffe mit unterschiedlichen Grundstrukturen (e). Das Sesquiterpen-Profil ändert sich hierbei im Verlauf der Reifung stark und ist rebsortenspezifisch.<sup>7)</sup>

wurden in den letzten Jahren auch in anderen Früchten, etwa in Äpfeln und Melonen, intensiv untersucht. Aufgrund ihrer geringen Geruchsschwelle (10 ppb) und relativ hohen Konzentrationen in den Früchten (zirka  $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) zählen vor allem 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF) und sein Methylether 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF) zu den Schlüsselsubstanzen des Erdbeeraromas (Abbildung 3). In reiner Form riechen diese 3(2H)-Furanone, je nach Enantiomer, karamellartig oder fruchtig süß.<sup>11)</sup> Interessanterweise wird aus Erdbeeren ausschließlich racemisches HDMF und DMMF isoliert, als Grund dafür gilt die rasche Keto-Enol-Tautomerie und die damit einhergehende Racemisierung der HDMF-Struktur (Abbildung 3).

Da HDMF über die Maillard-Reaktion leicht aus Desoxyhexosen entsteht, wurden diese Kohlenhydrate lange Zeit als biogenetische Vorläufer postuliert. Inzwischen ist klar, dass D-Fructose-1,6-diphosphat das Kohlenstoffgerüst von HDMF liefert.<sup>12)</sup> Die phosphorylierte Ketose wird zunächst über noch unbekannte Reaktionen zum 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF) umgesetzt und anschließend mit einer NAD(P)H-abhängigen Enon-Oxidoreduktase (FaEO) zum HDMF reduziert (Abbildung 3). FaEO und das orthologe Enzym aus der Tomate (SLEO) weisen hohe Selektivität gegenüber ihrem natürlichen Substrat HMMF auf.<sup>13)</sup>

In den Früchten methyliert eine S-Adenosyl-L-Methionin abhängige O-Methyltransferase (FaOMT) HDMF schließlich zu DMMF.<sup>14)</sup> Die Bedeutung von FaOMT für die Bildung von DMMF haben kürzlich genetische Analysen des Erdbeerfruchtaromas bestätigt.<sup>15)</sup> Bei der Suche nach Genabschnitten, welche die natürliche Variation des DMMF-Gehaltes verschiedener Erdbeertypen beeinflussen, wurde ein Sequenzabschnitt von 30 Basenpaaren in der FaOMT-Promotorregion verschiedener Allele von

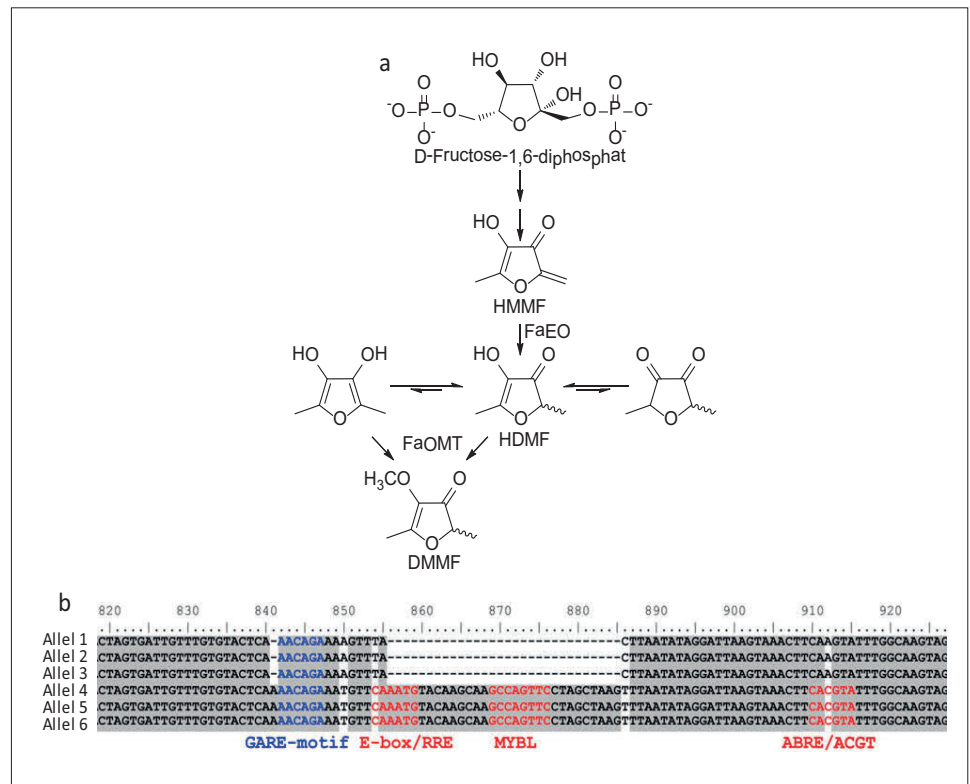


Abb. 3. Biosynthese der 3(2H)-Furanone in der Erdbeerfrucht. a) Bildungsweg mit dem Intermediat 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF), den Produkten 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF) und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF) sowie den beteiligten Enzymen *Fragaria-x-ananassa-Enon-Oxidoreduktase* (FaEO) und *F-x-ananassa-O-Methyltransferase* (FaOMT); b) Ausschnitt aus der FaOMT-Promotorregion, gemeinsame cis-regulatorische Elemente sind in blauer Farbe dargestellt und Motive, die für die funktionell aktiven Allele (4–5) spezifisch sind in Rot.

DMMF-reichen Genotypen identifiziert, der zur starken Expression des FaOMT-Gens und damit zu hohen DMMF-Gehalten führt (Abbildung 3). Basierend auf dieser Entdeckung lassen sich nun molekulare Marker entwickeln, um in Zuchtprogrammen DMMF-reiche Nachkommen vor der Fruchtreife zu selektieren.

Neben den Schlüsselkomponenten des Erdbeeraromas spielen weitere geruchsaktive Substanzen für die Unterschiede im Aroma verschiedener Erdbeersorten eine Rolle. Während die Erdbeerart *Fragaria vesca* (Walderdbeere), deren Genom kürzlich sequenziert wurde,<sup>16)</sup> aromarelevante Mengen des Phenylpropens Eugenol produziert, hat die Kulturerdbeere *F. x ananassa* diese Fähigkeit weitgehend eingebüßt. Jedoch ist die Kulturerdbeere immer noch in der Lage, aromawirksame Mengen an Eugenol zu synthetisieren, wenn sich der Kohlenstofffluss vom Flavono-

id-Stoffwechsel weg hin zu den Phenylpropenen verlagert.<sup>17)</sup>

### Speisepilze als Enzymquelle und Biogenesemodell

◆ Die jahreszeitlich eingeschränkte Verfügbarkeit, Spurenkonzentration von Enzymen und Intermediaten sowie zahllose Störstoffe (Säuren, Phenole, Pektin, Peptidasen etc.) erschweren das Studium der Aromabiogenese in Pflanzenzellen. Eine mikrobielle Alternative sind die höheren Pilze mit ihrem ausgeprägten Sekundärmetabolismus.

Basidiomycota, eine Abteilung aus dem Reich der Pilze, umfassen rund 30 000 Arten. Davon sind etwa 150 für den Menschen giftig, zum Beispiel aus der Gattung *Amanita* (etwa *Amanita phalloides*, der grüne Knollenblätterpilz). Mehr als 1000 Arten sind jedoch essbar, zum Beispiel die Seitlinge (Gattung *Pleurotus*), viele weitere sind naturheilkundlich relevant. Als Saprobi-

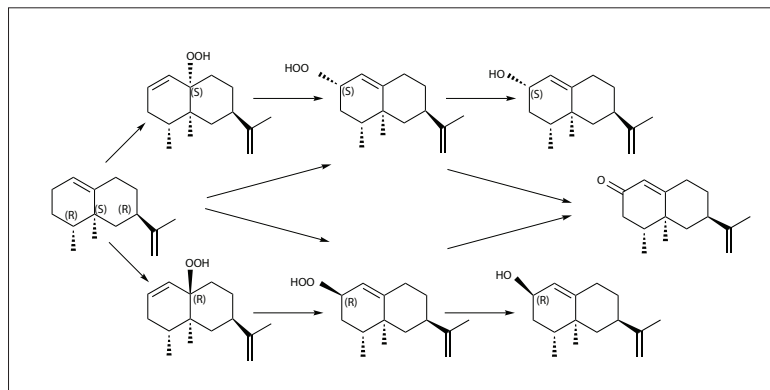


Abb. 4. Transformation von (+)-Valencen zum Grapefruit-Schlüsselaromastoff Nootkaton durch eine Dioxygenase des Pilzes *Pleurotus sapidus*.<sup>19)</sup>

onten verfügen sie über ein breites Spektrum einzigartiger Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Hydrolasen zum Abbau lebender und toter tierischer und pflanzlicher Substanz, also auch zum Ligninabbau. Diese katalytische Vielseitigkeit ist sowohl für das Studium von Biosynthesewegen als auch für die industrielle Biotechnik nutzbar.

Ein halbes Jahrhundert bevor die Begriffe Nachhaltigkeit und Bioökonomie in Mode kamen, gab es Versuche zur mikrobiellen Oxyfunktionalisierung von anderweitig nutzlosen Terpenkohlenwasserstoffen aus industriellen Nebenströmen (Citruschalenöle, Baumharze etc.).<sup>18)</sup> In vielen Mikroorganismen gut belegt, aber ausbeuteschwach sind CytochromP450-vermittelte Funktionalisierungen. So galt die Transformation von Limonen zu Carveol/Carvon und Perilla-Verbindungen und von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen zu Verbenol/Verbenon, Myrtenol/Myrtenal und Fenchol/Fenchon durch Pelletkulturen und Lyophilisate von *Pleurotus sapidus* lange als Monooxygenasereaktion. Die Alkohol/Carbonyl-Paare entstehen jedoch durch eine Dioxygenase und dem anschließenden Zerfall der gebildeten Hydroperoxide. Intermediäre Hydroperoxide wurden erstmals bei der Transformation von (+)-Valencen zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nootkatol und Nootkaton mit HPLC-APCI-MS und Mikrochemie, kombiniert mit GC-MS identifiziert (Abbildung 4).<sup>19)</sup> In der Folge gelang es, allylische Hydroperoxide auch bei der Transformation von  $\alpha$ -Pi-

nen<sup>20)</sup> und Car-3-en<sup>21)</sup> nachzuweisen.

Die in der Aromastoffanalytik üblichen Methoden erkennen Hydroperoxide nicht, weil diese selbst nach kalter Injektion auf der GC-Kapillare zerfallen; sie entziehen sich auch den klassischen UV/Vis-Detektoren der LC.

Die Transformation von Myrcen durch Dioxygenase verknüpft Grundlagen- mit angewandter Forschung. Das primär gebildete 1,4-Endoperoxid zerfällt zu einem cyclisierbaren Hydroxyaldehyd, es folgt die Aromatisierung des Halbacetal zu Perillen, einem geruchsaktivem Monoterpenether. Der Nachweis sämtlicher markierter Intermediate aus Trideutero-Myrcen hat nicht nur einen möglichen Bildungsweg in der Perilla-Pflanze gezeigt, sondern auch ein Verfahren zur biotechnischen Gewinnung.<sup>22)</sup>

Perillen ist das flüchtigste Produkt der Reaktion und kann in situ durch Gas-Stripping aus dem Bioreaktor ausgetrieben werden, wodurch sich das Bildungsgleichgewicht kontinuierlich zum Produkt verschiebt. Das Myrcen-Isomer  $\beta$ -(E)-Ocimen setzt sich zu Rosenfuran um, einer Schlüsselkomponente des Rosenduftes. Mit der funktionellen Expression der pilzlichen Dioxygenase in *E. coli*<sup>23)</sup> steht nun ein Biokatalysator zur Verfügung, der lipophile Substrate effizient peroxidiert. Diese Biotransformation hat das Interesse der Industrie geweckt und ist inzwischen patentiert.

Tatsächlich ist die Dioxygenase eine Typ-1-Lipoxygenase, wie Se-

quenzaligments und Substratassays gezeigt haben.<sup>24)</sup> Am aktiven Zentrum sitzt ein stereodeterminierender Alanylrest, der bei der Transformation von Linolsäure zu (13S)-Hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure führen sollte. Chirale HPLC ergab einen ee von 94% zugunsten der (13S)-Form.

Zu den erstaunlichen Leistungen von Pilzzellkulturen zählt die kalte Bildung von vermeintlich thermischen Aromen, also Röst-, Brat- und Backaromen, wie Pyrazinen, Furanonen und Pyranonen. Wird Mycel von *Laetiporus sulphureus* (Gemeiner Schwefelporling, „chicken mushroom“) auf proteinreichen Medien kultiviert, bildet es Peptidasen und in der Folge potente heterocyclische Aromastoffe, darunter das nach Fleischbrühe riechende Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2-[5H]-furanon). Precursor ist vermutlich Isoleucin, denn Spurenkonzentrationen von (2S, 3R, 4)-Hydroxyisoleucin sind mit HPLC-FD und LC-SIM-MS/MS gemessen worden.<sup>25)</sup> Nicht nur der Aromastoff, sondern auch das Intermediat 4-Hydroxyisoleucin ist von Interesse: Es stimuliert die Insulinsekretion des Menschen; als Extrakt aus Bockshornklee (einer Currykomponente) wird es zu hohen Preisen als Anabolikum gehandelt.

C<sub>13</sub>-norisoprenoide Aromen wie  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Damascenon sind Zielverbindungen der Aromabio-technologie, denn ihre Geruchsschwellen liegen mit teilweise < 0,01 ppm extrem niedrig. Pflanzen bilden diese C<sub>13</sub>-Norisoprenoide durch den enzymatischen Abbau tetraterpenoide Carotinoide, wobei die pflanzlichen Enzyme (carotenoid cleavage oxygenases, CCO) die jeweiligen Precursoren spezifisch an der C(9,10)- oder C(9'10')-Doppelbindung des Polyengerüsts spalten.

Aufgrund ihrer geringen Stabilität eignen sich die pflanzlichen Enzyme bislang allerdings nicht für technische Prozesse. Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten sind hingegen stabiler und bauen Carotinoide effizient oxidativ ab. In einem Screening auf mit  $\beta$ -Carotin supple-

mentierten Agarplatten bildete sich um das Myzel des Knoblauchschwindlings *Mycetinis scorodoni* ein Bleichungshof. Das dafür verantwortliche Enzym, MsP1, wurde aus Submerskulturen des Pilzes gereinigt und kloniert.<sup>26)</sup> Anhand von Sequenzvergleichen und der Röntgenstrukturanalyse wurde MsP1 als Peroxidase vom DyP-Typ (dye decolorizing peroxidase) identifiziert. Das native Häm-Enzym liegt im Kulturüberstand als Homodimer mit einer Molmasse von zirka 130 kDa vor. Das Enzym ist hoch glykosidiert; 24% der Molmasse entfallen auf den Kohlenhydratanteil. Anders als pflanzliche CCOs erwies sich MsP1 als außergewöhnlich prozessstabil. Erst oberhalb von 8000 bar und 60 °C entfaltete sich die Peroxidase und wurde inaktiv, wie druck- und temperaturabhängige FTIR-Untersuchungen und photometrische Assays zeigten.<sup>27)</sup>

Nach heterologer Expression in *Aspergillus niger* baute MsP1 zahlreiche Carotine und Xanthophylle bevorzugt zu den korrespondierenden C<sub>13</sub>-Norisoprenoiden ab; als Hauptprodukt der oxidativen Spaltung von β-Carotin entstand β-Ionon (Abbildung 5).<sup>29)</sup>

### Mikrobielle Produktion von terpenoiden Aromastoffen

◆ Für die mikrobielle Produktion von Terpenen gibt es grundsätzlich zwei Strategien:

- Biokatalyse, ausgehend von natürlichen und kostengünstigen Terpenvorstufen;
- De-novo-Biosynthese.

Das wichtigste Reaktionsprinzip der ersten Strategie ist die bereits angesprochene mikrobielle Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen. Ein Beispiel ist die Biokonversion von (+)-Limonen zu (+)-Perillasäure.<sup>31)</sup> Perillasäure ist aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung ein Kandidat für die natürliche Konservierung kosmetischer Produkte.

Die Reaktion verwendet einen lösungsmitteltoleranten *Pseudomonas-putida*-Stamm und nutzt dabei

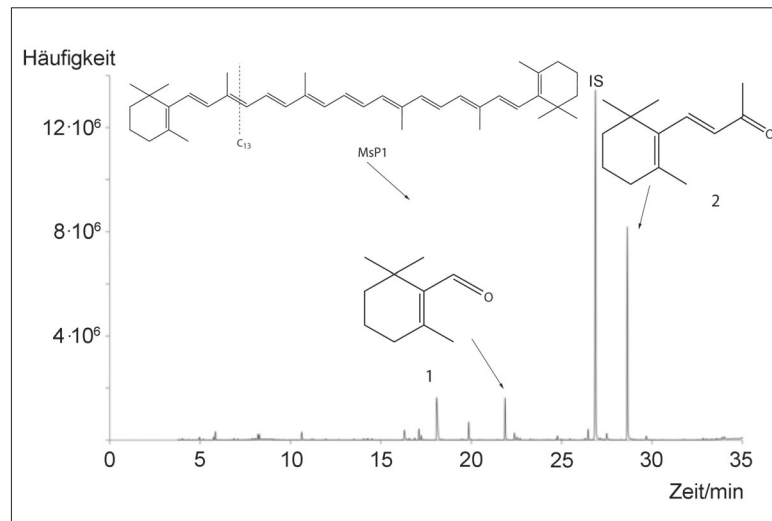


Abb. 5. GC-MS-Chromatogramm der MsP1-katalysierten Umsetzung von β-Carotin zu Norisoprenoiden; (1) β-Cyclocitral, (2) β-Ionon. IS = interner Standard α-Ionon.

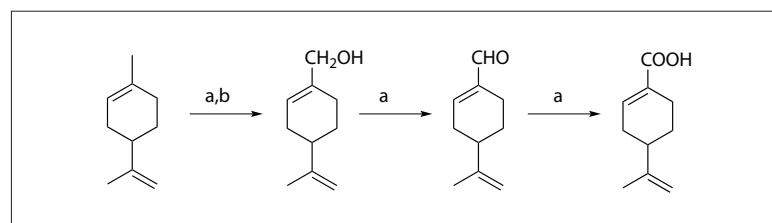


Abb. 6. Biokonversion von Limonen zu Perillasäure über die Intermediate Perillaalkohol und Perillaaldehyd mit *Pseudomonas putida* DSM 12264 (a).<sup>31)</sup> Ein rekombinanter *P. putida*-Stamm wandelt dagegen Limonen vorzugsweise in Perillaalkohol um (b).<sup>30)</sup>

eine natürliche Stoffwechseleigenschaft dieses Bakteriums (drei Enzymschritte) (Abbildung 6, Reaktionsweg a). Der Stamm erlaubt die direkte Zugabe erhöhter Mengen des Edukts Limonen, das für konventionelle Mikroorganismen toxisch ist, in das Fermentationsmedium (Abbildung 7). Dies wirkt der Substratlimitierung, dem Problem bei Terpen-Biotransformationen, effizient entgegen. Ein Anionenaustauscher entfernt die Monoterpensäure selektiv aus dem Bioprozess. Dies verhindert die Inhibierung durch das akkumulierende Produkt. Ein Fed-batch-Verfahren mit In-situ-Produktentfernung erreicht Produktkonzentrationen von bis zu 30 g·L<sup>-1</sup> in sechs Tagen.

Ein ähnlicher Ansatz liefert Perillaalkohol, einen potenziellen Antikrebswirkstoff (Abbildung 6, Reaktionsweg b). Hierzu wurde das Enzym CYP153A6 aus *Mycobacterium sp.*, das die gewünschte Reaktion von (–)-Limonen zu (–)-Peril-



Abb. 7. Biokonversion von Limonen zu Perillasäure im Laborreaktor. Der Mikroorganismus toleriert erhöhte Volumenanteile oberhalb der Löslichkeitsgrenze des Terpens, so dass sich beim Rühren im Bioreaktor eine milchig-trübe Emulsion bildet.

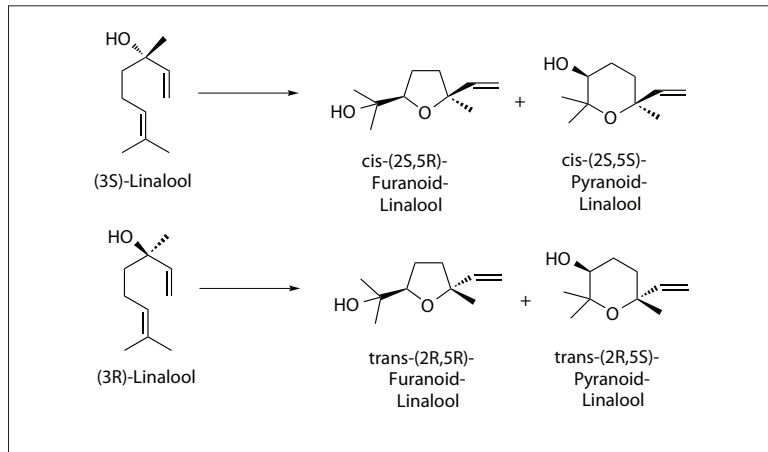


Abb. 8. Stereospezifische Oxyfunktionalisierung von ( $\pm$ )-Linalool mit *Corynespora cassiicola* DSM 62475 zu furanoiden und pyranoiden Linalooloxiden als den jeweiligen Hauptprodukten.<sup>29)</sup>

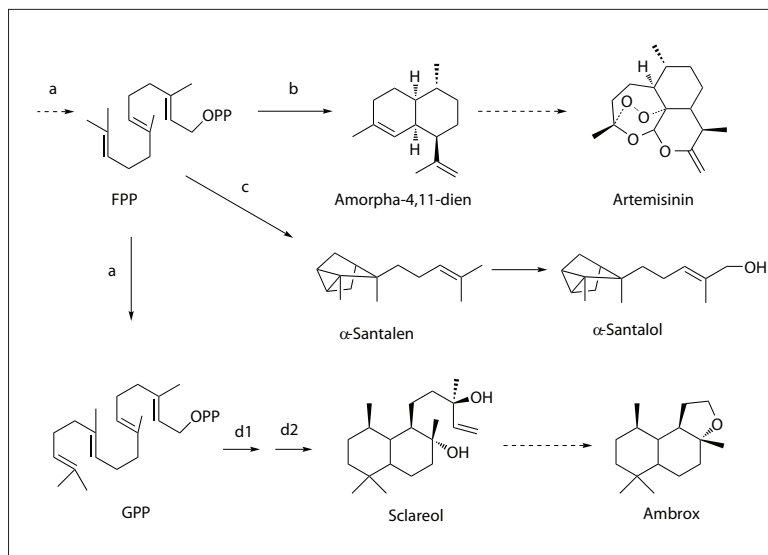


Abb. 9. De-novo-Synthesen von Terpenen in gentechnisch optimierten Mikroorganismen zeichnen sich durch einen erhöhten metabolischen Fluss in die gewünschten Terpenvorstufen Farnesylidiphosphat (FPP) oder Geranylgeranylidiphosphat (GGPP) aus (a). Ein Beispiel für solche mikrobielle Fabriken ist die Herstellung von Amorpha-4,11-dien, einer Vorstufe des Antimalaria-Wirkstoffs Artemisinin. Durch Einbringen der entsprechenden pflanzlichen Sesquiterpensynthase (b) in einen FPP-überproduzierenden Bäckerhefestamm<sup>34)</sup> gelingt es, die Substanz effizient zu produzieren. Durch die pflanzlichen Gene für Sesqui- und Diterpensynthesen (c,d1,d2) entstehen  $\alpha$ -Santalol und Sclareol, sie sind Vorstufen der wichtigen Aromastoffe  $\alpha$ -Santalol und Ambrox.<sup>32)</sup>

laalkohol katalysiert, in *Pseudomonas putida* überexprimiert. Das Verfahren mit extraktiver In-situ-Produktentfernung erreicht Produktkonzentrationen von  $4,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  in 24 Stunden.<sup>30)</sup>

Die Erfolge lassen erwarten, dass ähnliche Bioprozesse auf Basis solventoleranter Bakterien, die spezifische Oxygenasen oder ganze Enzymkaskaden überexprimieren, künftig dazu dienen, Terpene zu Aromastoffen zu funktionalisieren. Aber auch einfache verfahrenstechnische Maß-

nahmen verbessern Prozesse deutlich, wie kürzlich die stereospezifische Oxyfunktionalisierung des Monoterpenalkohols ( $\pm$ )-Linalool zu den lavendelartigen furanoiden und pyranoiden Linalooloxiden mit dem Pilz *Corynespora cassiicola* zeigte (Abbildung 8).<sup>29)</sup> Adsorberpartikel im Bioreaktor, die in situ das Edukt einbrachten und das Produkt entfernten, führten zu einer Produktkonzentration von  $4,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Als Pionierarbeit für Strategie 2, die De-novo-Biosynthese, gilt ein

biotechnisches Herstellverfahren für Artemisinin, einem Wirkstoff gegen Malaria. Schlüsselintermediat dieser Synthese ist das Sesquiterpen Amorpha-4,11-dien, das inzwischen in Konzentrationen von über  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  fermentativ aus Zucker entsteht (Abbildung 9).<sup>34)</sup> Zum Einsatz kommt ein Bäckerhefe-Stamm (*Saccharomyces cerevisiae*), in dem alle acht Gene des wirtseigenen MVA-Weges vom Acetyl-Coenzym A bis zum Farnesylidiphosphat (FPP) und das Gen für die Sesquiterpensynthase, die Armorphadiensynthase (ADS) aus *Artemisia annua*, dem einjährigen Beifuß, überexprimiert wurden. Gleichzeitig wurde die mit der ADS um das FPP konkurrierende hefeigene Ergosterolsynthese herabgeregelt. Die wichtigste verfahrenstechnische Optimierung brachte ein Fed-batch-Protokoll, das in der Produktionsphase von Glucose auf Ethanol als einzige C-Quelle umstellt. Durch 10% (v/v) Methyloleat wird das hydrophobe und flüchtige Produkt extraktiv gefangen. Die Ausbeute erreicht etwa 18% Cmol, bezogen auf den verbrauchten Zucker. Dies ist ein beachtlicher Wert, da sich das Produkt nicht vom Zentralstoffwechsel der Hefe ableitet.

Erste ähnliche Ansätze für Aromastoffe wurden kürzlich publiziert: Das Sesquiterpen  $\alpha$ -Santalol ist die Vorstufe von  $\alpha$ -Santalol, einer der Hauptkomponenten des teuren ostindischen Sandelholzöls.  $\alpha$ -Santalol ist nun erstmals in Konzentrationen von annähernd  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ausgehend von Glucose zu gewinnen (Abbildung 9).<sup>32)</sup> Entscheidend war das Einbringen einer pflanzlichen Santalensynthase in einen FPP-überproduzierenden *S. cerevisiae*-Stamm.

Solche mikrobiellen Fabriken sind für die Aromaindustrie ideale Plattformen, um Terpene ausgehend von heimischen nachwachsenden Rohstoffen im Fermenter herzustellen. Jüngstes Beispiel ist die Synthese des Diterpens Sclareol in einem gentechnisch optimierten *Escherichia coli*-Stamm (Abbildung 9).<sup>33)</sup> Sclareol ist ein im Muskatellersalbei

(*Salvia sclarea*) natürlich vorkommender Diterpenalkohol, den die Parfümindustrie als Ausgangsmaterial für die Synthese von Ambergris-Riechstoffen wie Ambrox verwendet. Durch Konstruktion eines synthetischen MVA-Weges wurde die *E. coli*-eigene Terpen-Biosynthese verstärkt und bis zum Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP) weitergeführt. Nach Klonierung der beiden pflanzlichen Gene, die für die Sclareolsynthese aus GGPP verantwortlich sind, wurden sie in den *E. coli*-Stamm eingebracht und überexprimiert. Mit Hochzell-dichte-Fermentation und einer organischen Extraktionsphase erreichte die Produktkonzentration nach 3,5 Tagen zirka  $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , den höchsten bisher publizierten Wert für ein heterologes Diterpen in einem mikrobiellen Wirtsorganismus.

#### Literatur

- 1) Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG.
- 2) M. M. Bomgardner, Chem. Eng. News 2012, 90, (29), 25–29.
- 3) T. Hofmann, W. Meyerhof, P. Schieberle (Hrsg.), Advances and challenges in flavor chemistry & biology. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, 2011.
- 4) J. Maury, M. A. Asadollahi, L. R. Formenti, M. Schalk, J. Nielsen, J. Metabolic, „Engineering of Isoprenoid Production: Reconstruction of Multistep Heterologous Pathways in Tractable Hosts“. In: T. J. Bach, M. Rohmer, M. (Hrsg.), Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms new concepts and experimental approaches. Springer, New York, 2012, 73–89.
- 5) J. Battilana, F. Emanuelli, G. Gambino, et al. J. Exp. Bot. 2011, 62, 5497–5508.
- 6) J. Bohlmann, D. M. Martin, S. Aubourg et al., BMC Plant Biol. 2010, 10.
- 7) B. May, M. Wüst, Flavour Frag. J. 2012, 27, 280–285.
- 8) D. M. Martin, A. Chiang, S. T. Lund, J. Bohlmann, Planta 2012, 236, 919–929.
- 9) W. Schwab, R. Davidovich-Rikanati, E. Lewinsohn, Plant J. 2008, 54, 712–732.
- 10) G. Cumplido-Laso, L. Medina-Puche, E. Moyano et al., J. Exp. Bot. 2012, 63, 4275–4290.
- 11) M. Emura, Y. Yaguchi, A. Nakahashi, D. Sugimoto, N. Miura, K. Monde, J. Agr. Food Chem. 2009, 57, 9909–9915.
- 12) T. Raab, J. A. López-Ráez, D. Klein et al. Plant Cell 2006, 18, 1023–1037.
- 13) K. Durchschein, S. Wallner, P. Macheroux, et al., Eur. J. Org. Chem. 2012, 26, 4963–4968.
- 14) M. Wein, N. Lavid, S. Lunkenbein, E. Lewinsohn, W. Schwab, R. Kaldenhoff, Plant J. 2002, 31, 755–65.
- 15) Y. Zorrilla-Fontanesi, J. L. Rambla, A. Cabeza et al., Plant Physiol. 2012, 159, 851–870.
- 16) V. Shulaev, D. J. Sargent, R. N. Crowhurst et al., Nat. Genet. 2011, 43, 109–116.
- 17) T. Hoffmann, R. Kurtzer, K. Skowranek et al., Metab. Eng. 2011, 13, 527–531.
- 18) J. Schrader, „Microbial Flavour Production“, in: R. G. Berger (Hrsg.), Flavours and Fragrances, Springer, Heidelberg 2007, 507–574.
- 19) S. Krügener, U. Krings, H. Zorn, R. G. Berger, Biores. Technol. 2010, 101, 457–462.
- 20) U. Krings, L. Lehnert, M. A. Fraatz, B. Hardebusch, H. Zorn, R. G. Berger, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9944–9950.
- 21) N. Lehnert, U. Krings, D. Sydes, M. Wittig, R. G. Berger, J. Biotechnol. 2012, 159, 329–335.
- 22) U. Krings, U., Krügener, S., Rinne, S., Berger, R.G., Bioconversion of  $\alpha$ -Myrcene to Perillene – Metabolites, Pathways, and Enzymes, in I. Blank, M. Wüst, C. Yeretizian (Hrsg.), Proc. 12th Weurman Flavour Symposium, ZHAW, Zurich, 2010, 328–331.
- 23) K. Zelena, U. Krings, R. G. Berger, Biores. Technol. 2012, 108, 231–239.
- 24) I. Plagemann, K. Zelena, P. Arendt, P. D. Ringel, U. Krings, R. G. Berger, J. Mol. Cat. B: Enzymatic 2013, im Druck.
- 25) U. Krings, A. Grimrath, D. Linke, S. Schindler, S., R. G. Berger, Flav. Fragr. J. 2011, 26, 174–179.
- 26) M. Scheibner, B. Hülsdau, K. Zelena et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008, 77, 1241–1250.
- 27) M. Pühse, R. T. Szwedza, Y. Ma, C. Jeworrek, R. Winter, H. Zorn, BBA-Proteins Proteom. 2009, 1794, 1091–1098.
- 28) K. Zelena, B. Hardebusch, B. Hülsdau, R. G. Berger, H. Zorn, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9951–9955.
- 29) S. Bormann, M. M. W. Etschmann, M. A. Mirata, J. Schrader, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012, 39, 1761–1769.
- 30) S. Cornelissen, S. Liu, A. Schmid, A. T. Deshmukh, B. Bühler, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011, 38, 1359–70.
- 31) M. A. Mirata, D. Heerd, J. Schrader, Process Biochem. 2009, 44, 764–771.
- 32) G. Scalcinati, C. Knuf, S. Partow et al., Metabol. Eng. 2012, 14, 91–103.
- 33) M. Schalk, L. Pastore, M. A. Mirata et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, dx.doi.org/10.1021/ja307404u.
- 34) P. J. Westfall, D. J. Pitera, J. R. Lenihan et al., P. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, E111–E118.

**Ralf G. Berger** leitet seit 1990 das Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hannover. Er studierte in Stuttgart und an der TU München, wo er promovierte und 1986 habilitierte. Von 1988 bis 1989 war er Postdoc an der University of California in Davis. Er erforscht mikrobielle Modelle der Aromastoffgenese und die Enzymologie und Molekularbiologie von Speisepilzen ([www.basionet.de](http://www.basionet.de)). [rgberger@lci.uni-hannover.de](mailto:rgberger@lci.uni-hannover.de)



**Jens Schrader**, Jahrgang 1966, hat an in Braunschweig Biotechnologie studiert und in Dortmund promoviert. Postdoc-Aufenthalte absolvierte er am Karl-Winnacker-Institut in Frankfurt und an der University of California in Berkeley. Seit 2006 leitet er die Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik der Dechema, Schwerpunkte sind biotechnische Produktionsstrategien mit Mikro- und Molekularbiologie, Bioprozesstechnik und Bioelektrochemie. Im Jahr 2009 habilitierte er sich an der Universität Frankfurt. Seit 2012 ist er im Vorstand des Dechema-Forschungsinstituts.



**Wilfried Schwab**, Jahrgang 1961, hat Lebensmittelchemie in Würzburg studiert und 1989 promoviert. Postdoc-Aufenthalte absolvierte er in den USA, in Spanien und in den Niederlanden.

Von 1991 bis 1994 arbeitete er bei Hoechst, im Jahr 1999 habilitierte er. Im Jahr 2003 übernahm er die Degussa-Stiftungsprofessur Biomolekulare Lebensmitteltechnologie an der TU München. Seit 2008 ist er Professor für Biotechnologie der Naturstoffe an der TU München. Seine Arbeitsgebiete sind analytische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu Biosynthese, Metabolismus und Funktion von Biomolekülen.



**Matthias Wüst**, Jahrgang 1968, promovierte nach dem Studium der Lebensmittelchemie im Jahr 1999 an der Universität Frankfurt. Nach einem Postdoc-Aufenthalt am Institute of Biological Chemistry der Washington State University wurde er im Jahr 2003 Professor für Lebensmittelchemie an der Hochschule Wallis, Schweiz. Seit 2009 ist er Professor für Bioanalytik im Fachbereich Lebensmittelchemie an der Universität Bonn. Seine Hauptarbeitsgebiete sind Analytik und Biosynthese terpenoider Aromastoffe.



[matthias.wuest@uni-bonn.de](mailto:matthias.wuest@uni-bonn.de)  
**Holger Zorn** ist seit 2008 Professor für Lebensmittelchemie an der Universität Gießen. Zuvor hatte er eine Professur für technische Biochemie an der TU Dortmund inne. Nach dem Studium der Lebensmittelchemie in Karlsruhe promovierte er 1997 an der Universität Hohenheim, bevor er 1998 die zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker abschloss. Im Jahr 2003 habilitierte er sich an der Universität Hannover. Seine Hauptarbeitsgebiete sind die Lebensmitteltechnologie von Aromen und Enzyme sowie die Biotechnologie nachwachsender Rohstoffe.

