

Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Rüdiger Kaspera

Lebensmittelchemiker

geboren am 05. Mai 1974, in Oldenburg (Oldb.)

2004

Referent:	Prof. Dr. Dr. R.G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. T. Scheper
Tag der Promotion:	12.02.2004
Datum der Veröffentlichung:	Februar 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis Dezember 2003 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R.G. Berger angefertigt.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. R.G. Berger, meinem Doktorvater, für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Der gewährte Freiraum bei der Bearbeitung der Aufgaben sowie stete Diskussionsbereitschaft und hervorragende Arbeitsbedingungen waren die Grundsteine dieser Dissertation.

Ebenso gilt mein Dank:

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie, vor allem Herrn Dr. Krings für die Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik während und am Ende dieser Forschungsarbeit, oft eingebettet in motivierende und humorvolle Worte,

dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Projekts „Aktivitätsgesteuerte Biokonversion von Terpenkohlenwasserstoffen aus Abfallströmen zu Schlüsselaromen für Lebensmittel und Kosmetika“,

den Projektpartnern Herrn Dr. M. Müller der Degussa BioActives GmbH für die Unterstützung des Projekts und Herrn Dr. J. Schrader der Dechema e.V. für die vielen Diskussionen innerhalb der offiziellen Treffen. Insbesondere möchte ich Frau Silvia Schäfer für die enge Zusammenarbeit danken,

Herrn Prof. Dr. Tsevegsuren Nanzad, des Department of Organic and Food Chemistry der National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolei und Dipl.-Chem. Harald Mang der Karl-Franzens-Universität, Graz, Österreich, für Anregungen zur chemischen Synthese und Enzymtransformation

und dem Institut für Organische Chemie der Universität Hannover für die NMR-Messungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf jede Art und Weise unterstützt und deren Zuversicht und Vertrauen mir vieles erleichtert haben.

für meine Eltern und meinen Großvater

Zusammenfassung

Die selektive Biotransformation der Mono- und Sesquiterpene Limonen, (+)-Valencen und Farnesen mit Asco- und Basidiomyceten zu aromaaktiven Oxidationsprodukten wurde untersucht. Unterschiedliche Transformationssysteme wurden mit dem Ziel der Produktmaximierung eingesetzt.

In Submerskulturen wurde das cyclische Monoterpen *R*-(+)-Limonen von *Fusarium proliferatum* enantiospezifische zu *cis*-(+)-Carveol (ee >98,6%, Produktausbeute >35 mg L⁻¹), das Enantiomer *S*-(-)-Limonen überwiegend zum *trans*-(-)-Carveol transformiert. *trans*-(-)-Carveol wurde nachfolgend substratselektiv mit *Pleurotus sapidus* enantiomerenrein zu >200 mg L⁻¹ des korrespondierenden *R*-(-)-Carvons dehydrogeniert. Regioselektive Hydroxylierungsaktivitäten wurden bei der α -Terpineolgenese (*Penicillium citrinum*, 83% Regioselektivität, >80 mg L⁻¹ Produkt) und der Bildung von Perillaalkohol (*Gongronella butleri*, 60%, 16 mg L⁻¹) aus *R*-(+)-Limonen gezeigt.

Das bicyclische Sesquiterpen (+)-Valencen wurde von *Chaetomium globosum* in Submerskulturen zu Nootkaton über die stereoselektive Bildung von β -Nootkatol transformiert, wobei die isolierten geruchsaktiven Nebenprodukte Valencen-11,12-epoxid und β -Nootkatol sowie eine Aktivitätsinhibierung durch Proadifen auf eine Cytochrom-P450-Monooxygenase-katalysierte Oxidation hinwiesen. Eine Optimierung der Transformation wurde durch Variation der Substrat-, Sauerstoff- und Glucosezufuhr erfolgreich durchgeführt.

Biomassenkonzentrate von *C. globosum* zeigten bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Substratdosierung eine proportional zur Biomasse verlaufende Steigerung der Nootkatongenese bis auf 120 mg L⁻¹ (Ausbeute 0,5 mol% in 72 h). Da Nootkaton nur zu 20% aus dem Medium gewinnbar war, wurde eine extraktive Zweiphasenkultivierung mit 25% (v/v) *n*-Decan etabliert, die eine Nootkatonabtrennung von mehr als 95% aufwies.

Die regioselektive Oxidation des acyclischen Sesquiterpens Farnesen zu 7-Hydroxyfarnesen wurde ebenfalls von konzentrierten Kulturen von *C. globosum* katalysiert. Innerhalb von 24 h wurden 170 mg L⁻¹ des blumigen bis zitrusartigen Riechstoffs gebildet. Farnesendiole und -triole deuteten auf eine weitere Metabolisierung des Farnesens hin.

Lyophilisate zeigten als Biokatalysator beachtliche Steigerungen der molaren Umsatzrate und Produktkonzentration in erheblich verkürzter Transformationszeit. Mit einer Lyophilisierung des Mycels von *Pleurotus sapidus* wurde *R*-(+)-Limonen zu 160 mg L⁻¹ racemischen Carvons in 13 h transformiert (3,6 mol% Ausbeute).

Mit demselben Biokatalysator wurde die stereoselektiv über das β -Nootkatol (ee 78%) verlaufende Nootkatongenese auf bis zu 250 mg L⁻¹ (5,1 mol%) innerhalb von 13 h erheblich gesteigert.

Während durch Lyophilisierung instabile Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Ganzzellsystemen ihre Katalyseaktivität verloren (*C. globosum*, Nootkaton), wurde die Effizienz eines bestehenden Ganzzellsystems massiv gesteigert (*P. sapidus*, Carvon) und ein neuer produktiver Biokatalysator erschlossen (*P. sapidus*, Nootkaton). Die gewonnene Bioaktivität könnte auf NADH- und Cytochrom-P450 unabhängige Oxidasen zurückzuführen sein, die offensichtlich durch eine erhöhte Zellpermeabilität substratzugänglich werden.

Schlagwörter: Biotransformation, Terpene, Pilze, Nootkaton, *cis*-(+)-Carveol, 7-Hydroxyfarnesen, Lyophilisierung.

Abstract

The stereoselective biotransformation of mono- and sesquiterpenes limonene, (+)-valencene and farnesene to flavour-active terpenoids was investigated by using asco- and basidiomycetes. Different transformation systems were applied for increased productivity of bio-catalysts.

In submerged cultures *Fusarium proliferatum* transformed *R*-(+)-limonene enantiospecifically to *cis*-(+)-carveol (ee 98.6%, >35 mg L⁻¹ product yield) and *S*-(-)-limonene predominantly to *trans*-(-)-carveol. *trans*-(-)-carveol was substrate-selectively dehydrogenised by *Pleurotus sapidus* to more than 200 mg L⁻¹ of the corresponding enantiopure *R*-(-)-carvone. Further regioselective hydroxylations of *R*-(+)-limonene were observed by the genesis of α -terpineol (*Penicillium citrinum*, 83% regioselectivity, >80 mg L⁻¹ product yield) and perillic alcohol (*Gongronella butleri*, 60%, 16 mg L⁻¹).

Submerged cultures of *Chaetomium globosum* transformed the bicyclic sesquiterpene (+)-valencene to nootkatone via the stereoselective generation of β -nootkatol. The occurrence of the isolated flavour-active by-products valencen-11,12-epoxide and β -nootkatol as well as the observed enzyme inhibition using proadifen suggested for a cytochrome-P450-monooxygenase catalysed hydroxylation. The transformation was successfully optimised for substrate dosage, oxygen and glucose supply.

Biomass-concentration of *C. globosum* and higher dosage of substrate led to a proportional increase in nootkatone genesis of up to 120 mg L⁻¹ in 72 h (product yield 0.5 mol%). Because only 20% of nootkatone were released into the culture media, a two-phase cultivation with 25% (v/v) *n*-decan for product extraction was established, leading to a product separation of 95%.

The regioselective oxidation of the acyclic sesquiterpenoid farnesene to 7-hydroxyfarnesene was catalysed by concentrated cultures of *C. globosum*. Within 24 h 170 mg L⁻¹ of the flowery to citrus-like aroma 7-hydroxyfarnesene was generated. Farnesendiols and -trials occurred as further metabolites.

Lyophilisation of mycelium showed remarkable enhancement in molar yields and product concentrations in considerable reduced transformation time. The lyophilisate of *Pleurotus sapidus* transformed *R*-(+)-limonene to 160 mg L⁻¹ racemic carvone (3.6 mol% product yield in 13 h). With the same bio-catalyst the nootkatone genesis was increased to 250 mg L⁻¹ (5.1 mol%) in 13 h running stereoselectively through β -Nootkatol (ee 78%).

Whereas unstable cytochrome-P450-monooxygenases lose their catalytic activity during lyophilisation (*C. globosum*, Nootkaton) the efficiency of an existing whole-cell system was significantly increased (*P. sapidus*, Carvon), and a new and productive bio-catalyst was created (*P. sapidus*, Nootkaton). The attained bio-activity may be caused by a NADH- and Cytochrom-P450-independent oxidase, which presumable becomes accessible due to increased cell permeabilisation.

Key words: biotransformation, terpene, fungi, nootkatone, *cis*-(+)-carveol, 7-hydroxyfarnesene, lyophilisation.

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schäfer, S., Kaspera, R., Krings, U., Schrader, J., Sell, D., Berger, R.G. (2003) Sensorgestützte Biokonversion zur Gewinnung natürlicher terpenoider Aromastoffe. *Lebensmittelchemie*, 57(1): 15.

Kaspera, R., Krings, U., Onken, J., Berger, R.G. (2003) Stereospecific allylic oxidation of limonene: A route to pure (S)-(+)-Carvone; ed. Le Quéré, J.L., Étievant, P.X: 10th Weurman Flavour Symposium 2002, Beaune, France, Intercept STM Publishers.

Kaspera, R., Krings, U., Onken, J., Berger, R.G. (2002) Biotechnologische Gewinnung enantiomerenreiner Carvone. *Lebensmittelchemie*, 56(4):76-77.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung	4
2 Ergebnisse	5
2.1 Entwicklung einer DC-Schnellmethode zur Identifizierung von Terpenoiden	5
2.1.1. <i>Identifizierung von Terpenoiden durch Fluoreszenzmarkierung</i>	5
2.1.2. <i>Erfassung von Carvon und Nootkaton im Screeningverfahren</i>	6
2.2 Biotransformation des Monoterpens Limonen	9
2.2.1 <i>Chemische Oxidation von Limonen</i>	9
2.2.2 <i>Stammsscreening: Transformationsleistung verschiedener Mikroorganismen</i>	10
2.2.2.1 Übersicht über Hydroxylierungsaktivitäten der untersuchten Mikroorganismen	10
2.2.2.2 Regioselektive Bildung von Terpenalkoholen.....	13
2.2.2.3 Bildung sensorisch relevanter Aldehyde und Ketone	14
2.2.2.4 Bildung von Linalool und Linalooloxid	15
2.2.2.5 Bildung von Epoxiden und Reduktionsprodukten.....	16
2.2.2.6 Bildung weiterer Minorprodukte.....	16
2.2.3 <i>Kinetik der α-Terpineolgenese durch <i>Penicillium citrinum</i></i>	18
2.2.4 <i>Limonenkonversion zu Isopiperiton und Perillaaldehyd mittels <i>Pleurotus lampas</i></i>	18
2.2.5 <i>Stereoselektive Biogenese von Carveol</i>	20
2.2.5.1 Stereochemie der Carveolbildung bei ausgewählten Basidiomyceten und Ascomyceten.....	20
2.2.5.2 Kinetik der Carveolbiogenese mit verschiedenen Basidiomyceten und <i>Fusarium proliferatum</i>	22
2.2.6 <i>Transformation des Terpenalkohols (-)-Carveol mit <i>P. sapidus</i></i>	24
2.2.7 <i>Lokalisierung der Limonenbiotransformation</i>	27
2.2.7.1 Transformation mit Kulturüberständen aus <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Fusarium proliferatum</i>	27

2.2.7.2 Isolierung transformationsrelevanter Enzyme von <i>F. proliferatum</i> und <i>P. sapidus</i>	27
2.2.7.3 Enzymextraktion mit anschließender Solubilisierung	28
2.2.7.4 Transformation der Substrate Limonen, Thymol und Dimethylallylalkohol mit Kulturüberständen ausgewählter Kulturen	30
2.2.8 Transformation mit Lyophilisaten	33
2.2.8.1 Transformation mit Lyophilisaten verschiedener Kulturen.....	33
2.2.8.2 Einfluss von Cosolventien auf die Transformation mit Lyophilisaten.....	35
2.3 Biokonversion des Sesquiterpens Valencen	37
2.3.1 Autoxidation von (+)-Valencen.....	37
2.3.3 Transformation von (+)-Valencen mit <i>Chaetomium globosum</i> : Kinetik der Produktbildung und -degradation	39
2.3.4 Identifizierung von Valencentransformationsprodukten	42
2.3.4.1 Valencen-11,12-epoxids (30)	43
2.3.4.2 α - und β -Nootkatol (2-Hydroxyvalencen, 31a bzw. 31b)	46
2.3.4.3 (+)-Nootkaton (32).....	48
2.3.4.4 Nootkaton-11,12-epoxid (33) und Oxidationsprodukt 34	48
2.3.4.5 Partielle Identifizierung weiterer Oxidationsprodukte (35-38).....	51
2.3.5 Sensorische Bewertung der Transformationsmetaboliten	54
2.3.6 Verteilung von Substrat und Produkten in Medium und Mycel	55
2.3.7 Transformation im Rührkesselreaktor	57
2.3.8 Charakterisierung der Nootkatongenese	61
2.3.8.1 Stereochemie der Nootkatolbildung	61
2.3.8.2 Laccase katalysierte Transformation von (+)-Valencen zum Nachweis des Valencen-2-hydroperoxids	62
2.3.8.3 Induktor-/Repressorstudien	64
2.3.9. Optimierung der Valencenbiotransformation.....	66
2.3.9.1 Transformation mit verminderter Glucoseversorgung	66
2.3.9.2. Verfügbarkeit von Sauerstoff	67
2.3.9.3 Substratzuführung in Emulsionen.....	69
2.3.9.4 Substratdosierung über den Dampfraum	71
2.3.9.5 Dosierung unterschiedlicher Substratmengen.....	71
2.3.9.6 Korrelation von Biomasse und Nootkatonbildung.....	73
2.3.9.7 Kinetik der Transformation mit erhöhten Zelldichten und hoher Substratdosierung	74
2.3.9.8 Optimierung der Substratdosierung in Kultivierungen mit erhöhten Zelldichten.....	75

2.3.10 Induktion und Adaptation von Transformationskulturen.....	78
2.3.10.1 Adaptation von Vorkulturen mit (+)-Valencen.....	78
2.3.10.2 Co-induktiver Effekt von Limonen.....	79
2.3.11 Zweiphasen-Kultivierungen mit <i>n</i> -Decan	81
2.3.12 Transformation mit Lyophilisaten	84
2.3.12.1 Aktivitätsscreening mit Lyophilisaten.....	84
2.3.12.2 Bildungskinetik von Oxidationsprodukten mit Lyophilisaten von <i>Pleurotus sapidus</i>	85
2.3.12.3 Optimierung der Substratdosierung.....	87
2.3.12.4 Cofaktorabhängige Transformation und Einfluss von Medienbestandteilen ..	88
2.4. Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen.....	90
2.4.1 Transformationsleistung verschiedener Mikroorganismen.....	90
2.4.2 Transformationsleistung mit konzentrierten Kulturen.....	91
2.4.3 Sensorische Bewertung von Farnesenoxidationsprodukten	92
2.4.4 Kinetik der Farnesentransformation mit <i>C. globosum</i>	92
2.4.5 Identifizierung der Transformationsmetabolite von Farnesen	94
2.4.5.1 Identifizierung des (<i>all</i> -Z)-7-Hydroxyfarnesen (45).....	94
2.4.5.2 Identifizierung weiterer Transformationsprodukte	98
2.4.6 Farnesentransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen	100
3 Diskussion.....	102
3.1 Biosynthese und Bedeutung von Mono- und Sesquiterpenoiden.....	102
3.1.1 Biosynthese der Isoprengrundbausteine.....	102
3.1.2 Cyclisierungsmechanismen	103
3.1.3 Physiologische Bedeutung von natürlichen Sesquiterpenoiden	104
3.1.4 Terpene als charakteristische Aromastoffe (<i>character-impact-compounds</i>) ...	105
3.2 Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen	108
3.2.1 Vorteile der Aromenherstellung durch Biotransformation	108
3.2.2 Rohstoffquellen	109
3.2.3 Auswahl von Biokatalysatoren	110
3.2.4 Mechanismus der Terpenmetabolisierung.....	111
3.2.4.1 Extrazelluläre Oxidasen.....	112
3.2.4.2 Zelluläre Oxidasen.....	112
3.2.4.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen (Cy-P450).....	113
3.2.4.4 Mikrobielle Terpententransformationen	116
3.2.5 Blindwertproblematik.....	116
3.2.6 Identifizierung von Terpenoxidationsprodukten mittels Massenspektroskopie	117

3.3 Transformationsreaktionen	122
3.3.1 <i>Nicht-selektive Terpenttransformationen</i>	122
3.3.1.1 Transformation von Limonen	122
3.3.1.2 Transformation von (+)-Valencen	125
3.3.1.3 Transformation von Farnesen	130
3.3.2 <i>Regio- und enantioselektive Terpenttransformationen</i>	133
3.3.2.1 Regioselektive Limonentransformationen	133
3.3.2.2 Regioselektive Farnesentransformation	134
3.3.2.3 Enantioselektive Limonentransformation.....	135
3.3.2.4 Substratselektive Dehydrogenierung von Carveol	139
3.3.2.5 Enantioselektive Valencentransformation	142
3.4 Bioprozessrelevante Untersuchungen zur Valencentransformation	146
3.4.1 <i>Probleme der Terpenbiotransformation</i>	146
3.4.2 <i>Substratdosierungsstrategien</i>	148
3.4.3 <i>Verteilungsdynamik im Transformationssystem.....</i>	151
3.4.3.1 Verteilungsdynamik in wässrigen Systemen	151
3.4.3.2 Verteilungsdynamik in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen.....	153
3.4.4 <i>Nährstoffversorgung und Cometabolisierungseffekte</i>	156
3.4.4.1 Nährstoffversorgung und Sauerstoffbedarf	156
3.4.4.2 Cometabolisierungseffekte	159
3.4.5 <i>Kulturvorbearbeitungen und Konzentrierungen.....</i>	160
3.4.5.1 Biokonzentrate.....	160
3.4.5.2 Kulturvorbearbeitungen	161
3.4.6 <i>Konversionsraten in Terpenttransformationen</i>	162
4 Ausblick.....	165
5. Experimenteller Teil	167
5.1 Materialien und Chemikalien	167
5.1.1 <i>Organismen.....</i>	167
5.1.1.1 Kommerziell erhältliche Mikroorganismen	167
5.1.1.2 Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate)	169
5.1.2 <i>Chemikalien</i>	170
5.1.3 <i>Lösungsmittel</i>	173
5.1.4 <i>Gase.....</i>	173
5.1.5 <i>Geräte und sonstige Hilfsmittel</i>	174
5.1.6 <i>Bioreaktor.....</i>	175
5.2 Kultivierung von Transformationskulturen.....	176
5.2.1 <i>Kulturmedien</i>	176

5.2.1.1 SNL-Standardmedium (Sprecher und Hanssen, 1982).....	176
5.2.1.2 Supplementiertes Medium.....	176
5.2.1.3 Glucosearme Kulturführung.....	176
5.2.1.4 SNLH-Agar	176
5.2.2 Kulturführung.....	176
5.2.2.1 Stammkultivierung.....	176
5.2.2.2 Gefrierkulturen.....	176
5.2.2.3 Homogenisieren von Kulturen	177
5.2.2.4 Vorkulturen	177
5.2.2.5 Vorkulturen mit Substratadaptation	177
5.2.2.6 Experimentalkulturen.....	177
5.2.2.7 Kultivierung als Biokonzentrat	177
5.2.2.8 Kultivierung mit <i>R-(+)</i> -Limonen bzw. Decan.....	177
5.2.2.9 Kultivierung im Bioreaktor.....	178
5.2.3 Dosierung von Transformationssubstraten und Inhibitoren	178
5.2.3.1 Direkte Substratdosierung in das Kulturmedium	178
5.2.3.2 Direkte Substratdosierung mit Tensidzusatz	178
5.2.3.3 Substratdosierung in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen und Biokonzentraten	178
5.2.3.4 Substratdosierung über die Gasphase	179
5.2.3.5 Durchführung der Sauerstoffbegasung im Kulturkolben.....	179
5.2.3.6 Dosierung des Terpenalkohols Carveol	179
5.2.3.7 Zugabe der Inhibitoren DABCO und Proadifen sowie von Eisen(III)Ionen....	179
5.2.3.8 Blindwerte.....	180
5.3 Enzymatische Transformationen	180
5.3.1 Transformationen mit Exoenzymen	180
5.3.1.1 Gewinnung von Exoenzymen.....	180
5.3.1.2 Nachweis von Oxidationsaktivitäten.....	180
5.3.2 <i>R-(+)</i> -Limonen-Transformation mit Rohextrakten	181
5.3.2.1 <i>R-(+)</i> -Limonen-Transformation mit Rohextrakten aus induzierter Biomasse von <i>P. sapidus</i> und <i>F. proliferatum</i>	181
5.3.2.2 <i>R-(+)</i> -Limonen-Transformation mit <i>solubilisierten</i> Rohextrakten aus induzierten Kulturen von <i>P. sapidus</i> und <i>F. proliferatum</i>	181
5.3.3 (+)-Valencentransformation mit Laccasen aus <i>Trametes spec.</i>	182
5.4 Terpentransformation mit Lyophilisaten.....	182
5.4.1 Herstellung von Lyophilisaten	182
5.4.2 Transformationsversuche mit Lyophilisaten.....	182

5.5 Analytik	183
5.5.1 <i>Probenahmeverfahren</i>	183
5.5.1.1 Probenahme in Transformationsversuchen.....	183
5.5.1.2 Probenahme in Optimierungsversuchen	183
5.5.1.3 Probenahme aus dem Bioreaktor	183
5.5.1.4 Untersuchung der Bioreaktor-Abluft	183
5.5.2 <i>Bestimmung von Kulturparametern</i>	183
5.5.2.1 Bestimmung der Zellmasse	183
5.5.2.2 Glucosegehalt.....	184
5.5.2.3 Bestimmung des pH-Wertes.....	184
5.5.2.4 Prüfung auf Wasserstoffperoxid	184
5.5.2.5 Prüfung auf Kontaminationen	184
5.5.3 <i>Probenvorbereitung für die Gaschromatographie</i>	184
5.5.3.1 Extraktion von Kulturüberständen	184
5.5.3.2 Mikroextraktion („LPME – Liquid phase micro extraction“).	185
5.5.3.3 Extraktion der Gesamtkultur	185
5.5.3.4 Aufarbeitung von Pilzmycel zur Bestimmung der Edukt- und Produktverteilung	185
5.5.3.5 SPME–Extraktion	185
5.6 Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen	186
5.7 Chemische Synthesen	186
5.7.1 <i>Epoxidierung von (+)-Valencen mit m-Chlorperbenzoesäure</i>	186
5.7.2 <i>Oxidation von (+)-Valencen zu Nootkaton</i>	187
5.7.3 <i>Reduktion von Nootkaton zu α- und β-Nootkatol</i>	187
5.7.4 <i>Epoxidierung von Nootkaton bzw. Nootkatol mit m-Chlorperbenzoesäure</i>	188
5.8 Derivatisierungen	188
5.8.1 <i>Derivatisierung mit Dansylhydrazon zur DC Analyse (Anderson, 1985)</i>	188
5.8.2 <i>Silylierung für die Gaschromatographie</i>	188
5.9 Chromatographie	189
5.9.1 <i>Säulenchromatographie: Adsorptionschromatographie an Kieselgel</i>	189
5.9.2 <i>Kapillargaschromatographie (HRGC)</i>	189
5.9.2.1 HRGC mit On-Column-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID)	189
5.9.2.2 HRGC mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID) für silylierte Proben und SPME-Desorption.....	190
5.9.2.3 HRGC mit On-Column-Injektion zur chiralen Trennung	190
5.9.2.4 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O).....	191

5.9.2.5 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)	191
5.9.2.6 Präparative Gaschromatographie	192
5.9.2.7 Berechnung von Kovats-Indices	193
5.9.2.8 Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee)	193
5.9.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	193
5.9.3.1 HPLC-DAD-ELSD (serielle Kopplung Diodenarraydetektor und Evaporative Light Scanning Detector)	193
5.9.3.2 HPLC-MS (Kopplung Massenspektrometer)	194
5.10 UV/VIS-Spektroskopie	194
5.11 NMR-Spektroskopie	194
5.12 Entsorgungshinweise	195
6 Literaturverzeichnis	196
7 Anhang	207
Lebenslauf	214

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Derivatisierung von Ketonen oder Aldehyden zu Dansylhydrazonen.	5
Abbildung 2-2:	Dünnschichtchromatographische Trennung der Dansylhydrazone von ausgewählten Terpenoiden.	6
Abbildung 2-3:	Kalibrierung der Dansylderivate von Carvon und Nootkaton.	7
Abbildung 2-4:	Bildung von Carveol und Carvon durch Autoxidation von <i>R</i> -(+)-Limonen.	9
Abbildung 2-5:	Angestrebte Biotransformationsprodukte aus <i>R</i> -(+)-Limonen: Carveol und Carvon.	10
Abbildung 2-6:	Oxidative Aktivität der Kulturen als Summe der oxyfunktionalisierten Transformationsprodukte aus <i>R</i> -(+)-Limonen nach 96 h Transformationszeit.	12
Abbildung 2-7:	Produkte, Ausbeuten und Regioselektivitäten (<i>rs</i>) der Hydroxylierung von <i>R</i> -(+)-Limonen zu Terpenalkoholen mit ausgewählten Stämmen nach 96 h Submerskultivierung.	13
Abbildung 2-8:	Umlagerungsprodukte <i>p</i> -Mentha-1(7)8-dien-2-ol und <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol aus <i>R</i> -(+)-Limonen.	14
Abbildung 2-9:	Oxidation von <i>R</i> -(+)-Limonen an C3 zu Isopiperitenol, Isopiperitenon und Piperiton.	15
Abbildung 2-10:	Bildung von Linalooloxid aus 3 über Linalool.	15
Abbildung 2-11:	Produkte aus Epoxidierung und Dehydrogenierung von <i>R</i> -(+)-Limonen.	16
Abbildung 2-12:	Minorprodukte der Limonentransformation: Sabinenhydrat, 1,8-Hydroxycineol und Pulegon.	16
Abbildung 2-13:	Kinetik der α -Terpineolbildung aus <i>R</i> -(+)-Limonen mittels <i>P. citrinum</i> , der korrelierenden Biotrockenmasse und der durch Autoxidation bei pH 4 gebildeten Terpeneolmenge.	18
Abbildung 2-14:	Transformationsprodukte aus <i>R</i> -(+)-Limonen mit <i>P. lampas</i> mit Produktkonzentrationen im Schüttelkolben.	19
Abbildung 2-15:	Vier mögliche Carveolisomere, die aus <i>R</i> -(+)-Limonen gebildet wurden.	20
Abbildung 2-16:	Menge der Carveolgesamtgehalte in Basidiomyceten und der Verteilung der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Isomere in 96 h Transformationszeit.	21
Abbildung 2-17:	Stereoisomerenverteilungen für die Carveolbildung bei <i>C. cochloides</i> , <i>C. globosum</i> , <i>Pleurotus sapidus</i> nach 92 h Transformationszeit.	21
Abbildung 2-18:	Stereospezifische Carveolbildung aus <i>R</i> -(+)- bzw. <i>S</i> -(-)-Limonen mit <i>F. proliferatum</i> .	22
Abbildung 2-19:	Anteil des <i>cis</i> -Carveol am Gesamtcarveolgehalt während der Biotransformation mit Basidiomyceten und Ascomyceten im Vergleich zur autoxidativen Bildung.	23
Abbildung 2-20:	Kinetischer Verlauf der Bildung der Carveolisomere mit <i>F. proliferatum</i> aus <i>R</i> -(+)-Limonen.	23
Abbildung 2-21:	Genese der Carveolisomere mit <i>F. proliferatum</i> nach Zugabe von 3 mM <i>S</i> -(-)-Limonen.	24
Abbildung 2-22:	Kinetik der Bildung der Transformationsprodukte aus (-)-Carveol mit <i>P. sapidus</i> .	25
Abbildung 2-23:	Oxidationsprodukte und Reduktionsprodukte des (-)-Carveols.	26
Abbildung 2-24:	Oxidationsprodukte von Limonen mit Kulturüberständen aus <i>P. sapidus</i> .	31
Abbildung 2-25:	Hydroxylierung von Limonen mit Kulturüberständen aus <i>A. niger</i> .	31
Abbildung 2-26:	Produkte der Limonentransformation mit Lyophilisaten aus <i>P. sapidus</i> .	34
Abbildung 2-27:	Transformation mit Lyophilisaten von <i>P. sapidus</i> in DMF und <i>n</i> -Decan.	35
Abbildung 2-28:	Autoxidation von (+)-Valencen im 200 mL Schüttelkolben.	37

Abbildung 2-29:	Transformation von (+)-Valencen zu den Verbindungen β -Nootkatol, Nootkaton 11,12-Epoxynootkaton und Valencen-11,12-epoxid mit <i>C. globosum</i> .	39
Abbildung 2-30:	Kinetik der Bildung von Nootkaton und weiteren Produkten und der Abbau von (+)-Valencen durch <i>C. globosum</i> .	40
Abbildung 2-31:	Wachstum und Glucoseverbrauch mit und ohne Valencenzugabe.	41
Abbildung 2-32:	GC-Chromatogramm eines Extraktes der Valencentransformation auf polarer Trennsäule (CW 20 M).	43
Abbildung 2-33:	^1H -NMR des Valencen-11,12-epoxids.	45
Abbildung 2-34:	^{13}C -NMR-Spektrum des Valencen-11,12-epoxids.	45
Abbildung 2-35:	Chromatographische Trennung der Isomere des Valencen-11,12-epoxids auf CW 20 M.	46
Abbildung 2-36:	Massenspektrum des β -Nootkatols als Synthese- und Biotransformationsprodukt.	47
Abbildung 2-37:	Massenspektrum von Nootkaton-11,12-epoxid.	48
Abbildung 2-38:	Massenspektrum von Nootkatonepoxid aus der Transformation von Valencen mit <i>C. globosum</i> .	49
Abbildung 2-39:	^{13}C -NMR-Spektrum von Nootkaton-11,12-epoxid.	50
Abbildung 2-40:	^1H -NMR-Spektrum von Nootkaton-11,12-epoxid.	51
Abbildung 2-41:	Gaschromatographische Trennung der mehrfach oxidierten Produkte im Extrakt aus Transformationsansatz auf DB5 nach Silylierung.	52
Abbildung 2-42:	Valencendiol 1 und 2, silyliert.	52
Abbildung 2-43:	Massenspektrum des Valencendiol 1.	53
Abbildung 2-44:	Massenspektrum des Valencendiol 2.	53
Abbildung 2-45:	Verteilung von Valencen und dessen Biogeneseprodukten in den genannten Fraktionen.	56
Abbildung 2-46:	Lichtmikroskopische Aufnahme des Mycels von <i>Chaetomium globosum</i> am 7. Transformationstag mit eingelagerten Valencentröpfchen.	57
Abbildung 2-47:	Lichtmikroskopische Aufnahme des Mycels von <i>Chaetomium globosum</i> .	57
Abbildung 2-48:	Kultivierungsparameter von <i>C. globosum</i> während der Transformation von (+)-Valencen.	58
Abbildung 2-49 A und B:	Ansätze von submerser Konidiosporenbildung und verdickter Mycelwand in Submerskulturen von <i>C. globosum</i> , 1:500.	59
Abbildung 2-50:	Vereinzeltetes Mycel („Trübungseffekt“, 1:200).	59
Abbildung 2-51:	Nootkatonbiogenese und Weiteroxidation zum Hydroxynootkaton.	60
Abbildung 2-52:	Vergleich der Gaschromatogramme aus Valencentransformation mit <i>C. globosum</i> , Laccase (<i>Trametes spec.</i>) und chemischer Synthese von α -/ β -Nootkatol.	61
Abbildung 2-53:	LC-Chromatogramm des Extraktes aus Valencentransformation mit <i>C. globosum</i> .	63
Abbildung 2-54:	Valencentransformation unter Zugabe eines Cytochrom-P450-Monooxygenase Inhibitors Proadifen.	65
Abbildung 2-55:	Kinetik der Produktbildung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.	67
Abbildung 2-56:	Korrelation von $A \cdot V^{-1}$ zum Nootkatongehalt und Produktausbeute pro Trockenmasse nach 96 h.	68
Abbildung 2-57:	Vergleich der Kulturführung mit Sauerstoffanreicherung zum chemischen Blindwert, Stickstoffanreicherung und Kontrollkultur.	69
Abbildung 2-58:	Transformationsleistung und Trockenmasse 96 h nach erster Substratzugabe von 1,8 mM (+)-Valencen.	70
Abbildung 2-59:	Valencentransformation mit unterschiedlicher Dosierung der Substratmengen in Submerskultivierung.	72

Abbildung 2-60:	Biotransformation von (+)-Valencen nach 48 h mit Biokonzentraten unterschiedlicher Biofeuchtmasse.	73
Abbildung 2-61:	Biotransformation von Valencen mit <i>C. globosum</i> im Biokonzentrat.	74
Abbildung 2-62:	Chemische Bildung von Nootkaton im Standardmedium	75
Abbildung 2-63:	Valencentransformation in konzentrierten Kulturen mit unterschiedlicher Substratdosierung nach 72 h.	76
Abbildung 2-64:	Vergleich der Nootkatonbiogenese von adaptierter zu nicht adaptierter <i>C. globosum</i> Submerskultur.	78
Abbildung 2-65:	Zeitabhängige Nootkatonbildung mit <i>C. globosum</i> bei unterschiedlichen Limonenkonzentrationen in Submerskultur.	79
Abbildung 2-66:	Bildung von Nootkaton und der Limonentransformationsprodukte in Abhängigkeit zur Limonenkonzentration bei <i>C. globosum</i> nach 72 h Transformation in Submerskultur.	80
Abbildung 2-67:	Nootkatonbildung unter Zusatz der jeweiligen Decanmengen bei <i>C. globosum</i> im Zweiphasensystem.	81
Abbildung 2-68:	Verteilung der absoluten Nootkatonmenge in wässriger und organischer Phase im Zweiphasensystem.	82
Abbildung 2-69:	Produkte der Oxidation von (+)-Valencen mit <i>Chaetomium globosum</i> (CGL), <i>Pleurotus ostreatus</i> (POS) und <i>Pleurotus sapidus</i> (PSA).	84
Abbildung 2-70:	Kinetik der Genese von Nootkaton und der Nootkatole mit Lyophilisaten aus <i>P. sapidus</i> .	85
Abbildung 2-71:	Transformation von Valencen mit Lyophilisaten aus <i>P. sapidus</i> unter Zugabe verschiedener Substratmengen.	86
Abbildung 2-72:	Transformation mit Lyophilisaten von <i>P. sapidus</i> mit unterschiedlicher Substratdosierung.	87
Abbildung 2-73:	Abhängigkeit der Valencentransformation mit Lyophilisaten aus <i>P. sapidus</i> von Cofaktoren und Medienbestandteilen.	88
Abbildung 2-74:	Produktbildung aus der Farnesenbiotransformation (Screening).	91
Abbildung 2-75:	Produktbildungskinetik der Farnesenbiotransformation mit <i>C. globosum</i> .	93
Abbildung 2-76:	Bildungskinetik der Autoxidationsprodukte aus Farnesen.	93
Abbildung 2-77:	¹³ C-NMR-Spektrum des 7-Hydroxyfarnesens.	95
Abbildung 2-78:	7-Hydroxyfarnesen mit stereochemischer <i>all-Z</i> -Orientierung.	95
Abbildung 2-79:	¹ H-NMR-Spektrum des 7-Hydroxyfarnesens.	96
Abbildung 2-80:	Massenspektrum des 7-Hydroxyfarnesens.	97
Abbildung 2-81:	Massenspektrum des 7-Hydroxyfarnesens im silylierten Zustand mit Fragmentierung.	99
Abbildung 2-82:	Massenspektrum des 9-Hydroxyfarnesens im silylierten Zustand mit Fragmentierung.	100
Abbildung 3-1:	Biosynthese der Mono- und Sesquiterpene über den Mevalonat-Weg.	102
Abbildung 3-2:	Biosynthese des Limonen über das intermediäre α -Terpenylkation.	103
Abbildung 3-3:	Biosynthese des Sesquiterpens (+)-Valencen.	103
Abbildung 3-4:	Physiologisch wirksame Sesquiterpene mit Eremophilangerüst.	104
Abbildung 3-5:	Biotransformation von <i>R</i> -(+)-Limonen zu Perillasäure und α -Terpineol.	109
Abbildung 3-6:	Katalytischer Zyklus einer Cytochrom-P450-Monooxygenase.	114
Abbildung 3-7:	Modell einer Cytochrom-P450-Monooxygenase aus dem Endoplasmatischen Reticulum.	115
Abbildung 3-8:	Fragmentierungsmechanismen der Valencendirole.	119
Abbildung 3-9:	Abspaltung des Trimethylsilanols aus 9-Hydroxyfarnesens.	120
Abbildung 3-10:	Homolytische und heterolytische α -Spaltung des 9-Hydroxyfarnesens.	120
Abbildung 3-11:	α -Spaltung des 9-Hydroxyfarnesens und Entstehung des Moleküliions <i>m/z</i> 134.	120

Abbildung 3-12:	Mikrobielle Abbauege von Limonen.	123
Abbildung 3-13:	Mögliche allylische Umlagerung der 1,2-Doppelbindung zum 2,8-Menthen-1-ol.	124
Abbildung 3-14:	Mögliche Entstehung von Linalool aus α -Terpineol.	125
Abbildung 3-15:	Metabolisierung von (+)-Valencen durch <i>Chaetomium globosum</i> .	126
Abbildung 3-16:	Biokatalytische Oxidation von (+)-Valencen über α -/ β -Nootkatol zu Nootkaton und weiteren Produkten mit <i>Aspergillus niger</i> .	127
Abbildung 3-17:	Bildung des Valencen-2-hydroperoxid über eine Laccase-katalysierte Oxidation.	129
Abbildung 3-18:	Isomere des Farnesen und deren terminale Oxidation zum (all-E)- α -Sinensal und β -Sinensal.	130
Abbildung 3-19:	Metabolisierung von Farnesen mit <i>C. globosum</i> .	131
Abbildung 3-20:	Oxidationsprodukte aus sulfoniertem Farnesen.	131
Abbildung 3-21:	Postulierter Bildungsweg des 7-Hydroxyfarnesens.	135
Abbildung 3-22:	Überführung von Limonen in alle vier möglichen Carveolkonfigurationsisomere über ein intermediäres Carbokation/Radikal.	136
Abbildung 3-23:	Dreidimensionale, planare Strukturen der Carveolisomere..	136
Abbildung 3-24:	Mögliche Substratorientierung in einem Enzym-Substrat-Komplex mit <i>R</i> -(+)-Limonen als Substrat relativ zum zentralen Eisenatom im Häm.	138
Abbildung 3-25:	Nicht-dissoziative Enzymkinetik.	139
Abbildung 3-26:	Herstellung von enantiomerenreinem Carvon durch enantioselektive Hydroxylierung des Substrates Limonen und nachfolgender Dehydrogenierung.	140
Abbildung 3-27:	Produkte der Carveoltransformation.	141
Abbildung 3-28:	Transformation von (+)-Valencen über das β -Nootkatol mit Mikrosomen aus <i>Cichoriae sp.</i>	143
Abbildung 3-29:	Dreidimensionale Strukturen der Nootkatole.	144
Abbildung 3-30:	Modell der Metabolisierung von (+)-Valencen mit anschließender Freisetzung der Oxidationsprodukte.	152
Abbildung 7-1:	Massenspektrum des 4-Hydroxy-mentha-1,8-dien.	210
Abbildung 7-2:	Massenspektrum von Hydroxynootkaton und überlagerten Produkten im CI.	213
Abbildung 7-3:	Spektrum aus APCI-MS vom Diol oder Hydroperoxid der Valencenbiotransformation.	213

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Ergebnisse der Limonenumsetzung mit Rohextrakten.	28
Tabelle 2-2:	Produktbildung in den zellulären Fraktionen nach Zellaufschluss.	29
Tabelle 2-3:	Transformationsprodukte aus der Umsetzung der Kulturüberstände von <i>P. sapidus</i> .	31
Tabelle 2-4:	Oxidationsprodukte aus Limonentransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen.	33
Tabelle 2-5:	Stereochemische Analyse der Transformationsprodukte aus der Umsetzung von <i>R</i> -(+)-Limonen mit Lyophilisaten aus <i>P. sapidus</i> und <i>P. ostreatus</i> .	34
Tabelle 2-6:	Kulturen mit einer gebildeten Nootkatonmenge von mehr als 1 mg L ⁻¹ .	38
Tabelle 2-7:	Transformationsprodukte der Valencenkonversion.	42
Tabelle 2-8:	NMR-Strukturdaten des Valencen-11,12-epoxids.	44
Tabelle 2-9:	NMR-Daten des Nootkaton-11,12-epoxid.	50
Tabelle 2-10:	Geruchsqualität und Geruchsschwelle der Valencenoxidationsprodukte (GC-O).	54
Tabelle 2-11:	Nootkatol- und Nootkatonbildung durch Laccase aus <i>Trametes spec.</i>	62
Tabelle 2-12:	Vergleich der Valencenbikonversionen in Submerskultivierungen und Biokonzentraten von <i>C. globosum</i> mit Lyophilisaten von <i>P. sapidus</i> .	87
Tabelle 2-13:	Produkte der Farnesentransformation mit Aromaeindruck (GC-O).	92
Tabelle 2-14:	¹³ C- und ¹ H-Spektroskopische Daten für 7-Hydroxyfarnesen im Vergleich zu berechneten Daten nach dem Inkrement-System.	94
Tabelle 2-15:	Bestimmung der silylierten Transformationsprodukte von <i>C. globosum</i> nach 96 h Transformationszeit mit Struktureigenschaften.	98
Tabelle 2-16:	Terpententransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen.	100
Tabelle 3-1:	Vorkommen und Geruchsschwellen von aus Limonen, Valencen und Farnesen abgeleiteten Aromaverbindungen in Zitrusfrüchten und Gewürzen.	107
Tabelle 3-2:	Terpenkohlenwasserstoffe aus regenerierbaren Rohstoffen.	110
Tabelle 3-3:	Auswahl von Biokatalysatoren zur Modifikation von Monoterpenoiden.	116
Tabelle 3-4:	Transformationen von (+)-Valencen in Zellsystemen.	128
Tabelle 3-5:	Probleme der Terpenbiotransformation und untersuchte Lösungsmöglichkeiten.	147
Tabelle 3-6:	LogP _{OW} und Wasserlöslichkeit der Terpensubstrate und verwendeter Lösungsmittel.	149
Tabelle 3-7:	Verteilungskoeffizienten der Oxidationsprodukte im Vergleich zum Precursor.	151
Tabelle 3-8:	Gegenüberstellung der gefundenen Transformationen mit literaturbekannten Ganzzelltransformationen.	163
Tabelle 5-1:	Mikroorganismen.	167
Tabelle 5-2:	Bestandteile der Kulturmedien.	170
Tabelle 5-3:	Standardsubstanzen, Substrate und Inhibitoren.	171
Tabelle 5-4:	Enzyme und sonstige Chemikalien.	172
Tabelle 5-5:	Verwendete Lösungsmittel.	173
Tabelle 5-6:	Verwendete Gase.	173
Tabelle 5-7:	Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel.	174

Tabelle 7-1:	R _f -Werte der mit Dansylhydrazin derivatisierten Terpenoide.	207
Tabelle 7-2:	Transient gebildetes Carvon/Isopiperitenon im Screeningverfahren der Limonenbiotransformation, bestimmt mittels DC.	208
Tabelle 7-3:	Identifizierung von Transformationsprodukten der Limonen- transformation.	209
Tabelle 7-4:	Transformation von <i>R</i> -(+)-Limonen mit ausgewählten Kulturen.	211f.

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammioniumsalz
APCl	Atmospheric Pressure chemical Ionisation
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosinriphosphat
BW	Blindwert
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CI	Chemische Ionisation
CMC	Critical micellar concentration
COSY	Correlation Spectroscopy, zweidimensionale ¹ H, ¹ H-NMR
CoA	CoenzymA
CW	Carbowax
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DB	Divinylbenzene
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung für Schimmelpilze
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoßionisation
GC	Gaschromatographie
GC-O	Kopplung GC mit Olfaktometrie
HLB	Hydrophilic lipophilic balance
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation,
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ¹ H, ¹³ C-NMR, 2D
HPLC	Kopplung Flüssigchromatographie mit Diodenarraydetektor
HR	Hochauflösung
IS	interner Standard
J	Kopplungskonstante
k.a.	keine Angaben
KI	Kovats Index
LC	Flüssigchromatographie
LC-UV	Kopplung LC mit UV-Detektion
M ⁺	Molekülion
MOPS	4-[N-Morpholino]butansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
NADH	Nicotinamid-adenosyldinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-adenosyldinucleotidphosphat, reduziert
NAD(P)	Nicotinamid-adenosindinucleotid(-phosphat), oxidiert
NMR	Kernresonanzspektroskopie
n.n.	nicht nachweisbar
O/W	Öl in Wasser
ppm	parts per million

R	Regressionskoeffizient
R _f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
rs	Regioselektivität
δ	chemische Verschiebung (NMR)
SNLH	Standardnährlösung-Hefe (Medium)
SPME	Solid phase micro extraction
TIC	Totalionenchromatogramm
TOCSY	Total correlation spectrometry (¹ H, ¹ H-Spinsysteme)
Tris-HCl	Siehe Tab. 5-4
% (v/v)	Volumenprozent
vvm	Volumen pro Volumen und Minute
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

„Am Anfang war das Gewürz. ...“ So beginnt die von Stefan Zweig verfasste Erzählung (Zweig, 1938) über die Entdeckung neuer Gewürzhandelswege von Ferdinand Magellan und verdeutlicht, welchen Einfluss Aromaprodukte in vielen Ereignissen der Geschichte von der Römer- bis zur Neuzeit hatten.

Nach wie vor spielen Aromen und Riechstoffe in der heutigen Gesellschaft eine große Rolle. Geruchsaktive Stoffe werden in einer Vielzahl von Produkten des täglichen Lebens wie Parfümen, Kosmetika, Lebensmitteln, Pharmaka und Haushaltsprodukten verwendet. Heutzutage werden beispielsweise 15% aller auf dem Markt befindlichen Lebensmittel durch Zusätze aromatisiert. Die Gewinnung von Aromastoffen mittels Extraktion oder Destillation erfolgt auch heute noch aus verschiedensten Pflanzenteilen (Früchte, Blüten, Samen, Wurzeln, u.v.m.). Extrakte oder auch isolierte Verbindungen kommen als hochwertige Produkte (z.B. in der Parfümindustrie als „*essence absolue*“) in den Handel.

Der große Bedarf an Aromastoffen kann nicht mehr allein über natürliche Extrakte gedeckt werden. Die Herstellung von Aromastoffen erfolgt deshalb zu ca. 80% durch chemische Synthesen (Luckner, 1990). Die Synthesestufen sind oft aufwendig, wenig spezifisch und die Produkte können gemäß der Aromenverordnung lebensmittelrechtlich lediglich als „naturidentisch“ und nicht als „natürlich“ deklariert werden. Laut Aromenverordnung können natürliche Aromen „...durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft...“ hergestellt werden (Aromenverordnung, 2001). Deshalb bildet die Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur Herstellung von natürlichen Aromastoffen eine sinnvolle Alternative. Die Herstellung von Aromen mittels Biotransformationen, d.h. der biokatalytischen Umwandlung von Ausgangskomponenten zu Syntheseprodukten durch z.B. mikrobielle Metabolisierung, gewährt den erzeugten Aromastoffen entsprechend weiterhin das Prädikat „natürlich“. Sie gewinnen dadurch eine entscheidend höhere Akzeptanz beim Konsumenten.

Eine wichtige Gruppe der Aromastoffe bilden die Terpenkohlenwasserstoffe und ihre Oxidationsprodukte, die Terpenoide. Als weit verbreitete Naturstoffe sind ihre sensorischen oder pharmakologischen Wirkungen schon seit langer Zeit bekannt. Mono- und Sesquiterpene dienen als Produkte des Sekundärstoffwechsels in der Pflanzen- und Tierwelt als Lockstoffe oder aufgrund ihrer toxischen Wirkung als Fraßschutz. Sie wirken ebenfalls als Signalstoffe und Phytohormone. So dienen z.B. mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommene und metabolisierte Terpene den Insekten als Soziohormone (Kommunikationspheromone; Breitmeier, 1999). Olfaktorisch aktive Terpene zeichnen sich

häufig durch außerordentlich niedrige Geruchsschwellen aus und bilden als sogenannte *character impact compounds* den aromabildenden Inhaltsstoff einer bestimmten Aromanote, z.B. Rosenoxid für Geranienduft mit einer Geruchsschwelle von $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (aus Wasser freigesetzt) und all-*E*- α -Sinensal mit $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ als typisches Orangenaroma (Belitz *et al.*, 2001; Ohloff, 1995).

Als Ausgangsverbindungen zur Herstellung von Terpenoiden bieten sich ihre natürlichen Vorstufen an. Diese weniger interessanten Mono- wie auch Sesquiterpenkohlenwasserstoffe werden von den hochwertigen Terpenoiden abgetrennt und fallen als „Abfall“ in Tonnenmaßstäben an. So wird das Monoterpen *R*-(+)-Limonen als Abfallstoff aus der Orangenölverarbeitung in Mengen von mehr als 100.000 t pro Jahr produziert und preiswert gehandelt (Schrader und Berger, 2001). Es kommt als Hauptkomponente des Orangenschalenöls mit einem Gehalt von mehr als 90% vor und fällt bei der Rektifizierung an. Aufgrund ihrer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und ihrer strukturellen Ähnlichkeit bilden die Terpenkohlenwasserstoffe ideale Grundstoffe zur Herstellung der korrespondierenden Oxidationsprodukte durch chemische oder biokatalytische Synthesen.

Für eine Terpenbiotransformation kann auf eine nahezu unbegrenzte Anzahl an Biokatalysatoren wie Bakterien, Hefen, Pilze und Pflanzenzellen zurückgegriffen werden. Pilze haben sich als besonders aktive Biokatalysatoren herausgestellt (Schrader und Berger, 2001). Nach heutigem Kenntnisstand sind mehr als 100 000 Arten aus dem Reich der Mycobionta (Pilze) bekannt, von denen einige Organismen der Wirtschaft Zugang zur Produktion einer Reihe wichtiger Verbindungen verschafft haben (z.B. Antibiotika, Vitamine, organische Säuren). In der Biotechnologie unterscheidet man hierbei zwischen der *de novo* Herstellung, der direkten Ausscheidung als Stoffwechselprodukt durch vitale Zellsysteme, und der *Biotransformation*, die strukturähnliche Vorstufen (Precursoren) durch gezielte funktionelle Reaktionen in gewünschte Zielprodukte umwandelt. Neben der direkten Produktion ist auch eine Vielzahl von Mikroorganismen in der Lage, xenobiotische und makromolekulare Substrate abzubauen und zu metabolisieren (van den Brinck *et al.*, 1998; Wackett und Gibson, 1982).

Insbesondere höhere Pilze wie Basidiomyceten besitzen durch ihr natürliches Habitat eine Vielzahl an oxidativ wirkenden Enzymen für den Holzabbau (z.B. Laccasen, Peroxidasen). Die zurzeit bekannten ca. 30.000 Arten der Basidiomyceten (Sitte *et al.*, 1998) bieten sich daher besonders für oxidative Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen an. Der von Pflanzen ausgeschiedene Abwehrstoff α -Pinen kann z.B. durch mikrobielle Oxidation detoxifiziert werden (Dracynska *et al.*, 1995). Die Metabolisierung dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ist Gegenstand der Forschung und schon seit längerer Zeit bekannt

(Dhavalikar, 1966; Kieslich, 1986). Der Vorteil von Pilzen gegenüber niederen Organismen wie Bakterien ist die wesentlich vielfältigere Ausstattung an Redoxenzymen mit hohem Oxidationspotential, was sie insbesondere zur Oxidation xenobiotischer Substanzen befähigt.

Eine industrielle Anwendung der biotechnologischen Herstellung von Aromastoffen ist vom heutigen Standpunkt der Forschung denkbar. Nach EU-Gesetzgebung (Richtlinie 50/2000) sind für die Herstellung von Aromastoffen die Anwendung von molekularbiologischen Verfahren und die Verwendung genetisch manipulierter Organismen ebenfalls möglich, solange keine Protein- bzw. DNA-Spuren im Produkt nachweisbar sind. Andernfalls wird eine gesonderte Kennzeichnung verlangt. Exemplarisch ist die Herstellung von Vanillin über Zimtsäure bekannt. Zwei Enzyme aus dem Metabolismus der Zimtsäure wurden erfolgreich in *E. coli* kloniert und exprimiert (Steinbüchel, 1997; Achterholt *et al.*, 2000), wodurch die Hydrolyse und Spaltung von Ferroyl-S-CoA zu Vanillin im g L⁻¹-Maßstab gelang. Auf dem Gebiet der Terpenbiotransformation können mehr als 3 g L⁻¹ α -Terpineol und Perillasäure aus *R*-(+)-Limonen hergestellt werden (Speelmans *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1998). Eine Vielzahl weiterer Transformationsreaktionen steht bereit, von denen eine biotechnologische Anwendung erhofft werden kann.

1.1 Problemstellung

Aufgrund ihrer strukturellen Komplexität stellt die chemische Totalsynthese von Sesquiterpenoiden die Aromaindustrie vor außergewöhnliche Schwierigkeiten. Sie kann deshalb am einfachsten durch die Funktionalisierung von natürlichen Vorstufen durchgeführt werden. Da sich chemische Synthesestufen bisher als wenig selektiv herausgestellt haben, stellen Biotransformationen eine wertvolle Alternative dar (Lamare und Furstoss, 1990; Schrader und Berger, 2001).

Die Biotransformation von Monoterpenen hat mit Beginn des neuen Jahrtausends bedeutende Fortschritte hinsichtlich des physiologischen Verständnisses wie auch der biotechnologischen Anwendbarkeit erreicht (Schrader und Berger, 2001). So wurden auf molekularbiologischer Ebene codierende Gene für Enzyme entschlüsselt und transformiert (Akiyama *et al.*, 2002; Duetz *et al.*, 2003) und auf biotechnologischer Ebene Reaktormodelle zur Erzeugung von Terpenoiden in Pilotprozessen erprobt (de Carvalho *et al.*, 2002).

Die enantioselektive Herstellung von Monoterpenoiden durch Biotransformationen ist bisher durch den Mangel an geeigneten Organismen und Enzymen nur beschränkt möglich. Gelingen diese selektiven Katalysen, so könnten aufwendige chirale Chemosynthesen umgangen werden (Duetz *et al.*, 2003).

Aufbauend auf frühere Arbeiten am Institut (Onken, 1998) stand in der vorliegenden Arbeit zunächst die Selektion von transformationsaktiven Mikroorganismen der Klasse *Ascomycetes* und *Basidiomycetes* bezüglich der Oxidation von *R*-(+)-Limonen, (+)-Valencen und Farnesen im Vordergrund.

Unter Verwendung der transformationsaktiven Organismen wurden folgende Ziele angestrebt:

- die Untersuchung von stereoselektiven Oxidationsreaktionen am Monoterpen *R*-(+)-Limonen, insbesondere die Herstellung von enantiomerenreinem Carvon,
- die Metabolisierung von Sesquiterpensubstraten aus Abfallströmen der Orangenschalenverwertung zu sensorisch attraktiven Produkten,
- die Identifizierung der gebildeten Transformationsprodukte und Aufklärung ihrer Biogenese,
- die Optimierung und Charakterisierung der Transformationsbedingungen durch Variation entscheidender Kultivierungsparameter (Art, Menge und Form der Substratzugabe, Kulturadaptation, Enzyminduktion, Sauerstoffversorgung, Biomasse, Produktverteilung und -abtrennung) mit dem Ziel der Produktmaximierung.

2 Ergebnisse

2.1 Entwicklung einer DC-Schnellmethode zur Identifizierung von Terpenoiden

2.1.1. Identifizierung von Terpenoiden durch Fluoreszenzmarkierung

Zum qualitativen Nachweis von gebildeten Terpenoiden aus Extrakten der Terpenbiotransformation mit den Substraten Limonen, Valencen und Farnesen wurde eine dünnschichtchromatographische Schnellmethode mit Fluoreszenzdetektion zur Identifizierung von Terpenoiden entwickelt. Die Dünnschichtchromatographie besitzt gegenüber gaschromatographischen Untersuchungen den Vorteil, einen hohen Probendurchsatz (13 Proben und mehr innerhalb von 20 min.) zu erreichen, während die Gaschromatographie zwar selektiver eine Vielzahl der Produkte erfasst aber mit einem höheren Zeitaufwand verbunden ist.

Da die Zielprodukte der Biotransformationsversuche überwiegend leicht flüchtige Ketone bzw. Aldehyde waren, wurde vor der chromatographischen Entwicklung eine carbonylspezifische Derivatisierung mit dem Fluorophor Dansylhydrazin (5-[Dimethylamino]naphthalene-1-sulfonylhydrazin, **1**) durchgeführt (**Abb. 2-1**). Für die Derivatisierung von Terpenalkoholen wurden ebenfalls fluorophore Derivatisierungsreagenzien wie z.B. 9-Anthroylnitril (**2**) getestet, jedoch scheiterte die Markierung an der ungenügenden Selektivität durch die hohe Anzahl an im Extrakt befindlichen Molekülen mit Hydroxyfunktionen, die insgesamt derivatisiert wurden.

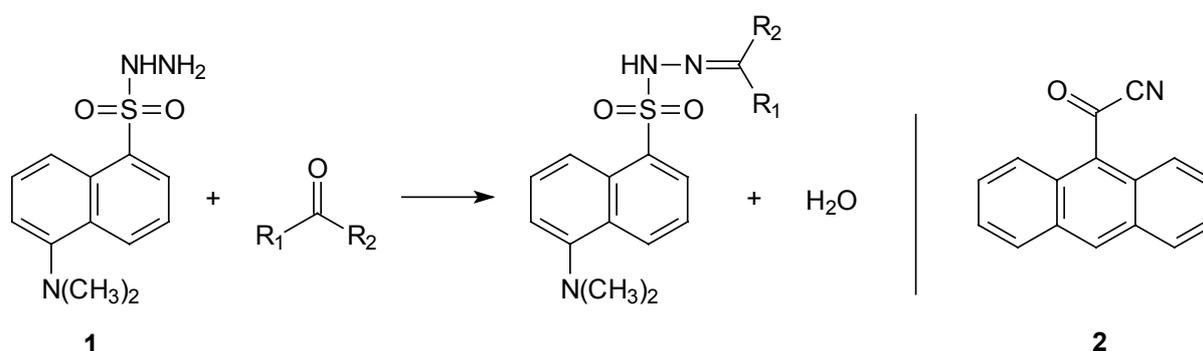


Abbildung 2-1: Derivatisierung von Ketonen oder Aldehyden mit Dansylhydrazin (**1**) zu Dansylhydrazonen; 9-Anthroylnitril (**2**) als Fluorophor für die Markierung von Alkoholen.

Die Derivatisierung der Carbonyle mit Dansylhydrazin erlaubte einen selektiven Nachweis, weil insbesondere die in großem Umfang entstandenen Alkohole nicht detektiert werden. Die Extrakte der Transformation wurden in methanolischer Salzsäure mit Dansylhydrazin bei

Raumtemperatur derivatisiert. Die entstandenen Derivate wurden auf Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat 5:20 entwickelt und zur Stabilisierung der Derivate mit einer 25%igen Polyethylenglycol-Lösung in Dichlormethan besprüht (5.8.1). Die Detektion erfolgte bei 366 nm. Für die Transformationsprodukte errechneten sich die in **Tab. 7-1** (Anhang) aufgeführten R_f -Werte. Eine Quantifizierung wurde für Carvon und Nootkaton durch Kalibrierung mit Standardlösungen durchgeführt (2.1.2.), wobei die entstandenen fluoreszierenden Spots photographisch und rechnergestützt (Flächenintegration) ausgewertet wurden.

Die Empfindlichkeit lag für alle Terpenoide bei ca. 50 – 60 Flächeneinheiten mg^{-1} Terpenoid. Das Derivatisierungsreagenz selbst verursachte drei Spots ($R_f=0; 0,23; 0,45$), wodurch es insbesondere für Terpenoide mit niedrigen Laufhöhen zunehmend zu Interferenzen mit $R_f=0,45$ kam (siehe Verbenon; unterer Pfeil $R_f=0,45$). **Abb. 2-2** zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung ausgewählter Terpenoidderivate.

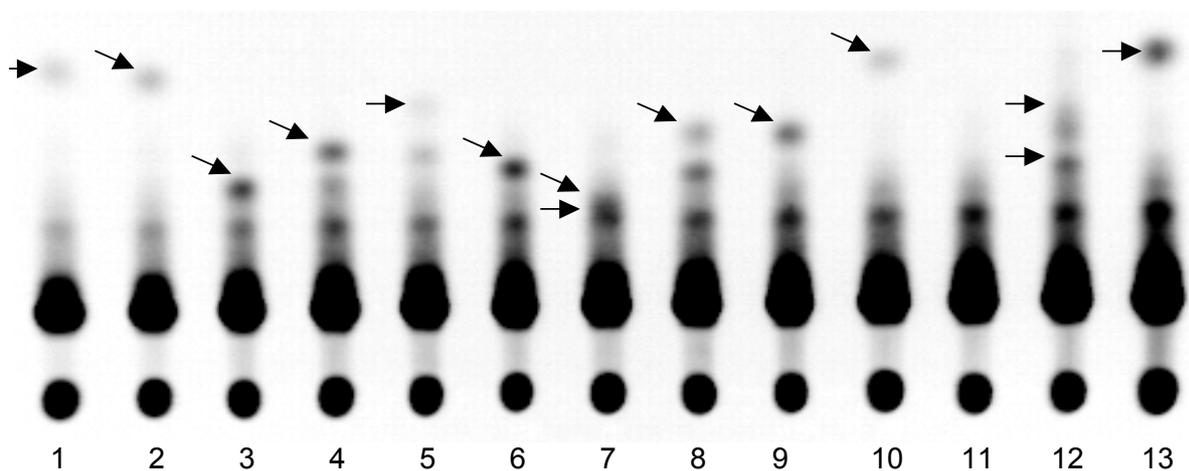


Abbildung 2-2 Dünnschichtchromatographische Trennung der Dansylhydrazone von ausgewählten Terpenoiden (Standardlösungen jeweils 20 mg L^{-1} ; 1: *R*-Carvon; 2: *S*-Carvon; 3: Perillaaldehyd; 4: Nootkaton; 5: Farnesal; 6: Myrtenal; 7: Verbenon; 8: Citral; 9: Citronellal; 10: Carvonstandard Screening; 11: chem. Blindwert; 12: Extrakt aus Kultivierung mit *P. sapidus* am 4. Kulturtag; 13: äquimolares Gemisch *R/S*-Carvon).

2.1.2. Erfassung von Carvon und Nootkaton im Screeningverfahren

Um die Produkte Carvon und Nootkaton über die Dünnschichtchromatographie quantifizieren zu können, wurde zunächst eine Kalibrierung über lineare Regression des Verhältnisses Fläche zu Konzentration durchgeführt (**Abb. 2-3**). Für die Dansylderivate des Carvons war eine Linearität für Konzentrationen $< 50 \text{ mg L}^{-1}$ gegeben. Ebenfalls bot sich hier eine doppelt reziproke Auftragung an ($1/A = 0,0122 / c + 0,0004$; $R = 0,995$). Die Bestimmungsgrenze beider Derivatisierungen lag bei 1 mg L^{-1} Extraktlösung (30 ng pro Spot) als minimale, noch

zu integrierende Spotfläche. Für die Hydrazone des Nootkatons wurde eine Signallinearität bis 80 mg L^{-1} ermittelt.

Zur Optimierung der Anregungswellenlänge wurde das Dansylhydrazon von Carvon an einer Kieselgel-Säule aufgereinigt und ein Absorptionsmaximum von 344 nm bestimmt (Literatur 340 nm für ein Abscisinderivat, Anderson 1985). Fluorimetrische Messungen ergaben eine optimale Anregungswellenlänge von 334,1 nm mit der intensivsten Emissionwellenlänge bei 473 nm. Die verwendete Anregungswellenlänge von 366 nm lag also um ca. 30 nm neben dem optimalen Anregungsmaximum von 334 nm und schwächte die Emissionsintensität um ein Vielfaches herab. Eine Optimierung der Anregungswellenlänge wurde jedoch nicht durchgeführt, da die Bestimmungsgrenze für das vorgesehene Screeningverfahren ausreichte.

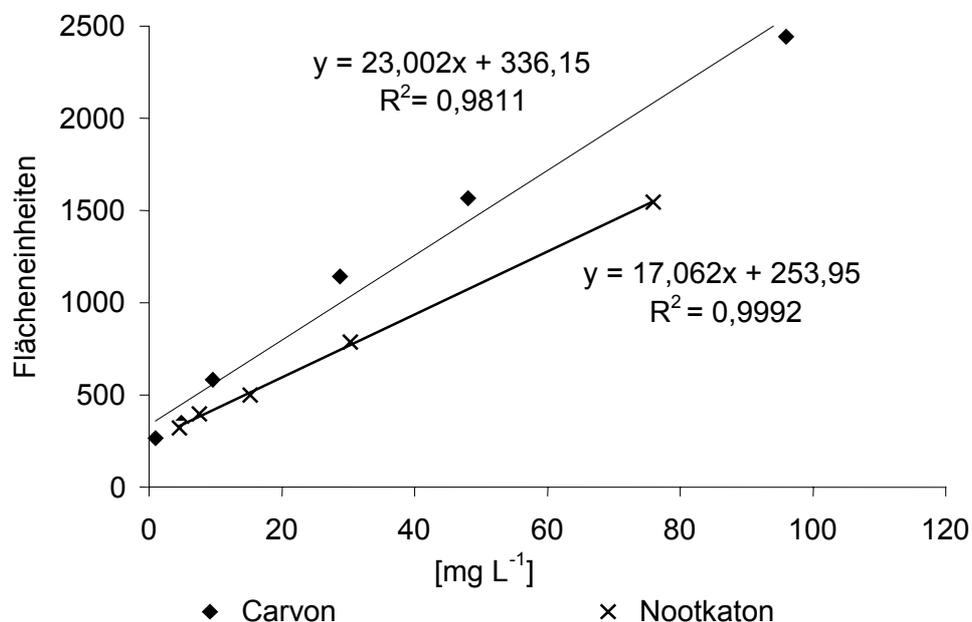


Abbildung 2-3: Kalibrierung der fluorimetrischen Erfassung der Dansylhydrazone von Carvon und Nootkaton ($\lambda_{\text{ex}}=366 \text{ nm}$).

Zur Erfassung der Oxidationsprodukte (Ketone und Aldehyde) im Screeningverfahren wurden Aliquots der Kulturüberstände nach der Mikroextraktion (5.5.3.2) extrahiert und über DC ein Profil der transienten Terpenoidkonzentrationen über 14 Tage Transformationszeit bestimmt, was gegenüber einer gaschromatographischen Erfassung eine erhebliche Zeitersparnis bedeutete. Die Ergebnisse des Screenings sind **Tab. 7-2** zu entnehmen. Insgesamt wurden bei der quantitativen Auswertung über DC höhere Terpenoid-Gehalte als in der GC-Analytik bestimmt, die durch die Interferenzen mit dem Regioisomere Isopiperitenon zustande kamen. Zur genauen Untersuchung vorkommender Intermediate,

wie z.B. Sesquiterpenalkohole, wurde am vierten Transformationstag eine gaschromatographische Analyse durchgeführt.

Teilzusammenfassung 2.1:

- DC mit Fluoreszenzmarkierung stellt ein geeignetes Verfahren zur Erfassung terpenoider Aldehyde und Ketone dar. Mit dieser Methode kann ein hoher Probendurchsatz erzielt werden.
- Die Bestimmungsgrenze der Dansylterpenoide betrug 1 mg L^{-1} (30 ng absolut) in einem linearen Messbereich von 0 bis 50 (Carvon) bzw. bis 80 mg L^{-1} (Nootkaton).

2.2 Biotransformation des Monoterpens Limonen

2.2.1 Chemische Oxidation von Limonen

Die Bestimmung der chemischen Oxidation des Transformationsprecursors *R*-(+)-Limonen (*[R]*-1-Methyl-4-[methylethenyl]-cyclohexan; CAS 138-86-3) war notwendig, um eine Biotransformation von einer chemischen Oxidation mit gelöstem Sauerstoff in einer Schüttelkolbenkultivierung unterscheiden zu können. Hierzu erfolgte eine Limonendosierung von 2,5 mM (330 mg L⁻¹) zu 100 mL SNLH-Medium. Gemessen wurde die Bildung des Intermediats Carveol (2-Methyl-5-[methylethenyl]-cyclohex-2-en-1-ol; CAS 99-48-9) und des Endproduktes Carvon (2-Methyl-5-[methylethenyl]-cyclohex-2-en-1-on; CAS 99-49-0; **Abb. 2-4**).

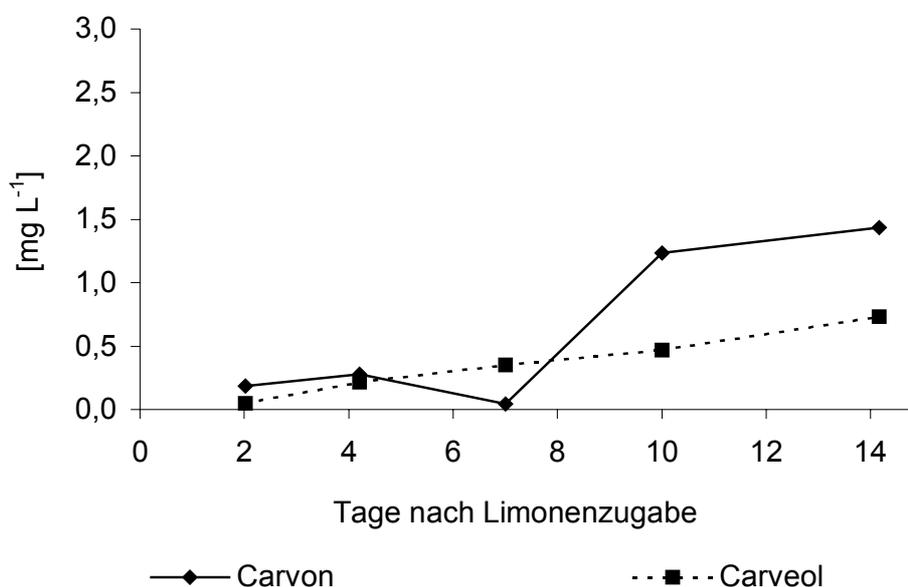


Abbildung 2-4: Autoxidative Bildung von Carveol und Carvon aus *R*-(+)-Limonen im 200 mL-Schüttelkolben (Dosierung 2,5 mM).

Die Autoxidation von *R*-(+)-Limonen zu Carveol und Carvon verlief langsam und erreichte am 10. Messtag 0,5 bzw. 1,5 mg L⁻¹. Das Isomerenverhältnis der Carveole ist für den Vergleich mit der Carveolbiogenese aus Biotransformationen relevant (siehe **Abb. 2-19**). Es bildete sich ein annähernd konstantes *cis/trans*-Verhältnis von 60:40 aus (siehe 2.2.5.2). Die Autoxidation von Limonen zu weiteren Verbindungen war ebenfalls zu vernachlässigen. 1 mg L⁻¹ *cis*-2,8-Menthadien-1-ol war die höchste gemessene Terpenoidkonzentration nach 96 h Inkubationszeit (**Tab. 7-4**).

2.2.2 Stammscreening: Transformationsleistung verschiedener Mikroorganismen

2.2.2.1 Übersicht über Hydroxylierungsaktivitäten der untersuchten Mikroorganismen

Wie schon in sehr frühen Arbeiten (Dhavlikar 1966, Kieslich 1976) gezeigt wurde, sind Mikroorganismen in der Lage, *R*-(+)-Limonen zu metabolisieren und zu aromawirksamen Terpenoiden zu oxidieren. Aufbauend auf den Ergebnissen von Onken (1998) wurden Basidiomyceten, Ascomyceten und auch Hefen auf die Fähigkeit hin untersucht, *R*-(+)-Limonen (**3**) möglichst selektiv zu Carveol (**4/5**) und Carvon (**6**) zu oxidieren (**Abb. 2-5**). Ziel war hierbei zum einen eine möglichst enantiomerenreine Herstellung der sensorisch unterschiedlichen *R*-(-)- und *S*-(+)-Carvone über Carveol als Intermediate (**4/5**), zum anderen die Steigerung der Carvonausbeuten.

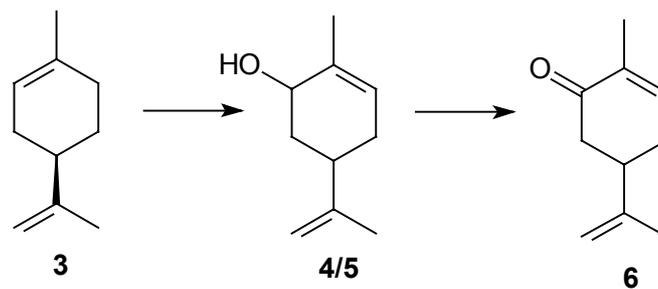


Abbildung 2-5: Angestrebte Biotransformationsprodukte aus *R*-(+)-Limonen (**3**): Carveol (**4/5**) und Carvon (**6**).

Mit einer Vorauswahl aus 28 Mikroorganismen wurde ein Stammscreening in Schüttelkolbenkulturen durchgeführt. Der Auswahl von Stämmen und Gattungen wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- literaturbekannte stereoselektive Oxidationen von Monoterpenen,
- aus früheren Arbeiten am Institut bekannte, zur Terpenoxidation befähigte Stämme,
- auf geeigneten Habitaten wachsende und/oder aus diesen isolierte Mikroorganismen.

Die kommerziell erhältlichen Kulturstämme sind dem experimentellen Teil (5.1.1.1) zu entnehmen. Der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* diente im Screening als Referenzorganismus, da er bekannterweise *R*-(+)-Limonen zu racemischem Carvon oxidiert (Onken, 1999).

Zielprodukte der Biokonversion von *R*-(+)-Limonen waren Carvon sowie sein Intermediat Carveol, jedoch sollten andere Transformationsprodukte miteingefasst werden, um die Fähigkeit der Terpenoxidation des jeweiligen Stammes auf die nachfolgenden Sesquiterpensubstrate übertragen zu können.

Das Stammscreening wurde in Schüttelkolbenkulturen mit 100 mL SNL-H Medium durchgeführt, die zuvor aus einer Vorkultur angeimpft worden waren (5.2.2.6). Die Kulturen wurden bei maximaler Biomasse (optische Kontrolle, 3-5 Tage Wachstumszeit) mit 50 μ L (3 mM) Limonen supplementiert. Die Produktbildung aus Proben der Transformationskulturen wurde täglich nach Mikroextraktion (5.5.1.1 und 5.5.3.2) bestimmt. Dabei wurde eine dünnschichtchromatographische Quantifizierung des Carvons über den Kulturverlauf (5.9.1) durchgeführt, um transiente Produktbildungen erkennen zu können. Des Weiteren wurden die erhaltenen Extrakte nach vier Tagen Transformation gaschromatographisch untersucht. Die gebildeten Transformationsprodukte wurden anhand authentischer Standards, Vergleich von Kovats-Indices und Massenspektren aus Literaturquellen identifiziert (**Tab. 7-2**, Anhang). Eine Übersicht über die Fähigkeit einer Kultur, Terpensubstrate zu oxidieren, zeigt **Abb. 2-6**. In ihr ist die Summe aller einfach oxyfunktionalisierten Produkte dargestellt, die sich durch Aufnahme von Sauerstoff und damit einer Erhöhung des Molekulargewichtes um 14 (Keton) bzw. 16 (Alkohol, Epoxid) auszeichnen. **Tab. 7-3** im Anhang zeigt eine Aufschlüsselung der jeweils identifizierten Einzelprodukte.

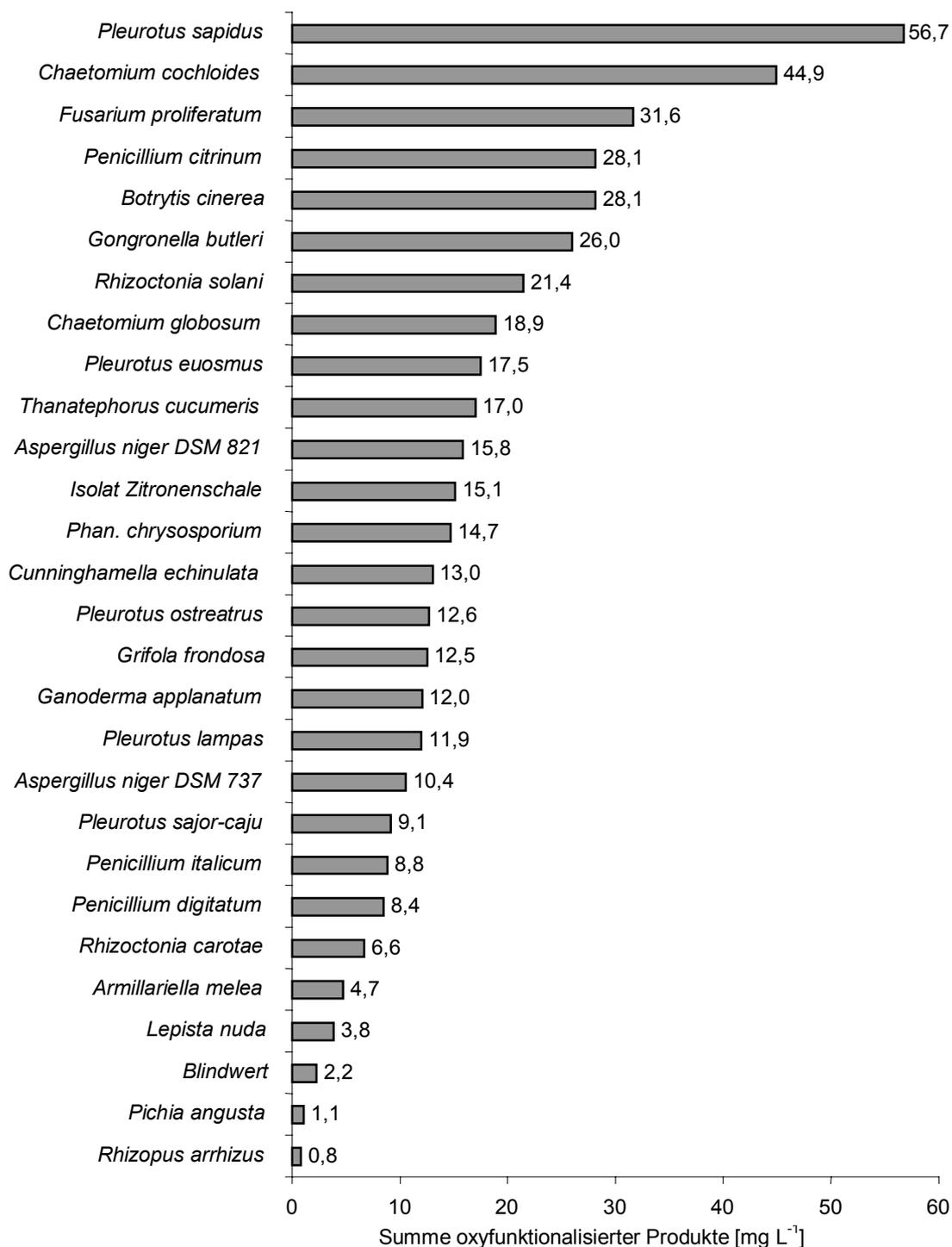


Abbildung 2-6: Oxidative Aktivität der Kulturen im Screening als Summe der einfach oxyfunktionalisierten Transformationsprodukte aus *R-(+)-Limonen* (3 mM) nach 96 h Transformationszeit.

Im Wesentlichen fanden Hydroxylierungen, Oxidationen von Alkoholen, Epoxidierungen und Reduktionen von Doppelbindungen und Hydratisierungen am *R-(+)-Limonen* statt. Besondere Transformationsreaktionen werden nachfolgend erläutert.

2.2.2.2 Regioselektive Bildung von Terpenalkoholen

Basidiomyceten und Ascomyceten hydroxylierten das Substrat *R*-(+)-Limonen mit unterschiedlicher Regioselektivität. Die Einführung des Sauerstoffs erfolgte fast ausnahmslos in allylischer Stellung. **Abb. 2-7** zeigt die Transformationen von *R*-(+)-Limonen mit den jeweiligen Hydroxylierungsprodukten. Angegeben ist dabei der jeweils nach 96 h erreichte Gehalt des Terpenalkohols mit der angegebenen Regioselektivität (*rs*). Die Regioselektivität *rs* wurde als Quotient aus dem Gehalt des regioselektiv gebildeten Terpenalkohols und der Summe der oxyfunktionalisierten Verbindungen berechnet (**Abb. 2-6**).

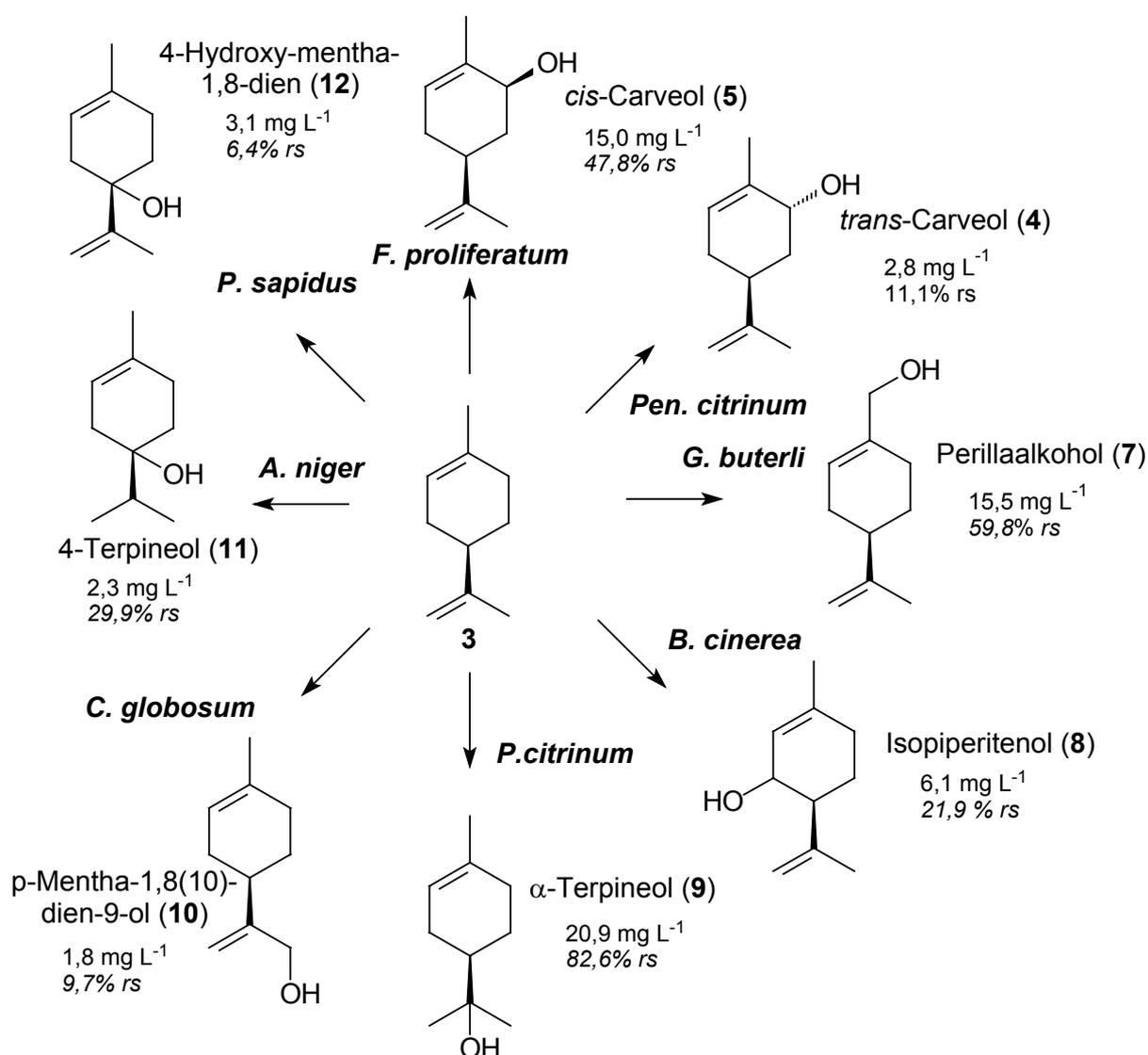


Abbildung 2-7: Regioselektivitäten (*rs*) der Hydroxylierung von *R*-(+)-Limonen (3 mM) mit ausgewählten Stämmen mit Produktmengen der gebildeten Terpenalkohole nach 96 h Submerskultivierung.

Die höchsten Ausbeuten und Regioselektivitäten wurden mit *Penicillium citrinum* (α -Terpineol **9**; 2-[4-Methyl-cyclohex-3-enyl]-propan-2-ol; CAS 98-55-5; 1,6 mol% bzgl. *R*-[+]-Limonen) und *Gongronella butleri* (Perillaalkohol **7**; 4-(1-Methylethenyl)-1-cyclohexene-1-methanol; CAS 536-59-4; 1,6 mol%) erzielt. *Pleurotus sapidus* bildete ein racemisches Gemisch aus Carveol mit einem Gehalt von 14,8 mg L⁻¹ (*rs* 30,7%; 1,5 mol%). Die Hydroxylierung von *R*(+)-Limonen zu 4-Terpineol (**11**) wurde von einer Hydrierung der Doppelbindung in C8-Stellung begleitet, α -Terpineol und eventuell auch 4-Terpineol wurde wahrscheinlich durch eine Addition von Wasser an selbige Doppelbindung und nachfolgender Isomerisierung gebildet. Ebenfalls wurden *p*-Mentha-1(7)8-dien-2-ol (**13**) und *p*-Mentha-2,8-dien-1-ol (**14**) durch Umlagerungen bei der Transformation mit *Fusarium proliferatum* und *Pleurotus spec.* und anschließender Hydroxylierung gebildet (**Abb. 2-8**).

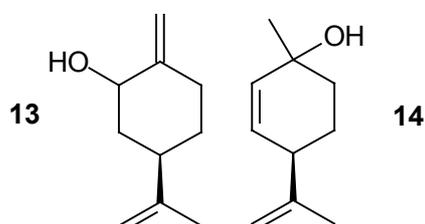


Abbildung 2-8: *p*-Mentha-1(7)8-dien-2-ol (**13**) und *p*-Mentha-2,8-dien-1-ol (**14**) als Transformationsprodukte aus *R*(+)-Limonen (**3**).

2.2.2.3 Bildung sensorisch relevanter Aldehyde und Ketone

Die nachfolgend beschriebenen Produkte entstanden durch Oxidation der Terpenalkohole aus 2.2.2.2.

- Isopiperitenon und Piperiton:

Die in Minze enthaltenen Terpenoide Isopiperiton und Piperiton wurden aus der Transformation von *R*(+)-Limonen mit *Pleurotus lampas*, *Pleurotus sajor-caju* und *Botrytis cinerea* erhalten. Die Transformation mit *P. sajor-caju* lieferte nach 96 h 0,6 mg L⁻¹ Isopiperitenol. Dessen Oxidationsprodukt Isopiperitenon lag mit 2,2 mg L⁻¹ (23,7% Transformationsausbeute aus Limonen) im Kulturmedium vor. Ebenso oxidierte *B. cinerea* *R*(+)-Limonen über Isopiperitenol (6,1 mg L⁻¹) zu Isopiperiton (2,3 mg L⁻¹, 8,3%). Nur der Basidiomycet *P. lampas* führte eine weitergehende Hydrierung des Isopiperitenon zu Piperiton (2,2 mg L⁻¹, 22,4%) durch (**Abb. 2-9**).

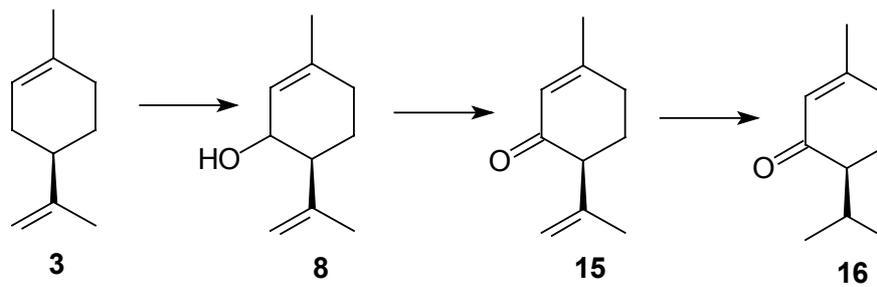


Abbildung 2-9: Oxidation von *R*-(+)-Limonen an C3 zu Isopiperitenol (**8**), Isopiperitenon (**15**) und Piperiton (**16**).

- Perillaaldehyd:

Das sensorisch als Aroma des Flieders wahrnehmbare Perillaaldehyd wurde von *Pleurotus lampas* aus *R*-(+)-Limonen gebildet. Die Mengen an Perillaaldehyd betragen dabei $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, das Intermediat Perillaalkohol (**7**) wurde hier nur geringfügig gebildet ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), während es bei anderen Organismen das Hauptprodukt darstellte. Aufgrund der sensorischen Relevanz erfolgte eine ausführliche Untersuchung (siehe 2.2.4).

- Carvon:

Carvon wurde in größeren Mengen nur von *Pleurotus sapidus* gebildet ($6,5 \text{ mg L}^{-1}$). *P. euosmus* und *P. ostreatus* bildeten ebenfalls 1 bis 2 mg L^{-1} Carvon.

2.2.2.4 Bildung von Linalool und Linalooloxid

Linalool trat in allen Transformationsansätzen in Mengen bis zu 4 mg L^{-1} auf. *Pleurotus euosmus* und *Pleurotus ostreatus* bildeten aus dem entstandenen Linalool ein Cyclisierungsprodukt *trans*-Furanlinalooloxid (KI 1463 [auf CW-20M]; **Abb. 2-10**). Die Identifizierung erfolgte mittels authentischer Standards.

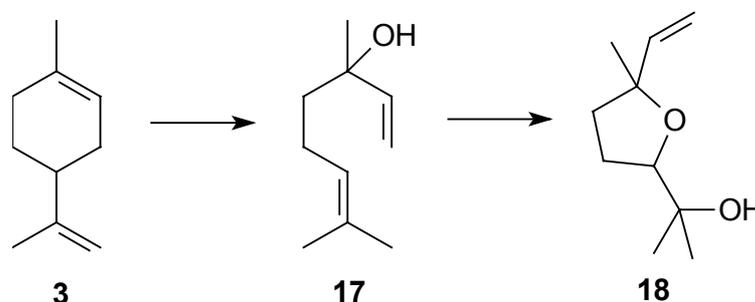


Abbildung 2-10: Bildung von Linalooloxid (**18**) aus **3** über Linalool (**17**).

2.2.2.5 Bildung von Epoxiden und Reduktionsprodukten

Die Doppelbindung in 1,2-Stellung von *R*(+)-Limonen wurde von einigen Organismen epoxidiert. So wurde das Limonen-1,2-epoxid (**19**) von *Thanatephorus cucumeris* ($2,3 \text{ mg L}^{-1}$) und *Cunninghamella echinulata* ($2,7 \text{ mg L}^{-1}$) gebildet. Reduktionsprodukte wie Dihydrocarveol (**20**), erhalten durch Reduktion der 1,2-Doppelbindungen oder des Epoxids, und Dihydrocarvon (**21**) wurden gebildet.

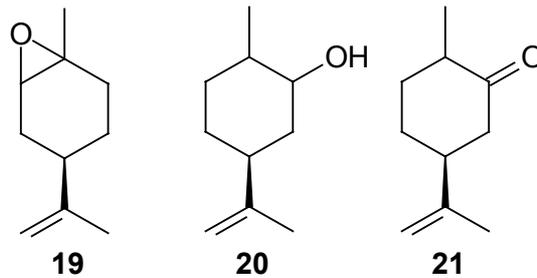


Abbildung 2-11: Produkte aus Epoxidierung, Reduktion und Dehydrogenierung von *R*(+)-Limonen.

2.2.2.6 Bildung weiterer Minorprodukte

Verschiedene Verbindungen traten als Minorprodukte in Konzentrationen von bis zu 2 mg L^{-1} auf (**Abb. 2-12**). Sie waren ausbeutebedingt weniger interessant, könnten aber Hinweise auf die Metabolisierung des Limonens geben.

Weitere terpenoide Produkte waren z.B. *trans*-Sabinenhydrat (**22**, KI 1581 [CW20M]), das von *Armilariella melea* und *Gongronella butleri* in Spuren gebildet wurde. 2-Exo-Hydroxycineol (**23**; KI 1791, CW 20M) wurden von *Thanatephorus cucumeris* ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$), einem Isolat aus Zitronenschalen ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), *Armilariella melea* ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$) und *Penicillium citrinum* ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) gebildet. Ein Isomer des 2-Exo-Hydroxycineol (**23**) wurde im Transformationsansatz von *Penicillium citrinum* gefunden ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$). *Rhizoctonia solani* bildete $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ Pulegon (**24**).

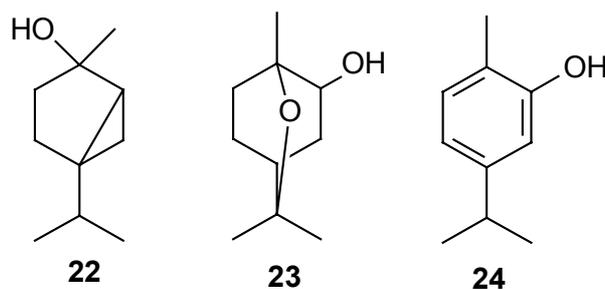


Abbildung 2-12: Minorprodukte der Limonentransformation: Sabinenhydrat (**22**), 1,8-Hydroxycineol (**23**) und Pulegon (**24**).

Teilzusammenfassung 2.2.1. und 2.2.2:

- Aus dem Screening gingen *Pleurotus sapidus*, *Chaetomium cochloides* und *Fusarium proliferatum* als Organismen mit höchster Oxidationsaktivität bezüglich *R*-(+)-Limonen hervor.
- Es wurden Terpenalkohole durch biokatalytische Umsetzungen mit hoher Regioselektivität von mehr als 80% gewonnen (z.B. α -Terpineol, Perillaalkohol, *cis*-Carveol).
- Sensorisch relevante terpenoide Carbonyle wie Piperiton, Perillaaldehyd und Carvon wurden durch Biotransformationen in geringeren Mengen bis zu 2,5 mg L⁻¹ nach 96 h gebildet.
- Weitere Transformationsprodukte waren Epoxide, reduzierte Produkte sowie bicyclische wie auch aromatische Verbindungen.

2.2.3 Kinetik der α -Terpineolgenese durch *Penicillium citrinum*

Die Bildung von α -Terpineol mit *P. citrinum* durch Hydratisierung der 8,9-Doppelbindung war ebenfalls wegen ihrer hohen Regioselektivität von 82,6% interessant. Sie wurde deshalb kinetisch eingehender untersucht. So wurden nach 9 Tagen Transformationszeit 86 mg L⁻¹ α -Terpineol (8,7 mol% Ausbeute) im Kulturmedium bestimmt (**Abb. 2-13**).

Die Zugabe von Limonen hat, wie auch bei anderen Kulturen, einen wachstumshemmenden Effekt. Die Biotrockenmasse fiel nach einem Maximum von ca. 17 g L⁻¹ nach 3 Tagen ab und stagnierte dann bei 11 g L⁻¹.

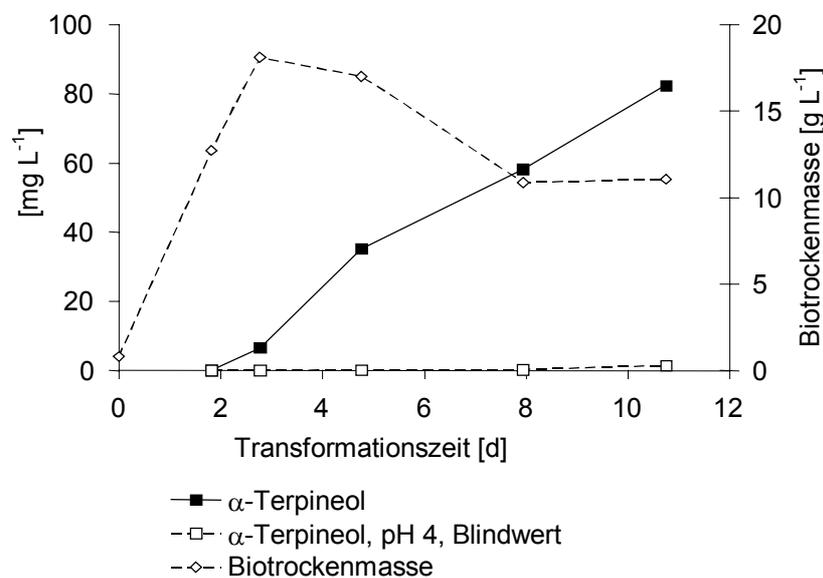


Abbildung 2-13: Kinetik der α -Terpineolbildung aus *R*-(+)-Limonen (3 mM) mittels *P. citrinum*, der korrelierenden Biotrockenmasse und der autoxidativen Terpeneolgenese bei pH im Schüttelkolben.

Die Glucose war 4 Tage nach Inokulierung verbraucht. Es kam zu einer Ansäuerung des Kulturmediums von pH 6,0 auf 4,1. Ein mitgeführter Blindwert bei pH 4 (Limonendosierung 3 mM, 100 mL Kolben) zeigte innerhalb von 10 Tagen eine säurekatalysierte α -Terpineol-Bildung von nur 1,4 mg L⁻¹, die verglichen mit der Biogenese zu vernachlässigen war.

2.2.4 Limonenkonversion zu Isopiperiton und Perillaaldehyd mittels *Pleurotus lampas*

Die Transformation von *R*-(+)-Limonen mit *P. lampas* wurde eingehender untersucht, da besonders geruchsaktive Produkte wie das Perillaaldehyd (Flieder) und das Isopiperiton (Minze) entstanden. Hierzu wurden in Doppelansätzen drei Tage alte Experimentalkulturen

(600 mL) mit 1,2 mM *R*-(+)-Limonen versetzt und die Transformationsansätze nach 96 h extrahiert und die Produktbildung untersucht.

Piperiton (**16**) wurde nur in Mengen um $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ gebildet, das sensorisch deutlich wahrnehmbare Perillaaldehyd (**25**) war hier das interessantere Transformationsprodukt. 2-Caren-10-al (**26**) stellt ein Cyclisierungsprodukt aus einem Ringschluss vom C-Atom 9 und 5 des Limonens dar (**Abb. 2-14**).

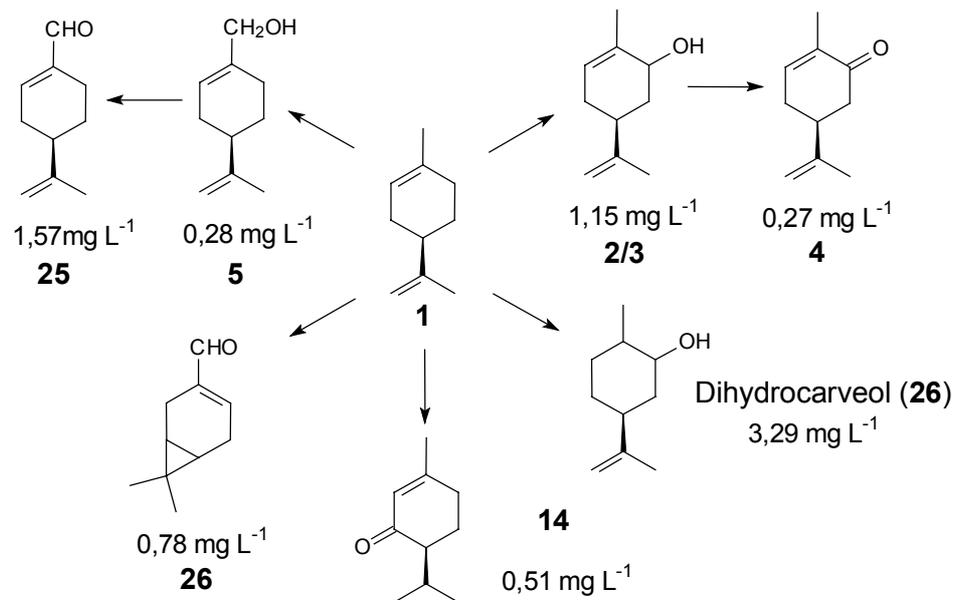


Abbildung 2-14: Transformationsprodukte aus *R*-(+)-Limonen mit *P. lampas* (Dosierung 1,2 mM; Produktkonzentrationen im Schüttelkolben).

Teilzusammenfassung 2.2.3 und 2.2.4:

- Die Biotransformation von *R*-(+)-Limonen zu α -Terpineol mit *Penicillium citrinum* führte zu Produktmengen von mehr als 80 mg L^{-1} in 11 Tagen. Eine säurekatalysierte, chemische α -Terpineol-Bildung war zu vernachlässigen.
- Das sensorisch als Fliedergeruch wahrnehmbare Perillaaldehyd stellte das Hauptprodukt der Limonentransformation mit *Pleurotus lampas* dar. Piperiton wurde nur in geringen Konzentrationen gebildet.

2.2.5 Stereoselektive Biogenese von Carveol

2.2.5.1 Stereochemie der Carveolbildung bei ausgewählten Basidiomyceten und Ascomyceten

Während des Screenings zur Transformation von *R*-(+)-Limonen zum Carvon über Carveol fiel ein ungleiches Verhältnis der gebildeten *cis*- und *trans*-Carveole auf. Eine enantiomerenreine Herstellung von Carveolen hat insbesondere in Hinblick auf die Genese von enantiomerenreinem Carvon Bedeutung, da der erste Reaktionsschritt die Stereochemie an C4 festlegt. Die diastereomeren *cis/trans*-Isomere wurden gaschromatographisch auf Carbowax 20M Säule, die zugehörigen Enantiomere (+) und (-) auf einer chiralen β -Cyclodextrinphase getrennt (**Abb. 2-15**).

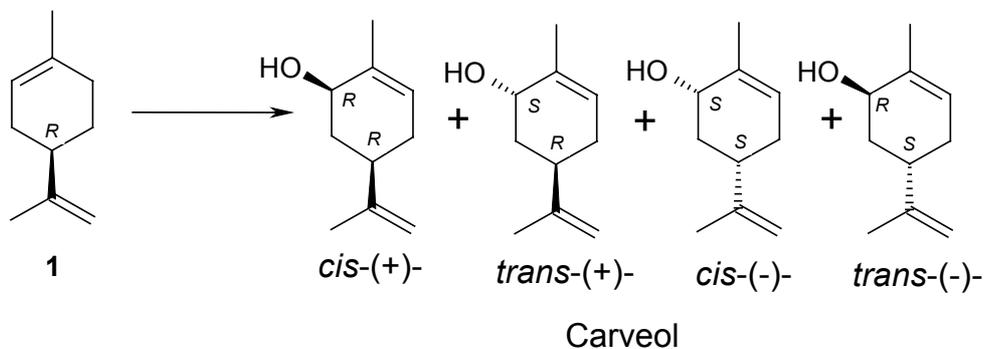


Abbildung 2-15: Vier mögliche Carveolisomere, die aus *R*-(+)-Limonen gebildet wurden.

Unter Erhalt der Stereochemie des *R*-(+)-Limonens sind bei der Hydroxylierung zunächst nur *RR*- und *RS*-Carveole denkbar. Hierbei handelt es sich um *cis/trans*-Diastereomere. Eine chirale Analyse war somit hierfür nicht notwendig. Die *trans*- und *cis* Carveole traten bei den Basidiomyceten *P. sapidus* (PSA), *P. euosmus* (PEO), *P. ostreatus* (POS) und *P. sajor-caju* (PSJ) in etwa im Diastereomerenverhältnis 1:1 auf. Dagegen bildete der Basidiomycet *Armilariella melea* (AME) bevorzugt *trans*-Carveole (76,5 %, **Abb. 2-16**).

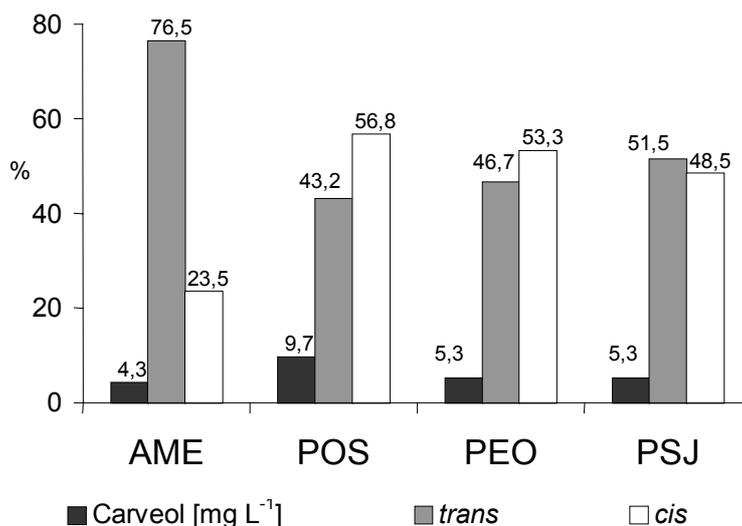


Abbildung 2-16: Carveolgesamtgehalte und Verteilung der *cis*- und *trans*-Isomere in der Limonentransformation (Dosierung 3 mM) der Basidiomyceten *Armiliariella melea* (AME), *P. ostreatus* (POS), *P. euosmus* (PEO) und *P. sajor-caju* (PSJ) nach 96 h Transformationszeit im Schüttelkolben

Insbesondere Ascomyceten wie *C. cochloides* (CCO) und *C. globosum* (CGL) zeichneten sich durch eine besondere Stereoselektivität bezüglich der Biogenese von *cis*-Carveol aus (**Abb. 2-17**). Hier zeigte eine chirale Analyse der *cis*-Carveole eine Bildung des *cis*(+)-Carveols von mehr als 96% (91,1% ee; enantiomerer Überschuss bzgl. *cis*- und *trans*-Isomere). Die Carveolbiogenese mit *P. sapidus* verlief dagegen unter Verlust der Stereochemie am C4 unselektiv. *F. proliferatum* war sogar in der Lage, aus *R*(+)-Limonen *cis*(+)-Carveol (5-Isopropenyl-2-methyl-cyclohex-2-enol; CAS 99-48-9) mit einer Selektivität von > 99 % (98,6% ee) zu bilden (**Abb. 2-18**).

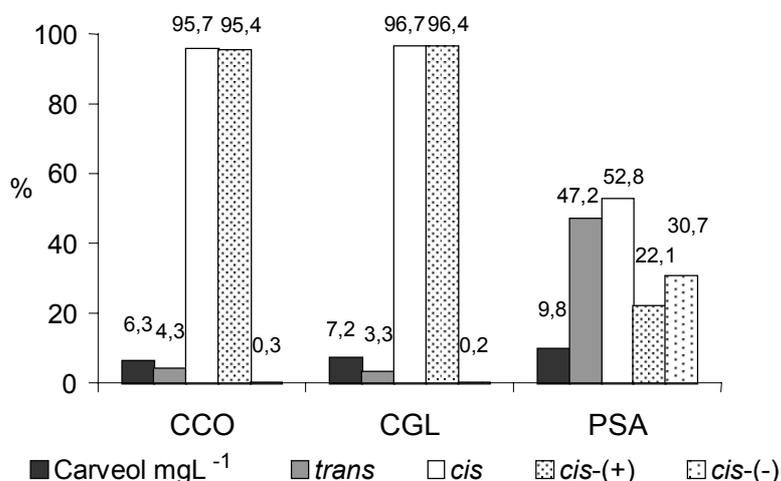


Abbildung 2-17: Carveolkonzentrationen und Stereoisomerenverteilung für die Carveolbildung bei *C. cochloides* (CCO), *C. globosum* (CGL) und *Pleurotus sapidus* (PSA) nach 92 h Transformationszeit im Schüttelkolben (Dosierung 3 mM).

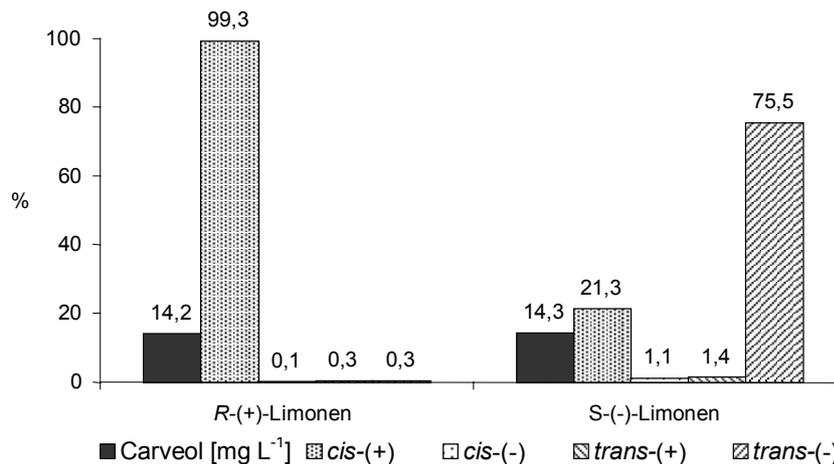


Abbildung 2-18: Stereospezifische Carveolbildung aus *R*-(+)- bzw. *S*-(-)-Limonen mit *F. proliferatum* im Schüttelkolben (96 h Transformationszeit; Dosierung 3 mM).

Um eine enantiospezifische Hydroxylierungsaktivität von *F. proliferatum* nachweisen zu können, wurde ein Transformationsversuch mit dem Precursorenantiomer *S*-(-)-Limonen (Dosierung 3 mM, 96 h) durchgeführt. Insbesondere wurde hiermit auch die Substratspezifität und vergleichend die Stereoselektivität der Biokonversion untersucht. Es zeigte sich eine bevorzugte Bildung des *trans*-(+)-Isomers zu mehr als 75 % (50% ee), jedoch wurde auch das *cis*-(+)-Isomer zu 21 % bestimmt.

2.2.5.2 Kinetik der Carveolbiogenese mit verschiedenen Basidiomyceten und *Fusarium proliferatum*

Kinetische Untersuchungen der Bildung von *trans*- und *cis*-Carveol über einen Zeitraum von 10 Tagen zeigten einen deutlichen Unterschied der Stereospezifität der Bildungsreaktionen. Basidiomyceten wie *Pleurotus sapidus* bildeten sowohl *trans*- als auch *cis*-Carveol in nahezu gleichem Mengenverhältnis (**Abb. 2-19**). Die chemische Bildung lieferte leicht bevorzugt *cis*-Carveol. *Grifola frondosa* bildete nach 24 h überwiegend *cis*-Carveol, während in der Langzeitkinetik ebenso wie bei *Pleurotus sapidus* ein ausgeglichenes Carveolverhältnis erzielt wurde. Die Biogenese von *cis*-Carveol mit *Chaetomium globosum* verlief nach anfänglicher Unselektivität über einen Zeitraum von 10 Tagen stereoselektiv. Die gebildeten Carveolmengen lagen in allen Transformationen bei ca. 10 mg L⁻¹, die Mengen der chemischen Oxidation waren erheblich geringer (siehe 2.2.1).

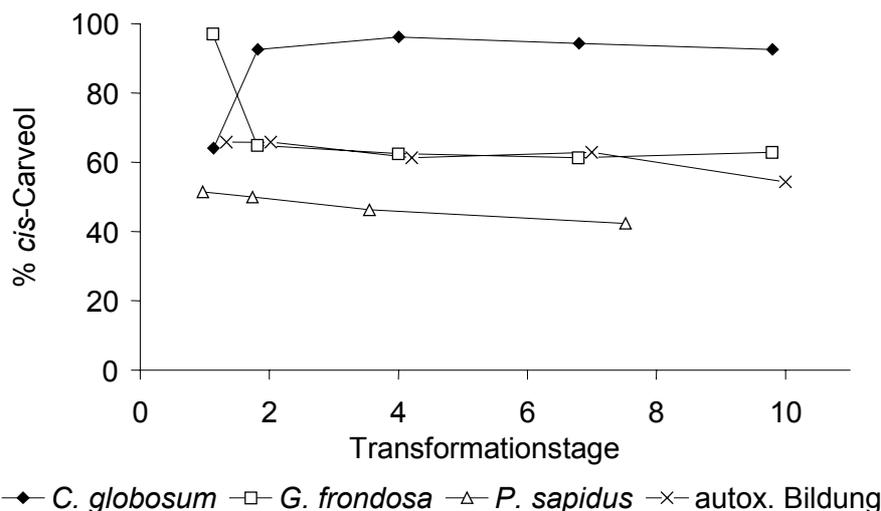


Abbildung 2-19: Anteil von *cis*-Carveol am Gesamtcarveolgehalt während der Biotransformation mit Basidiomyceten und Ascomyceten im Vergleich zur autoxidativen Bildung im Schüttelkolben.

Zur Untersuchung der Bildung des *cis*-(+)-Carveols aus *R*-(+)-Limonen mit *Fusarium proliferatum* wurde die Genese über einen Zeitraum von ca. fünf Tagen verfolgt. Es zeigte sich eine für enzymatische Umsetzungen typische Sättigungskurve mit einer Maximalkonzentration von 35 mg L^{-1} nach 20 Stunden, wobei der Anteil an *cis*-Carveol mehr als 95 % betrug und der Anteil des *trans*-Carveols minimal war (**Abb. 2-20**). Limonen wurde schon innerhalb der ersten 24 Stunden aufgebraucht. Es errechnete sich eine Produktausbeute von 1,5 mol%.

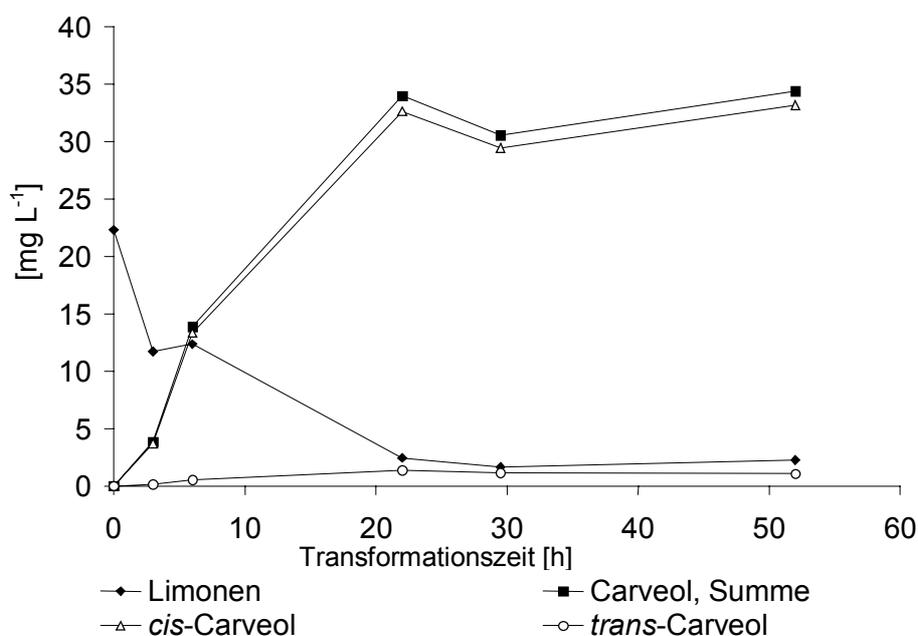


Abbildung 2-20: Kinetischer Verlauf der Bildung der Carveolisomere mit *F. proliferatum* aus *R*-(+)-Limonen (Dosierung 3 mM, Schüttelkolbenkultur).

Ebenfalls wurde die Kinetik der Carveolbildung aus *S*-(-)-Limonen verfolgt. Hier zeigte sich im Vergleich zum *R*-(+)-Limonen eine geringere Selektivität bezüglich der Bildung von *cis*-(+)-Carveol (**Abb. 2-21**). Es wurde eine wesentlich geringere Carveolbildung beobachtet. *Trans*-Carveol bildete sich zu maximal ca. 12 mg L⁻¹, *cis*-Carveol zu 2 mg L⁻¹ (Zugabe 3 mM), wobei das Isomerenverhältnis *trans* zu *cis* durchgehend ca. 80% zu 20% betrug. Wie Abbildung 2-18 zeigt, handelt es sich hier fast ausschließlich um das *cis*-(+)- und das *trans*-(-)-Diastereomer.

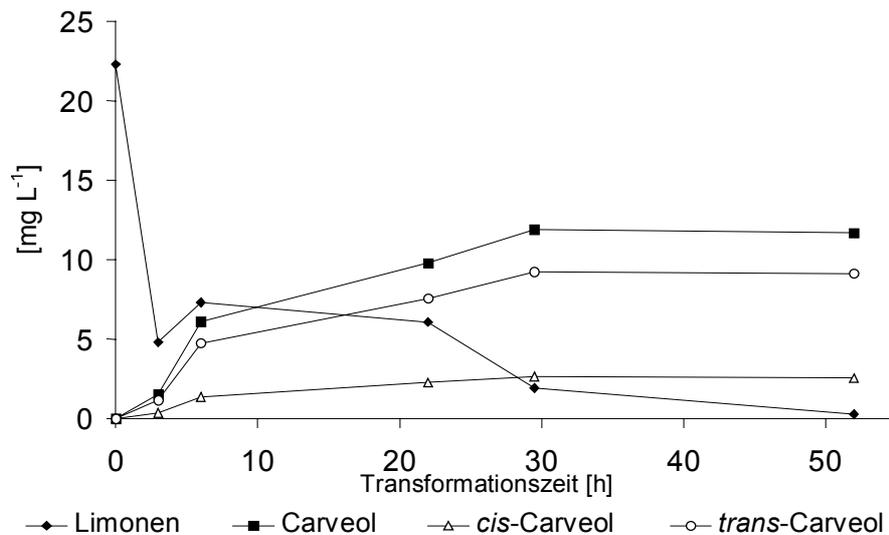


Abbildung 2-21: Genese der Carveolisomere mit *F. proliferatum* nach Zugabe von 3 mM *S*-(-)-Limonen.

2.2.6 Transformation des Terpenalkohols (-)-Carveol mit *P. sapidus*

Für eine biotechnologische Herstellung von Carvon aus Limonen ist eine zweistufige Biotransformation denkbar, für die zunächst die Hydroxylierung zum Carveol und nachfolgend die Dehydrogenierung zum Carvon mit zwei unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt wird. Es wurde ein beispielhafter Mikroorganismus benötigt, der die zweite Stufe, also die Oxidation von Carveol zu Carvon, katalysieren konnte. Hierzu bot sich *P. sapidus* an (Onken, 1998). Es wurde ein Isomerengemisch der (-)-Carveole (60% *trans*, 40% *cis*) zu Experimentalkultur gestuft hinzugegeben (Zugabe am 0., 1., 2. u. 3. Tag 50 µL, insg. 1,916 g L⁻¹, 12 mM Endkonzentration), da eine relativ starke Carveolzehrung einsetzte, und die Bildung der Oxidationsprodukte verfolgt (**Abb. 2-22**).

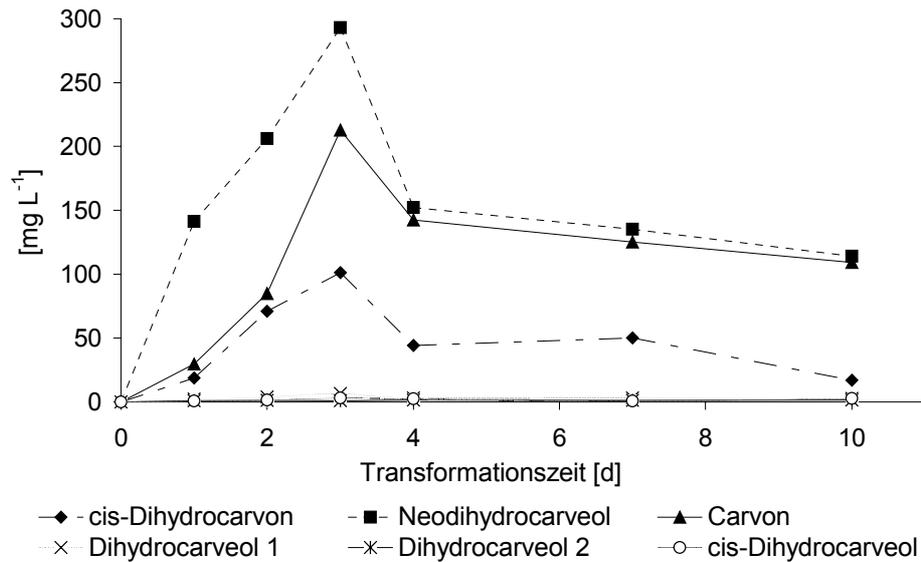


Abbildung 2-22: Kinetik der Bildung der Transformationsprodukte aus (-)-Carveol mit *P. sapidus* im Schüttelkolben (Dosierung 12 mM).

Es bildeten sich neben (-)-Carvon auch Reduktionsprodukte wie die Isomeren des Dihydrocarveols und Dihydrocarvons. Hierbei handelt es sich um Produkte, die durch Reduktion der Doppelbindung aus Carveol bzw. Carvon entstanden sind (**Abb. 2-23**).

Es wurde insbesondere das Neodihydrocarveol gebildet, während die anderen Dihydrocarveole nur marginal vorkamen. Neben dem Carvon sind die entstehenden Produkte olfaktorisch eher unbedeutend. So wurde über GC-O für *trans*-Dihydrocarvon ein süßlicher, bis karamellartiger, für Neodihydrocarveol (KI 1688, CW20M), Dihydrocarveol (KI 1716, CW20M) ein leicht minziger und für Dihydrocarveol (KI 1749, CW20M) ein leicht citroniger Geruchseindruck bestimmt, während die Ausgangsprodukte (-)-*trans*-Carveol als leicht minzig und (-)-*cis*-Carveol als leicht stechend bis scharf wahrnehmbar waren. Die Geruchsintensität blieb aber bei weitem hinter der des Carvons zurück. Nach Untersuchungen der Stereochemie mittels chiraler GC konnte nur die Bildung von *R*-(-)-Carvon (ee > 99% bezüglich des Gesamtcarvons) nachgewiesen werden, somit wurde die Stereochemie an C4 nachträglich nicht verändert.

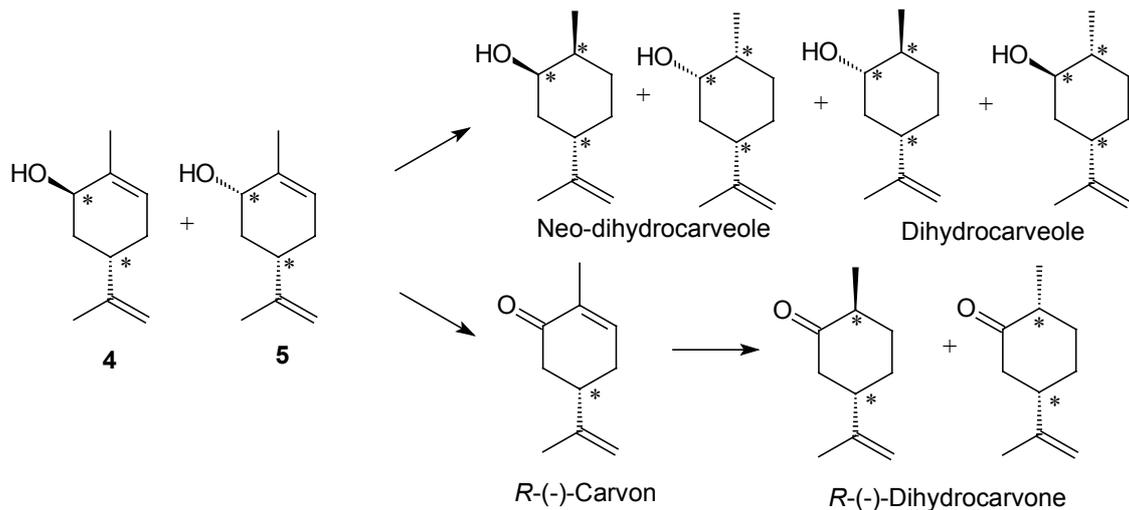


Abbildung 2-23: Oxidations- und Reduktionsprodukte des (-)-Carveols mit *P. sapidus* (4, 5).

Ebenfalls verlief die Carvonbiogenese um ein Vielfaches schneller als die Limonentransformation zu Carveol ($29,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Gegensatz zu ca. $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Der Umsatz für die Bildung der Carveoltransformationsprodukte lag zum Teil erheblich über denen der Limonenbiotransformation. So wurden die (-)-Carveolisomere zu 29,5% in Neodihydrocarveol, 6,2% in Carvon, und 3,9% in *cis*-Dihydrocarvon umgesetzt. Die Minorprodukte lagen unter 0,5%. Der Abbau betrug insgesamt 74,8% des Carveols, wobei *trans*-(-)-Carveol entschieden bevorzugt verstoffwechselt wurde als *cis*-(-)-Carveol (Abbau nach 96 h >94% zu 55%). Die Bildung von Oxidationsprodukten des Carvons oder Dihydrocarveols wurde nicht untersucht.

Teilzusammenfassung 2.2.5 und 2.2.6:

- Limonen wurde mit Ascomyceten wie *Chaetomium globosum* oder *Chaetomium cochloides* mit hoher Stereoselektivität (91,1% ee) zu *cis*-Carveol umgesetzt. Die eingesetzten Basidiomyceten wiesen eine racemische Carveolbildung auf.
- *Fusarium proliferatum* transformierte *R*-(+)-Limonen zu *cis*-(+)-Carveol (35 mg L^{-1}) mit einer Stereoselektivität von 98,6% ee. Aus *S*-(-)-Limonen wurde vorwiegend *trans*-(-)-Carveol gebildet.
- Eine selektive Dehydrogenierung von (-)-Carveol zu mehr als 200 mg L^{-1} enantiomerenreinem *R*-(-)-Carvon zeigte *P. sapidus*, wobei *trans*-(-)-Carveol bevorzugt abgebaut wurde.

2.2.7 Lokalisierung der Limonenbiotransformation

Für die Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu Carveol und Carvon können Exoenzyme oder intrazelluläre Enzyme verantwortlich sein (3.2.4). In den folgenden Versuchen wurden deshalb Kulturüberstände ausgewählter Organismen auf Oxidationsaktivitäten hin getestet. Eine Lokalisierung der Enzymaktivität wurde durchgeführt. Als Beispielorganismen wurden hierfür *Pleurotus sapidus* und *Fusarium proliferatum* gewählt. *P. sapidus* lieferte gute Ausbeuten hinsichtlich der unselektiven Bildung von Carveolisomeren und Carvon, während *F. proliferatum* im Gegensatz dazu stereoselektiv *cis*-(+)-Carveol erzeugte.

2.2.7.1 Transformation mit Kulturüberständen aus *Pleurotus sapidus* und *Fusarium proliferatum*

Zur Aktivitätsbestimmung im Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus* und *Fusarium proliferatum* wurden 100 mL nicht induzierte Experimentalkultur nach drei Tagen (*P. sapidus*) bzw. einem Tag (*F. proliferatum*) durch Zentrifugation getrennt und der Kulturüberstand (70 mL) mit *R*-(+)-Limonen in einer Konzentration von 1 mM in Gegenwart von 3% Dimethylformamid (DMF) zur Erhöhung der Terpenlöslichkeit umgesetzt. Die Transformationszeit betrug 24 h. Nach Extraktion mit Pentan/Ether-Gemisch wurde die Produktbildung bestimmt. In einem zweiten Ansatz wurde die Umsetzung ohne DMF durchgeführt (5.3.1.2).

Sowohl im Kulturüberstand von *F. proliferatum* wie auch von *P. sapidus* wurde in allen Ansätzen keine Carveol- oder Carvonbildung beobachtet, die sich erheblich von der chemischen Bildung abhob.

Im Kulturüberstand von *P. sapidus* war zwar ein deutlicher Kümmel/Minze-Geruch bemerkbar, der sich nach massenspektroskopischer Untersuchung jedoch als Spuren von Limonenepoxid, Anisaldehyd und Isopulegol herausstellte (Mengen < 1 mg/L).

2.2.7.2 Isolierung transformationsrelevanter Enzyme von *F. proliferatum* und *P. sapidus*

Ziel war die Lokalisierung der Carveolbiogenese innerhalb der Pilzzelle, da der Nachweis einer Exoenzymaktivität mit den verwendeten Methoden negativ blieb.

Hierfür wurden Rohextrakte durch Zellaufschluss gewonnen und mit *R*-(+)-Limonen umgesetzt. Experimentalkulturen von *P. sapidus* (200 mL) wurden nach 3 Tagen mit 0,62 mM Limonen induziert und nach weiteren 2 Tagen aufgearbeitet. Nicht induzierte Kulturen wurden ebenfalls untersucht. Experimentalkulturen von *F. proliferatum* (200 mL)

wurden schon nach einem Tag induziert und nach einem weiteren Tag aufgearbeitet (siehe 5.3.2.1).

Hierzu wurden 50 g Biofeuchtmasse nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung in der Kugelmühle aufgeschlossen (Croteau, *et al.*, 2001).

Die Umsetzung erfolgte in 50 mL des jeweiligen Zellaufschlusspuffers unter Zugabe von 1 mM *R*-(+)-Limonen über Nacht. Ebenfalls wurden ein biologischer (ohne Limonenzusatz) und ein chemischer (ohne Rohextrakt) Blindwert mitgeführt. Die Produktgewinnung erfolgt durch Pentan/Ether-Extraktion. In einem weiteren Ansatz wurde NADPH als Enzymcofaktor hinzugesetzt, um eine mögliche Oxidation durch NADPH-abhängige Monooxygenasen zu fördern (siehe 3.2.4.3).

Tabelle 2-1 : Carveolbildung aus Limonen mit Rohextrakten aus *P. sapidus* und *F. proliferatum* (Dosierung 1mM, Transformationszeit 12 h).

	Extraktionspuffer	Produktbildung (<i>trans/cis</i> -Carveol)
<i>F. proliferatum</i>	A	n.n.
<i>P. sapidus</i>	A	n.n.
<i>F. proliferatum</i> , induziert	B	0,02 mg L ⁻¹
<i>P. sapidus</i> , induziert	B	n.n.
<i>F. proliferatum</i> , induziert	B + 0,24 mM NADPH	0,27 mg L ⁻¹
<i>P. sapidus</i> , induziert	B + 0,24 mM NADPH	n.n.
chem. Blindwert	-	n.n.

Wie **Tab. 2-1** zeigt, wurde eine Aufreinigung unter Aktivitätserhalt der Oxidasen nicht erfolgreich durchgeführt.

Die Umsätze blieben nach Aufschluss weit hinter den Transformationsleistungen in Ganzzellkulturen zurück. Bei *F. proliferatum* konnte die Bildung von *cis*-Carveol im Rohextrakt angenommen werden, die durch NADPH-Zugabe leicht gesteigert wurde.

2.2.7.3 Enzymextraktion mit anschließender Solubilisierung

Ziel des Versuches war die schonende Herstellung eines aktiven Enzymrohextraktes, wobei eine Solubilisierung mit dem Emulgator Triton X-100 durchgeführt wurde. Die Solubilisierung diente der Lösung der Membranproteine.

Die Kultivierung wurde wie beschrieben (2.2.7.2) durchgeführt. Für die Herstellung des Rohextraktes wurden 50 g Biofeuchtmasse durch Zentrifugation und zusätzliches Waschen mit Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, siehe 5.3.2.2) vom Medium getrennt und in einer Kugelmühle mit Extraktionspuffer und Glasperlen bei 4 °C aufgeschlossen.

Zur Solubilisierung membrangebundener Enzyme wurde der Rohextrakt in Gegenwart des Emulgators Triton X-100 auf Eis 1 h gerührt, zentrifugiert und das Pellet in Extraktionspuffer aufgenommen. Die Inkubation erfolgte unter Zugabe von *R*-(+)-Limonen (1,25 mM) mit dem jeweiligen Enzymrohextrakt und Pellet jeweils über Nacht. Zusätzlich wurde ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt (NADPH, Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase). Ebenfalls wurde ein biologischer und chemischer Blindwert mitgeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit einem Pentan/Ether-Gemisch extrahiert (siehe 5.3.2.2).

Tabelle 2-2: Produktbildung bei der Umsetzung von 1,25 mM Limonen mit zellulären Fraktionen nach Zellaufschluss von *P. sapidus* und *F. proliferatum* (12 h Transformationszeit).

	Extraktionspuffer	Produktbildung (<i>trans/cis</i> -Carveol)
<i>F. proliferatum</i>	Rohextrakt	0,89 mg L ⁻¹
	solubilisiert, Überstand	0,89 mg L ⁻¹
	solubilisiert, Pellet	0,42 mg L ⁻¹
<i>P. sapidus</i>	Rohextrakt	1,58 mg L ⁻¹
	solubilisiert, Überstand	0,70 mg L ⁻¹
	solubilisiert, Pellet	0,60 mg L ⁻¹
Blindwert	-	0,10 mg L ⁻¹

Carveol lag nahezu racemisch vor und wurde nicht in signifikantem Maße gebildet (**Tab. 2-2**). Es wurden Gehalte von maximal 1,5 mg L⁻¹ an Carveol im Rohextrakt sowie 0,7 mg L⁻¹ Carveol im solubilierten Überstand gemessen. Das Pellet enthielt kaum Transformationsprodukte. Die Transformation von *R*-(+)-Limonen gelang somit nur im Spurenbereich und wurde sowohl in der Membran/Zellwandfraktion (Pellet) wie auch im Überstand (cytosolische Fraktion) nachgewiesen. Es wurde eine etwas höhere Aktivität im Überstand nachgewiesen. Die chemische Bildung von Carveol fiel gering aus. Ein Ansatz zur Isolierung der transformationsrelevanten Enzyme wurde aufgrund der niedrigen Produktmengen nicht fortgeführt.

2.2.7.4 Transformation der Substrate Limonen, Thymol und Dimethylallylalkohol mit Kulturüberständen ausgewählter Kulturen

Eine Transformation von Terpenen kann durch Exoenzyme wie z.B. Peroxidasen oder Laccasen katalysiert werden (3.2.4).

Es wurde anhand aktiver Stämme aus der Limonentransformation getestet, ob für eine Reihe von Oxidationsprodukten, die im Screening mit Ganzzellsystemen (siehe Punkt 2.2.2) auftraten, Exoenzyme verantwortlich sind. Diese Stämme waren: *Pleurotus sapidus* DSM 8266, *Aspergillus niger* DSM 821, *Botrytis cinerea* DSM 877, *Chaetomium cochloides* DSM 1909, *Chaetomium globosum* DSM 1962, *Cunninghamella elegans* DSM 1908 und *Fusarium proliferatum* DSM 762. Zur Oxidation wurden drei Substrate Dimethylallylalkohol (3-Methylbut-2-en-1-ol) als charakteristischer C5-Terpengrundbaustein, Limonen als cyclisches, nichtaromatisches und Thymol als cyclisches aromatisches Monoterpenoid eingesetzt, um eine Aussage über die Akzeptanz von Enzymen des Kulturüberstandes bezüglich strukturell unterschiedlicher Substrate zu erhalten.

Mit Zellmasse aus Vorkulturen wurde ein mit Selen und Cobalt supplementiertes Medium ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) inokuliert (5.3.1). Die Supplementierung mit Cofaktoren diente der möglichen Induktion von Cytochrom Monooxygenasen mit Se bzw. Co als Zentralatom. Die Kulturen wurden nach drei Tagen Wachstum mit Toluol bzw. Veratrylalkohol (1 mM) induziert, die als literaturbekannte Oxidase-Induktoren gelten (siehe 3.6.2.2). Es erfolgte eine Probenahme nach Zentrifugation des Kulturüberstandes von jeweils 50 mL am 2. bzw. 7. Tag nach Induktion, wobei fehlendes Medium ersetzt wurde.

Für den Test auf Oxidase-Aktivität wurden die Kulturüberstände der jeweiligen Versuchsansätze (keine Induktion, Toluol-Induktion, Veratrylalkohol-Induktion) vereint und mit äquimolaren Mengen an Dimethylallylalkohol, Limonen und Thymol unter Zugabe von 3 % (v/v) DMF versetzt. Ebenfalls wurde ein chemischer (nur Medium, Substratzugabe) und ein biologischer (nur Kulturüberstand, keine Substratzugabe) Blindwert mitgeführt (5.3.1.2). Die Ansätze wurden nach Extraktion bzw. SPME Adsorption gaschromatographisch untersucht (5.3.1 und 5.5.3.5). Nachfolgend sind die jeweiligen Transformationsansätze näher erläutert:

Pleurotus sapidus

Für die Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* wirkte sich die Zugabe der Induktoren wachstumsinhibierend aus. Dies ließ sich u.a. an einer verminderten Glucosezehrung feststellen. Toluolinduzierte Kulturen wiesen nach sieben Tagen einen Glucosegehalt von ca. 10 g L^{-1} auf, während die Glucose in den Kulturen ohne Zusatz vollständig verbraucht war. Der pH-Wert lag während der Kultivierungen zwischen 6 und 6,5. Es wurden keine Peroxide

nachgewiesen. Als Produkte traten Neral (**27**) und Geranial (**28**, **Tab. 2-3**) als Oxidationsprodukte des *R*-(+)-Limonen an C3 und C4 auf (**Abb. 2-24**).

Tabelle 2-3: Transformationsprodukte aus der Umsetzung von Limonen mit Kulturüberständen von *P. sapidus* (24 h, 3% DMF, 1 mM Substratdosierung).

Produkt	Identifizierung	Menge [mg L ⁻¹]	Umsatz [%]	KI
Neral (27)	MS, KI	0,70	0,48	1695
Geranial (28)	MS, KI	0,85	0,58	1750

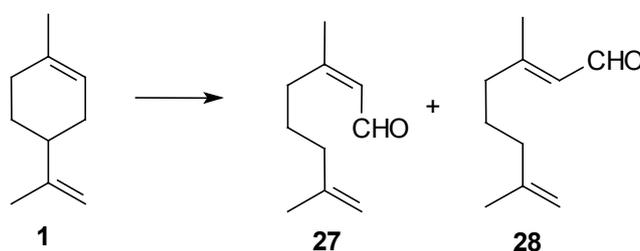


Abbildung 2-24: Oxidationsprodukte von Limonen mit Kulturüberständen von *P. sapidus*.

Aspergillus niger

Die Kulturen von *A. niger* verbrauchten die Glucose bis zum ersten Probenahmetag, der pH-Wert lag bei ca. 4,7-5,2. Aus dem Induktionsversuch mit Veratrylalkohol entstand 4-Terpineol (**11**, KI 1576 CW 20M; Produktausbeute 0,5 mg L⁻¹, 0,17 % Umsatz) und α -Terpineol (**9**, <0,1 mg L⁻¹; **Abb. 2-25**).

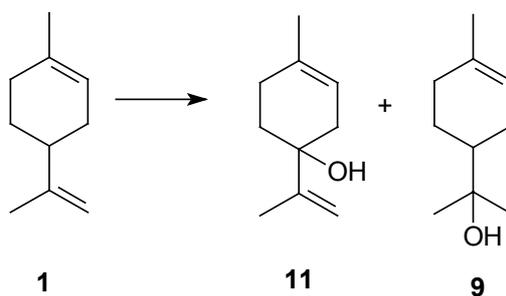


Abbildung. 2-25: Produkte aus der Hydroxylierung von **1** mit Kulturüberständen aus *A. niger*.

Bei der Umsetzung mit Kulturüberständen der anderen Organismen waren keine Produkte feststellbar.

Mit dieser Methode ließen sich Transformationsprodukte nachweisen, sie traten jedoch nur in geringen Konzentrationen auf und waren teilweise nur schwer von den jeweiligen Blindwerten zu unterscheiden. Grundlegendes Problem war eine sehr geringe

Produktausbeute. Die Oxidation der Terpenkohlenwasserstoffe Dimethylallylalkohol, Limonen und Thymol wurde deshalb mit dieser Versuchsführung nur in Einzelfällen nachgewiesen. Angestrebte Produkte wie z.B. Carveol traten nicht auf.

Teilzusammenfassung 2.2.7:

- Die Transformationen mit Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus* und *Fusarium proliferatum* lieferten keine Transformationsprodukte.
- Eine Transformation von Limonen mit Fraktionen des Zellaufschlusses führte zur Carveolgenese im mg L⁻¹-Bereich. Ein Ansatz zur Isolierung der transformationsrelevanten Enzyme wurde deshalb nicht fortgeführt.
- Die Transformation der Terpene Dimethylallylalkohol, Limonen und Thymol mit Kulturüberständen ausgewählter Pilze in DMF als Cosolvens lieferten vereinzelt Oxidationsprodukte (α -Terpineol, Neral und Geranial) in nur sehr geringen Mengen.

2.2.8 Transformation mit Lyophilisaten

2.2.8.1 Transformation mit Lyophilisaten verschiedener Kulturen

Kulturen, deren Potential zur Terpenoxidation bekannt war, wurden gefriergetrocknet und die Lyophilisate zur Transformation von *R*-(+)-Limonen eingesetzt. Hierdurch kann die Verfügbarkeit von Substraten für eine Transformation erhöht werden (3.4.5.2).

Die Lyophilisate wurden nach Rehydratisierung in einem MOPS-Puffer mit 41,4 mM *R*-(+)-Limonen versetzt und die Produktbildung nach 24 h durch Extraktion bestimmt (5.4.1 und 5.4.2). Eine Induktion von Enzymen zur Terpenoxidation kann durch Adaptation der Kultur an Terpene erreicht werden und erfolgte deshalb durch Zugabe von 20 µL *R*-(+)-Limonen nach zwei Tagen. Ebenfalls wurde anstatt des MOPS-Puffers SNLH-Medium als Transformationsmedium verwendet, um für eine ausreichende Versorgung mit Cofaktoren zu sorgen. Die Bildung von Autoxidationsprodukten (chemischer Blindwert) und die Biogenese ohne Substratzusatz wurden gemessen (biologischer Blindwert).

Tabelle 2-4: Oxidationsprodukte aus Limonentransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen in MOPS-Puffer (41,4 mM Limonendosierung, Transformationszeit 24 h; Gehalte in mg L⁻¹, In.: induzierte Kultur, CGL: *Chaetomium globosum*, PCH: *Phanerochaete chrysosporium*, MP: Isolat, POS: *Pleurotus ostreatus*, PSA: *Pleurotus sapidus*).

	PSA	PSA, In.	CGL	CGL, In.	PCH	PCH, In.	POS	POS, In.	MP	MP, In.
<i>cis</i> -Limonenepoxid	22,1	42,3	3,8	6,7	0	0	4,7	4,7	0	0
<i>trans</i> -Limonenepoxid	6,8	15,9	0	0	0	0	1,6	1,6	0	0
<i>trans</i> -2,8-Menthadien-1-ol	19,1	28,5	0	0	0	0	5,1	12,8	0	0
<i>cis</i> -2,8-Menthadien-1-ol	17,2	25,4	0	0	0	0	3,2	11,4	0	0
Carvon	47,3	106,0	0	0	0	0	6,7	38,2	0	0
<i>trans</i> -Carveol	37,4	60,9	0	0	0	0	9,8	14,5	0	0
<i>cis</i> -Carveol	16,6	24,6	0	0	0	0	8,2	13,3	0	0
Linalool	1	2,1	0	3,7	1,8	1,3	1,1	1,2	1,5	0,9

Es traten wesentlich höhere Produktmengen im Vergleich zu einer Transformation in Submerskultivierung auf (Vergleiche 2.2.2), wobei nur bestimmte Stämme eine hohe Aktivität zeigten (*P. sapidus* und *P. ostreatus*, **Tab. 2-4**). *Pleurotus sapidus* oxidierte *R*-(+)-Limonen zu Limonenepoxid, Carveol, Carvon und 2,8-Menthadien-1-ol.

Es zeigte sich eine eindeutige Produktsteigerung bei einer Transformation in nährstoffreichem SNLH-Medium im Gegensatz zu einer Transformation im Puffersystem

(Abb. 2-26). Ebenfalls zeigte eine Induktion der Kultur eine Steigerung der Ausbeute (Faktor 2 bis 4) für fast alle Transformationsprodukte.

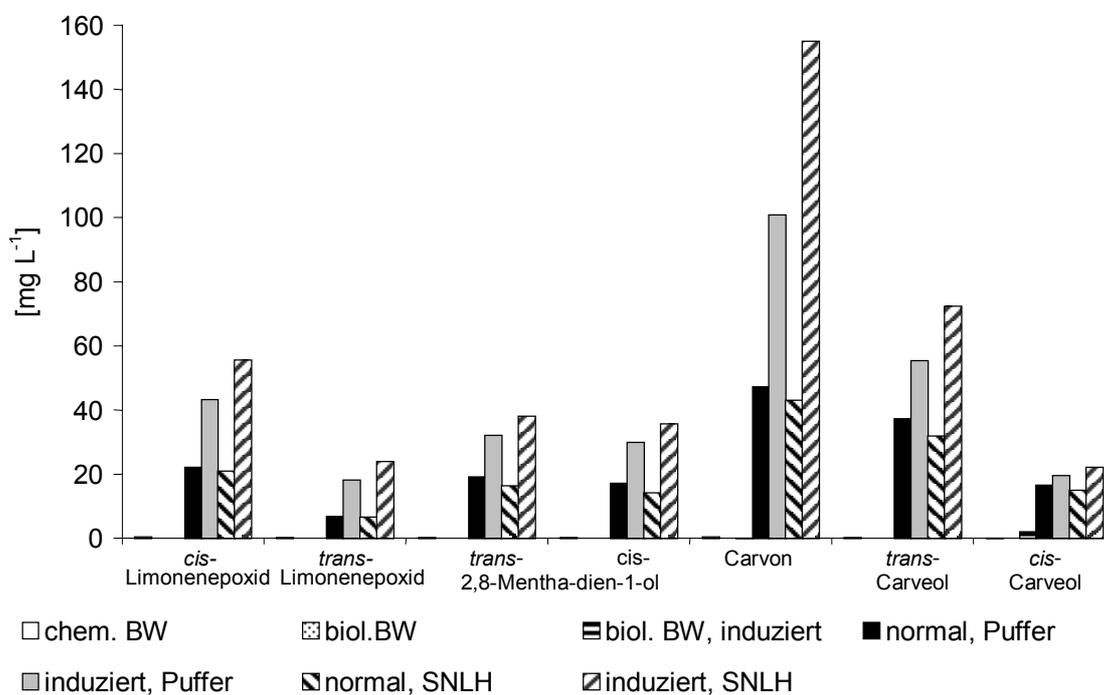


Abbildung 2-26: Produkte der Limonentransformation mit induzierten und nicht-induzierten Lyophilisaten aus *P. sapidus* in MOPS-Puffer und SNLH-Medium (Dosierung 41,4 mM *R*-(+)-Limonen; 13h Transformationszeit).

Die stereochemische Analyse der gebildeten Produkte Carveol und Carvon zeigt **Tab. 2-5**. *R*-(+)-Limonen wurde mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* annähernd racemisch zu *R*-(-)- bzw. *S*-(+)-Carvon und den jeweiligen Carveolisomeren transformiert. *P. ostreatus* zeigte dagegen eine leicht bevorzugte Bildung des *R*-(-)-Carvons, wobei die Carveolgenese ebenfalls annähernd racemisch verlief.

Tabelle 2-5: Stereochemische Analyse der Transformationsprodukte aus der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen (30 mM) mit Lyophilisaten aus angegebenen Kulturen (24 h Transformationszeit).

Kultur	Carvon / %		Carveol / %			
	<i>S</i> -(+)-	<i>R</i> -(-)-	<i>trans</i> -(+)-	<i>trans</i> -(-)-	<i>cis</i> -(+)-	<i>cis</i> -(-)-
<i>P. sapidus</i>	50,1	49,9	25,6	43,7	20,3	10,4
<i>P. ostreatus</i>	26,7	73,2	30,3	24,1	25,4	20,1

2.2.8.2 Einfluss von Cosolventien auf die Transformation mit Lyophilisaten

Biotransformationen werden im Allgemeinen in wässrigen Systemen durchgeführt. Eine Anwendung von organischen Lösungsmitteln kann jedoch die Verfügbarkeit von lipophilen Substraten erhöhen, wenn das Verteilungsgleichgewicht von Edukt und Substraten/Produkten im wässrigen Medium unvorteilhaft ist. Es bot sich der Einsatz von organischen Lösungsmitteln zur Verbesserung der Reaktionsbedingungen an, um eine Freisetzung der Produkte zu erleichtern. Ein geeignetes Lösungsmittel wurde anhand des Verteilungskoeffizienten im Zweiphasensystem Octanol/Wasser ($\log P_{O/W}$, berechnet nach Meylan, 1995) ermittelt. n-Decan ($\log P_{O/W}$ 5,67) bot sich als ein Cosolvens an, das einen optimalen $\log P$ -Wert für eine Zweiphasentransformation besitzt und gleichzeitig nur geringe Interferenzen in der gaschromatographischen Analyse der Extrakte zeigte (3.4.3.2). Dimethylformamid (DMF, $\log P_{O/W}$ -0,46) zeigt insbesondere bei der Transformation mit instabilen Enzymsuspensionen oder auch Rohextrakten eine gesteigerte Produktbildung (Schüler, 2002) im Konzentrationsbereich von 20% (v/v) DMF im Medium. Die Transformation von *R*-(+)-Limonen wurde zum einen in 90% n-Decan und 10% MOPS-Puffer und zum anderen unter Zusatz von 20% (v/v) DMF zum Rehydratisierungspuffer durchgeführt und mit einem Kontrollansatz verglichen (wässriges Puffersystem; **Abb. 2-27**).

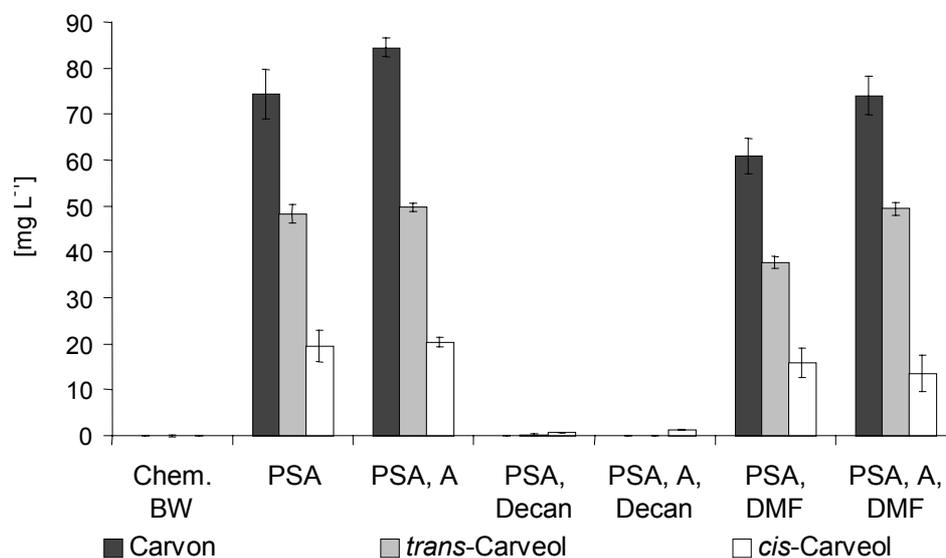


Abbildung 2-27: Transformation mit Lyophilisaten von *P. sapidus* in 20% (v/v) DMF in MOPS-Puffer und n-Decan (Dosierung 41,4 mM; Transformationszeit 13 h).

Während n-Decan die Aktivität der Lyophilisate vollständig inhibierte, zeigte sich bei der Anwendung von 20% (v/v) DMF eine geringfügige Minderung der Produktbildung. Eine Produktsteigerung wurde nicht beobachtet.

Teilzusammenfassung 2.2.8:

- Die Transformation mit lyophilisierter Zellmasse zeigte im Vergleich zur Submerskultivierung insbesondere für *Pleurotus sapidus* eine erheblich höhere Carvon- und Carveolbildung von 150 mg L⁻¹ bzw. 70 mg L⁻¹, wobei sich cofaktorreiche Transformationsmedien als ausbeutesteigernd erwiesen. Die Carveol und Carvonbildung verlief annähernd racemisch.
- Die Zugabe von Cosolventien wie Dimethylformamid und n-Decan zur Limonenumsetzung hatten keinen bzw. einen stark deaktivierenden Effekt auf die Transformationsleistung bezüglich der Carvonbildung.

2.3 Biokonversion des Sesquiterpens Valencen

Das cyclische Sesquiterpen (+)-Valencen (3-Isopropenyl-4a,5-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalene; CAS 4630-07-3) ist neben Limonen, Myrcen und Linalool eine Komponente der etherischen Öle von Valencia-Orangen und der Grapefruit mit einem Gehalt von bis zu 0,4% (Ohloff, 1990). Mit diesem relativ zu anderen Ölen hohen Sesquiterpengehalt bot es sich als verfügbare Ausgangsverbindung für Biotransformationen an (3.2.2). Hieraus wurden durch biokatalytisch aktive Mikroorganismen oxidierte Produkte mit interessantem sensorischen Eindruck hergestellt. Besonders (+)-Nootkaton (6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one; CAS 4674-50-4) stellt als *character-impact-compound* der Pampelmuse (3.1.4) ein wertvolles und daher erstrebenswertes Produkt dar.

2.3.1 Autoxidation von (+)-Valencen

Die Messung der Autoxidation von (+)-Valencen (chemischer Blindwert) war zur Unterscheidung einer chemischen Nootkatonbildung und einer Biotransformation nötig. Die Autoxidation (Inkubation von SNLH-Medium mit 2,25 mM unter Standardkultivierungsbedingungen, 5.2.3.8) verlief nur langsam (**Abb. 2-28**). Es wurden keine Nootkatongehalte von mehr als 2 mg L⁻¹ gemessen. Es bildeten sich neben Nootkaton sowohl α - als auch β -Nootkatol als Racemat und Epoxynootkaton im Spurenbereich. (+)-Valencen wurde nur langsam aus dem Kulturmedium ausgetragen.

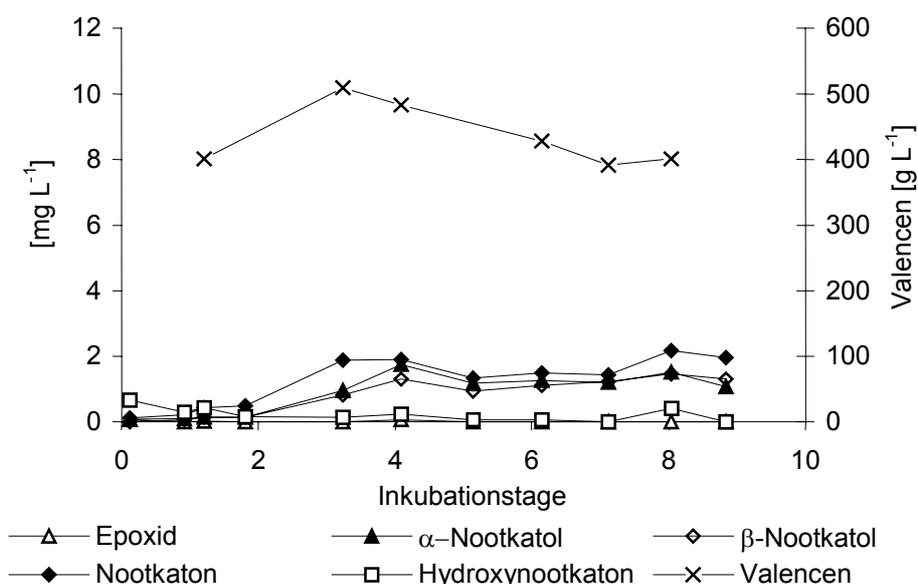


Abbildung 2-28: Autoxidation von (+)-Valencen (2,25 mM) im 200 mL Schüttelkolben.

2.3.2 Transformationsleistung verschiedener Mikroorganismen

Um eine geeignete Transformationskultur für die Konversion oder Transformation von Valencen zu Oxidationsprodukten zu finden, wurde ein Stamm-Screening durchgeführt. Hierzu wurden 40 Kulturen verwendet (22 Basidiomyceten, 9 Ascomyceten, 4 Hefen und 5 Bakterienstämme). Die Auswahl der Stämme wurde nach den gleichen Kriterien durchgeführt wie unter Punkt 2.2.2.1 für die Transformation von Limonen beschrieben. Zusätzlich wurden Kulturen mit besonders hoher Aktivität bezüglich der Limonentransformation ausgewählt.

Die aus den jeweiligen Stämmen angezogenen Submerskulturen wurden mit 2,25 mM Valencen direkt supplementiert. Die Probenahme erfolgte über eine Woche, wobei neben der täglichen dünnschichtchromatographischen Bestimmung über Derivatisierung des Nootkatons zum Dansylhydrazon (siehe Punkt 2.1.1) die gaschromatographische Produktbestimmung an jedem vierten Kulturtag nach Substratzugabe durchgeführt wurde. Eine Transformation mit Bakterien wurde nur für einen Zeitraum von maximal 24 h durchgeführt. Die Ergebnisse der Kulturen mit höchster Transformationsaktivität nach 96 h Transformationszeit zeigt **Tab. 2-6**, eine Übersicht über die untersuchten Mikroorganismen befindet sich im experimentellen Teil unter 5.1.1. Insgesamt waren im Gegensatz zur Oxidation des Monoterpens Limonen nur wenige Organismen in der Lage, das Sesquiterpen (+)-Valencen zu metabolisieren. Nootkatongehalte von $>1 \text{ mg L}^{-1}$ traten selten auf.

Tabelle 2-6: Kulturen mit einer gebildeten Nootkatonmenge von mehr als 1 mg L^{-1} (blindwertbereinigt; Valencendosierung 2,25 mM).

Kultur	Produktbildung Nootkaton [mg L^{-1}]	Glucosegehalt [% w/v]	Biotrocken- masse [g L^{-1}]	pH
<i>Chaetomium globosum</i>	5,5	1	11,4	6,97
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,2	1	8,3	5,90
<i>Trametes versicolor</i>	1,1	0,5	7,2	5,81
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	1,4	0,1	5,7	5,23

2.3.3 Transformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum*: Kinetik der Produktbildung und -degradation

Der Ascomycet *Chaetomium globosum* zeigte während des Aktivitätsscreenings die höchste Nootkatonkonzentration und wurde deshalb eingehender untersucht. *Chaetomium globosum* bildete aus (+)-Valencen Hydroxylierungsprodukte wie Nootkatol und Valencendiole, die zum Nootkaton und weitergehend zum Epoxynootkaton oxidiert wurden. Des Weiteren wurde die Doppelbindung in C11-Stellung zum Valencen-11,12-epoxid oxidiert (**Abb. 2-29**). Zielprodukt der Transformation war das aromawirksame Keton Nootkaton. Produkte, in denen zwei Sauerstoffatome und mehr eingeführt wurden, waren aufgrund ihres hohen Dampfdrucks und des daraus resultierenden hohen Siedepunktes nicht aromarelevant. Sie wurden dennoch soweit möglich identifiziert, da sie für das Verständnis der Sesquiterpenmetabolisierung wichtig sind. So wurden z.B. Epoxynootkaton als Oxidationsprodukt des Nootkatons nachgewiesen. Die Produktidentifizierung ist in Abschnitt 2.3.4 dargestellt.

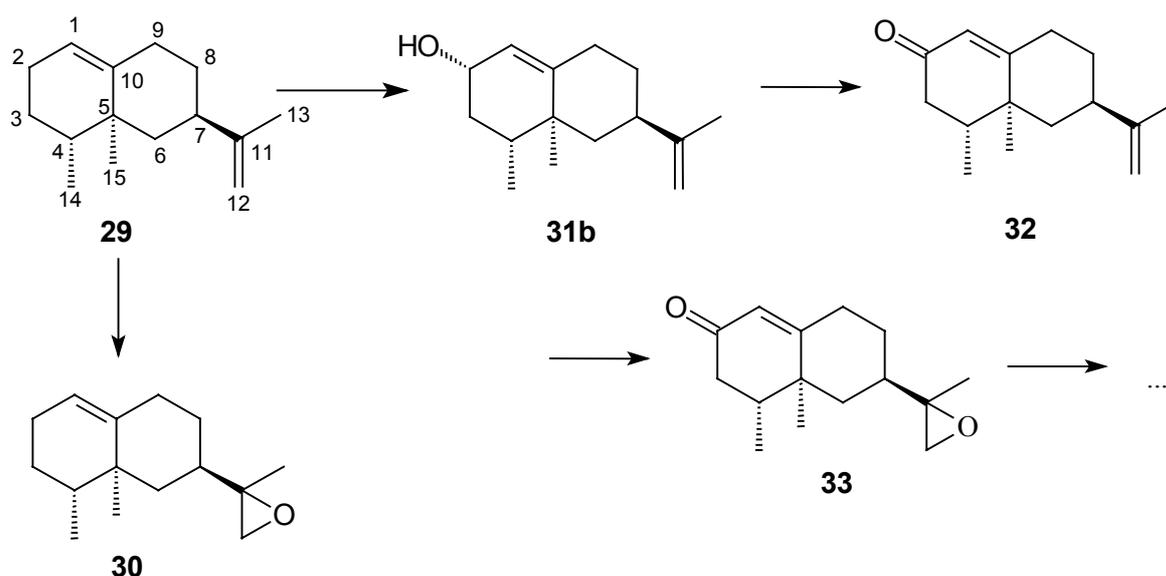


Abbildung 2-29: Transformation von (+)-Valencen (**29**) zu den Verbindungen β -Nootkatol (**31b**), Nootkaton (**32**), 11,12-Epoxynootkaton (**33**) und Valencen-11,12-epoxid (**30**). Weitere Produkte siehe 2.3.4.

Die Kinetik der Nootkatonbiogenese wurde in einer 200-mL Submerskultur gemessen (SNLH-Medium). Es wurde eine drei Tage alte Transformationskultur mit 2,25 mM (+)-Valencen supplementiert und über einen Zeitraum von einer Woche Proben genommen, die nach 5.5.1.1 aufgearbeitet wurden. Das Maximum der Nootkatonkonzentration wurde am dritten Transformationstag mit 8 mg L^{-1} erreicht (**Abb. 2-30**). Auffallend war eine simultane

Abnahme des Nootkatongehaltes zugunsten des Epoxyntookatons nach Erreichen der maximalen Nootkatonmenge. (+)-Valencen wurde als Precursor innerhalb von 9 Tagen zu 98% abgebaut bzw. aus dem System ausgetragen. Valencen-11,12-epoxid wurde bis zu 1 mg L^{-1} gebildet; β -Nootkatol erreichte eine Konzentration von 1 mg L^{-1} . α -Nootkatol war in der Submerskultivierung nur in Spuren nachweisbar ($< 0,2 \text{ mg L}^{-1}$).

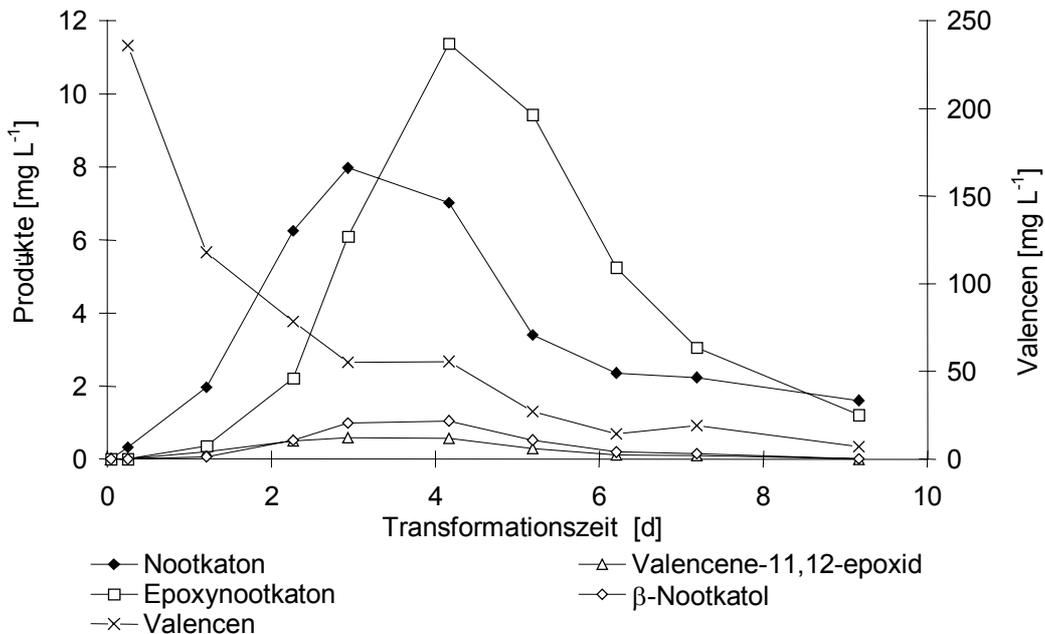


Abbildung 2-30: Kinetik der Bildung von Nootkaton und weiteren Produkten und der Abbau von (+)-Valencen durch *C. globosum* im Schüttelkolben ($2,25 \text{ mM}$ Valencendosierung).

Das Wachstum der Kultur stagnierte nach Zugabe von (+)-Valencen am dritten Kultivierungstag bei 8 g L^{-1} Trockenmasse, während eine Vergleichskultivierung von *C. globosum* ohne Valencendosierung eine Biotrockenmasse von 14 g L^{-1} am achten Kultivierungstag erreichte (**Abb. 2-31**). Glucose wurde im Gegensatz zur Vergleichskultur zu diesem Zeitpunkt bis auf einen Restgehalt von 0,5% verbraucht, während ein vollständiger Abbau bei der Kontrollkultur (keine Zugabe an (+)-Valencen) bis zum sechsten Kulturtag erfolgte.

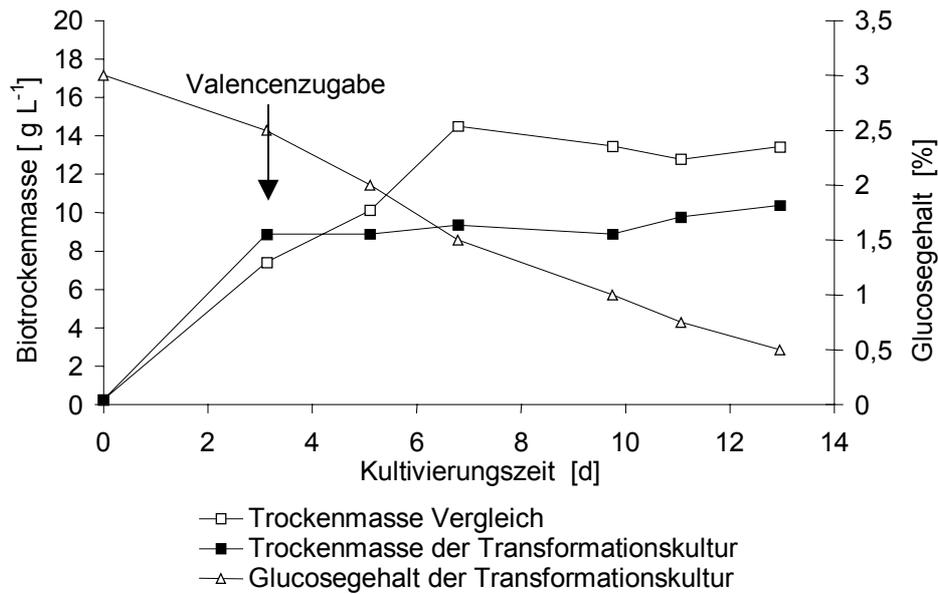


Abbildung 2-31: Wachstum und Glucoseverbrauch von *C. globosum* über den Kulturverlauf mit und ohne Valencenzugabe (2,25 mM).

Teilzusammenfassung 2.3.1- 2.3.3:

- Die Autoxidation von (+)-Valencen führte zu einer Bildung von bis zu 2 mg L⁻¹ Nootkaton, die aufgrund fehlender Sauerstoffverarmung im Medium nur schwer mit der Nootkatonbiogenese in Zellkulturen vergleichbar war.
- Im breit angelegten Screening wurde der Ascomycet *Chaetomium globosum* als oxidationsaktiver Organismus für die Biooxidation von (+)-Valencen gefunden. Bei der Biokonversion wurden Valencenepoxid, Nootkatol, Nootkaton und mehrfach oxidierte Produkte gefunden (siehe 2.3.4). Nootkaton wurde bis zu 10 mg L⁻¹ gebildet.
- Nach Valencendosierung fand keine messbare Biomassenneubildung mehr statt. Die Glucosezehrung verlief im Vergleich zu einer Kultivierung wesentlich langsamer.

2.3.4 Identifizierung von Valencentransformationsprodukten

Die Oxidationsprodukte aus der Valencentransformation mit *Chaetomium globosum* wurden durch Extraktion aus Transformationskulturen nach 96 stündiger Umsetzung (1 L-Maßstab) gewonnen. Der Extrakt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel fraktioniert und vor und nach Silylierung massenspektroskopisch untersucht (5.9.2.5).

Die Identifizierung erfolgte A) über Referenzmassenspektren (Kennzeichnung „MS“ in **Tab. 2-7**), B) über den Vergleich mit Literatur-Kovats-Indices (Kennzeichnung „KI“), C) über den Vergleich mit Massenspektren und Retentionszeiten von authentischen Standards („Std.“), abgeleitet aus dem Fragmentierungsmuster der Moleküle im MS-Spektrum (3.2.6) und D) über den Vergleich der NMR-Spektren mit synthetisierten Referenzsubstanzen (Kennzeichnung „NMR“). Insbesondere hoch siedende Verbindungen wurden wegen ihrer olfaktorischen Irrelevanz nur hinsichtlich funktioneller Gruppen charakterisiert, wobei für die Regiochemie Strukturvorschläge gegeben wurden (siehe 3.2.6).

Die wichtigsten Produkte, die sich bei der Valencentransformation mit *C. globosum* gebildet haben, sind in **Tab. 2-7** zusammengefasst. **Abb. 2-32** zeigt die unsilyliert charakterisierbaren flüchtigen Produkte **30-34**.

Tabelle 2-7: Transformationsprodukte der Valencentransformation (nicht silylierte Verbindungen; mit ¹ markierte Verbindungen sind silyliert; ²nicht chromatographierbar auf polarer Säule).

	Produkt	KI (CW20M)	KI (DB5)	M / [M ⁺]	Identifizierung
30	Valencen-11,12-epoxid	2081	1679	220	Std., MS, NMR
31a	α -Nootkatol	2426	1683	220	Std., MS, NMR
31b	β -Nootkatol	2394	1711	220	Std., KI, MS
32	Nootkaton	2471	1825	218	Std., KI, MS
33	Nootkaton-11,12-epoxid	>2800	2011	234	Std., MS, NMR
34	Hydroxyoxovalencen	> 2800	2173 ¹	234/306 ¹	MS
35	Valencendiol 1	- ²	2193 ¹	380 ¹	MS
36	Valencendiol 2	- ²	2265 ¹	380 ¹	MS
37	Valencenketodiol o.ä.	- ²	2290 ¹	250/394 ¹	MS
38	Valencentriol o.ä.	- ²	2343 ¹	252/396 ¹	MS

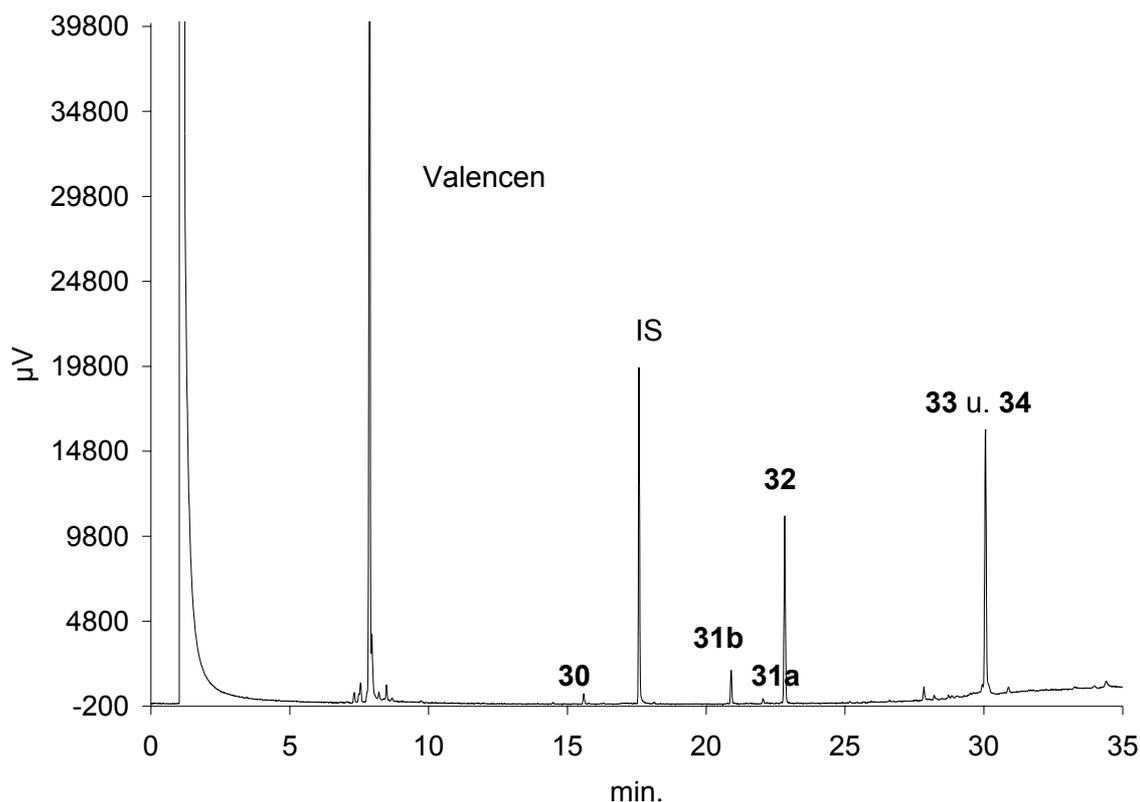


Abbildung 2-32: GC-Chromatogramm eines Extraktes der Valencentransformation mit *C. globosum* auf polarer Trennsäule (CW 20 M; IS: innerer Standard Thymol, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$); Verbindung **33** und **34** koeluiieren auf einer Carbowax-GC-Säule.

2.3.4.1 Valencen-11,12-epoxids (**30**)

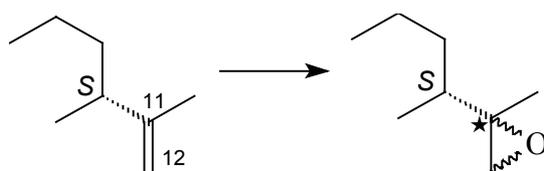
30 (2-Methyl-2[(2*R*,8*R*,8*a*S)]-1,2,3,4,6,7,8,8*a*-octahydro-8,8*a*-dimethyl-2-naphthylenyloxiran; CAS 439112-89-7) wurde zur Strukturbestimmung aus (+)-Valencen durch eine Epoxidierung mit *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) hergestellt (5.7.1). Nach säulenchromatographischer Fraktionierung an Kieselgel wurde es mittels präparativer Gaschromatographie von seinen Strukturisomeren getrennt und über Kernresonanzspektroskopie identifiziert (5.9.2.6 und 5.11). Die ^1H - wie ^{13}C -Verschiebungen wurden dem Valencen-11,12-epoxid zugeordnet (**Abb. 2-33** und **Abb. 2-34**). Da jedoch bei der Chemosynthese beide stereoisomeren Epoxide entstehen, die sich chromatographisch nur antrennen ließen und kernresonanzspektroskopisch nur schwer zu unterscheiden waren, wurde die Stereochemie an den C-Atomen 4,5,7 aufgrund der Stereochemie des Precursors (+)-Valencen festgelegt. Die Entstehung von zwei Stereoisomeren wird durch die Aufspaltung fast aller Signale im ^{13}C -NMR deutlich (**Abb. 2-33**). Es entstand ein äußerst komplexes ^1H -NMR. Die Duplizitäten wurden, soweit möglich, mit den jeweiligen Kopplungen angegeben und mit den berechneten Werten des Inkrementsystems verglichen (Hesse *et al.*, 2002; ChemdrawUltra[®]; **Tab. 2-8**).

Insgesamt ergab sich eine gute Signalübereinstimmung, wodurch die Regiochemie der Epoxygruppe an den C-Atomen 11 und 12 eindeutig bestimmt wurde.

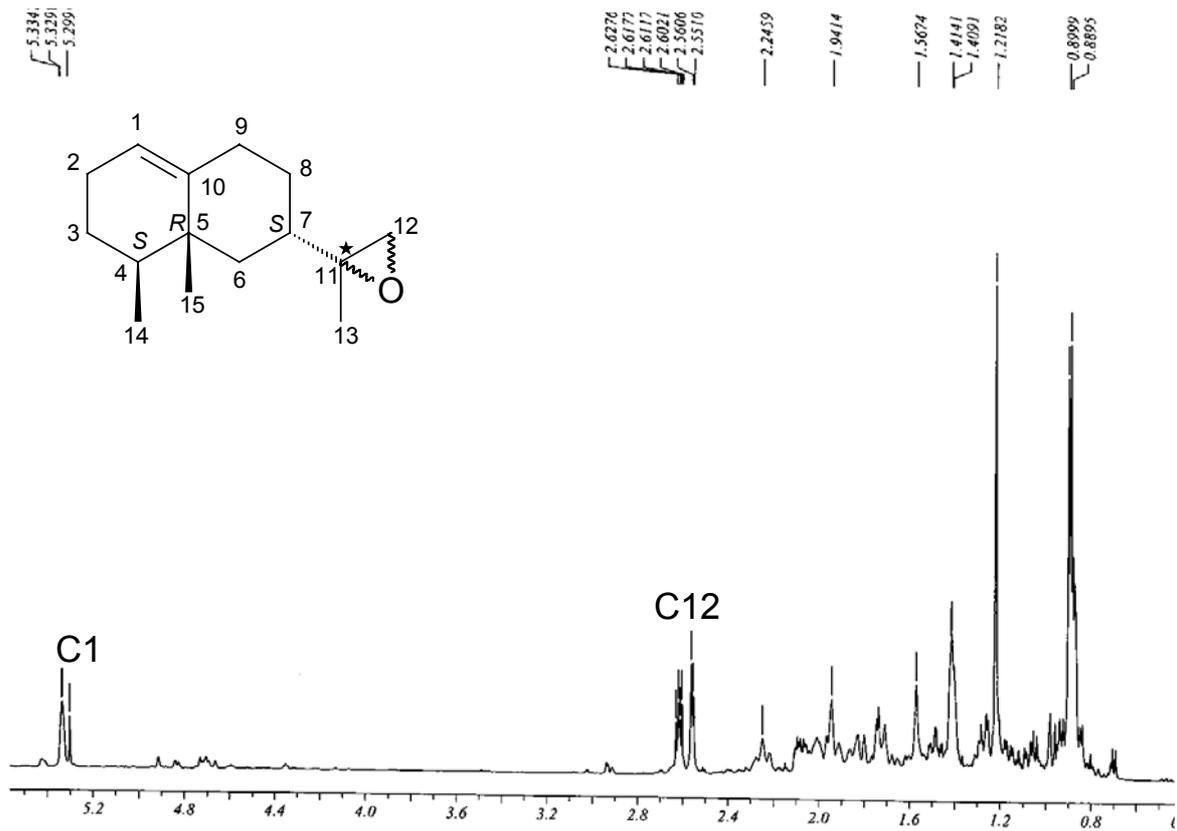
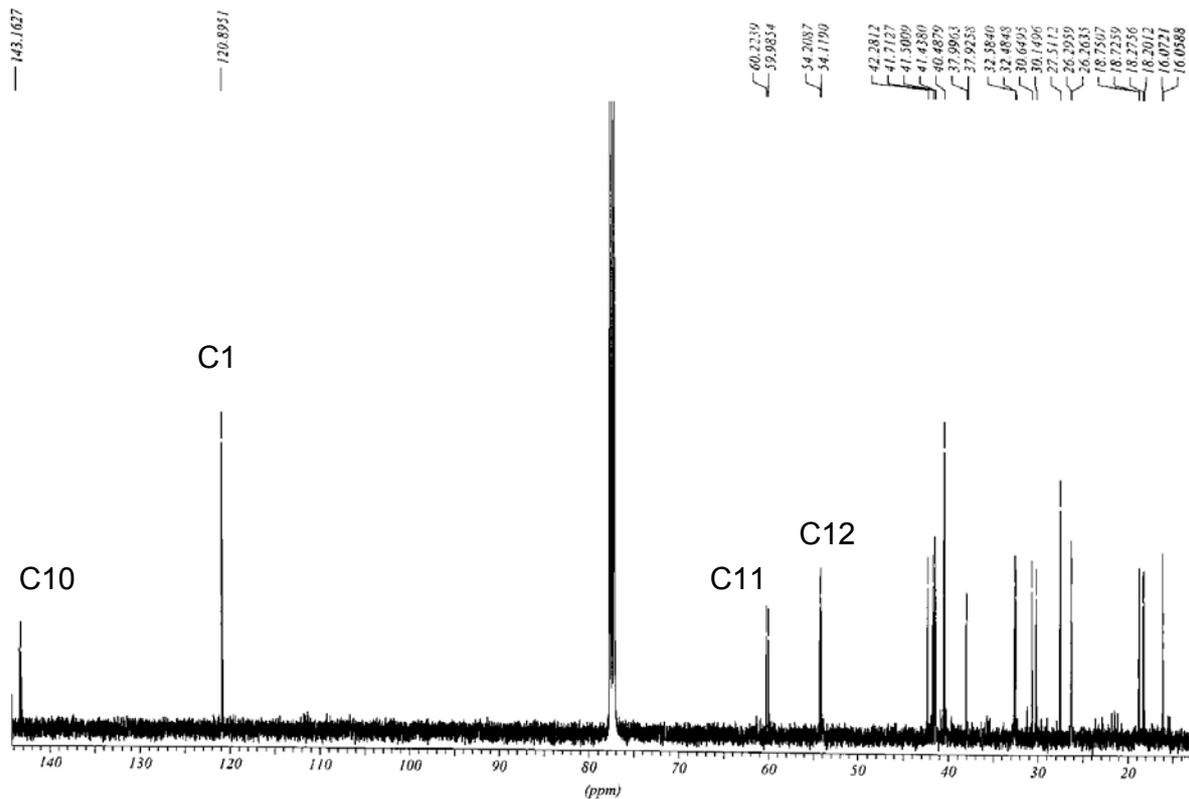
Tabelle 2-8: NMR-Strukturdaten des Valencen-11,12-epoxids (**30**). Aufgespaltete ^{13}C -Signale wurden mit * gekennzeichnet.

Position C-Atom	^{13}C -NMR δ (100 MHz, CDCl_3)	^{13}C -NMR (berechnet)	^1H -NMR δ (400 MHz, CDCl_3)	Multiplizität, J, Integral	^1H -NMR (ber.)
1	120,9	122,8	5,33	d, 1H	5,37
2	32,5*	27,1	2,02	q, J=4 Hz, 2H	1,96
3	26,3*	34,7	1,74	q, J=4,8 Hz, 2H	1,61
4	41,7*	42,0	2,05	m, 1H	1,80
5	40,4	41,4	-	-	-
6	37,9*	35,6	2,25	d, J=14 Hz, 2H	1,21
7	42,3*	42,2	1,72	m, 1H	1,78
8	27,5	28,4	1,41	2H	1,29
9	30,2*	33,0	1,96	t, J=?, 2H	1,96
10	143,2*	149,0	-	-	-
11	60,0*	60,5	-	-	-
12	54,2*	52,1	2,62	d, J = ?, 2H	2,46
13	18,7*	21,3	0,88	s, 3H	1,26
14	16,1*	15,5	0,89	d, 3H	1,06
15	18,2*	20,0	1,21	s, 3H	1,26

Die Konfiguration von **30** ließ sich von dem positionsisomeren 1,10-Epoxid durch die Auflösung der Verschiebung der C(11)=C(12) Doppelbindung von $\delta_{\text{H}(12)}$ 4,71 (Valencen) zu 2,60 (Epoxid; $\delta_{\text{C}(11)} = 60,0$; $\delta_{\text{C}(12)} = 54,2$) abgrenzen, dafür blieben die Verschiebungen der C(1)=C(10) Bindung ($\delta_{\text{H}(1)}$ 5,33; $\delta_{\text{C}(1)} = 120,9$; $\delta_{\text{C}(10)} = 143,2$) erhalten:



Ein 1,10-Epoxid besitzt ein breites Singulett für terminale Protonen an C(12) mit $\delta_{\text{H}(12)} = 4,70$ und ein Proton an C(1) als Triplett mit $\delta_{\text{H}(1)} = 3,00$ (2Hz) am Oxiranring (Shaffer *et al.*, 1995). Die C-Verschiebung im 1,10-Epoxid für C(11) beträgt $\delta_{\text{C}(11)} = 150,4$, für C(12) $\delta_{\text{C}(12)} = 108,9$ und für C(1) $\delta_{\text{C}(1)} = 60,6$ (Näf *et al.*, 1996).

Abbildung 2-33: ^1H -NMR des Valencen-11,12-epoxids (30).Abbildung 2-34: ^{13}C -NMR-Spektrum des Valencen-11,12-epoxids (30).

In der Biotransformation mit *C. globosum* bildete sich nur *ein Isomer (30a)* mit dem Kovats-Index von 2081 (CW 20M), während die chemische Synthese zwei Stereoisomere (**30a** und **30b**) lieferte (**Abb. 2-35**). Die massenspektroskopisch sehr ähnlichen Epoxide unterscheiden sich nur durch die leicht unterschiedlichen Retentionszeiten. Eine Isolierung des Biotransformationsproduktes wurde aufgrund der geringen Konzentration nicht durchgeführt.

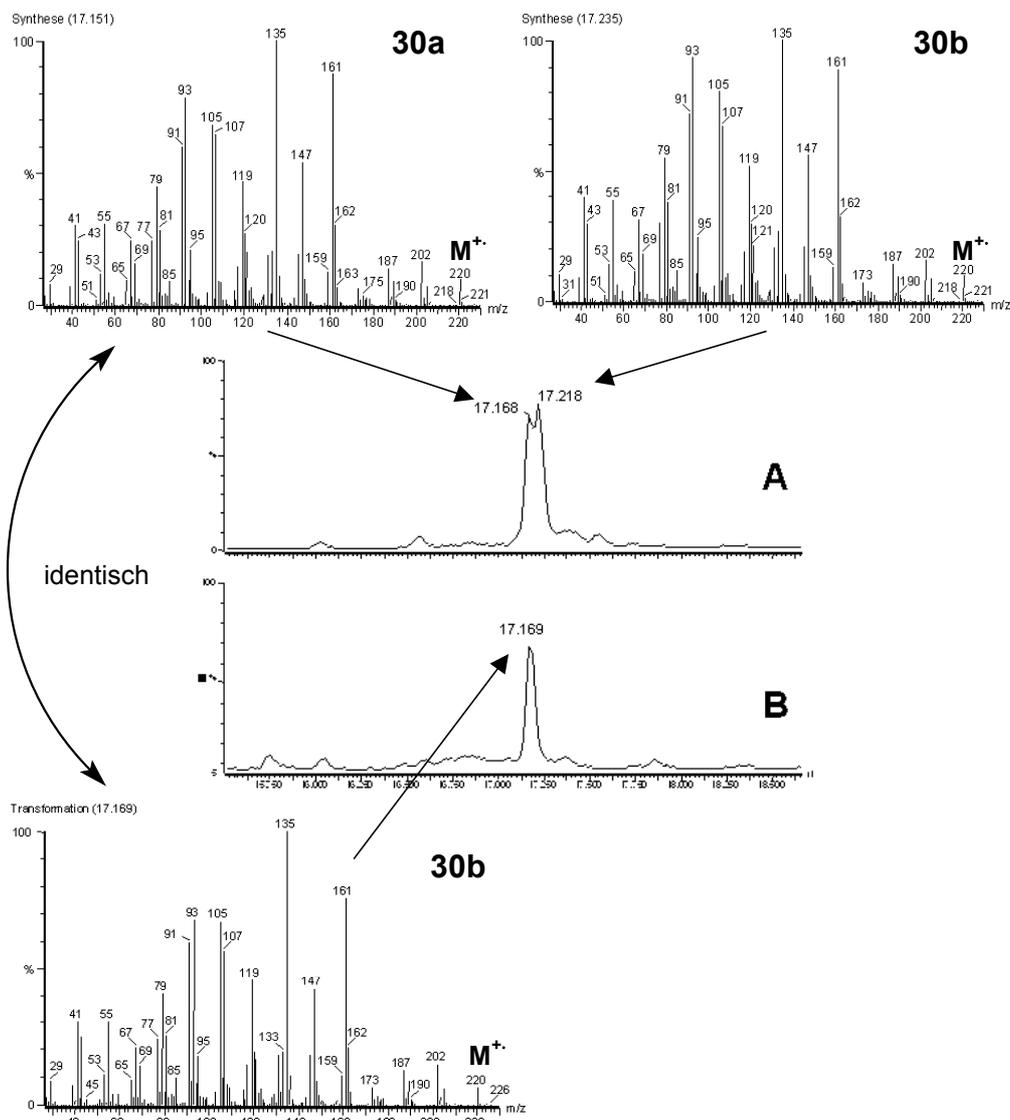


Abbildung 2-35: Chromatographische Trennung der Isomere des Valencen-11,12-epoxids auf CW 20M mit den Massenspektren (EI, 70 eV) der Epoxide aus der Chemosynthese (**A**, **30a** und **30b**) sowie dem mit **30b** identischen Transformationsprodukt **30b** (**B**).

2.3.4.2 α - und β -Nootkatol (2-Hydroxyvalencen, **31a** bzw. **31b**)

Nootkatol (**31**, $4\alpha,4\alpha$ -dimethyl-6 β -(1-methylethenyl)-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydronaphthalen-2 β -ol; CAS 32433-11-7) wurde durch die Reduktion von Nootkaton mit

Natriumborhydrid gewonnen (5.7.2). Hierbei entstanden sowohl α - als auch β -Nootkatol, wobei das α -Nootkatol (**31a**) in Überschuss vorlag und β -Nootkatol (**31b**) nur in geringen Mengen gebildet wurde. **31a** wurde nach Isolierung aus der Synthese kernresonanzspektroskopisch untersucht, wobei die ^1H - und ^{13}C -Signale mit den literaturbekannten Strukturdaten übereinstimmten. **31a** zeichnete sich insbesondere durch *cross*-Signale im $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY zwischen den Protonen des C-Atoms 2 und 7 aus, da diese durch ihre stereochemische Nähe im Gegensatz zu **31b** korrelierten (NOE). Die Strukturdaten befinden sich in Abschnitt 5.7.2.

Die Identifizierung von **31b** wurde durch Vergleich mit Kovats Index und MS erbracht (**Abb. 2-36**). Die Massenspektren der synthetisierten Verbindungen **31a/b** und des Biotransformationsproduktes waren identisch. De Kraker *et al.* (2003) ermittelten einen KI für **31b** auf einer unpolaren HP5-Säule mit 1722, der gemessene Wert lag mit 1711 (DB5) in guter Übereinstimmung. Das über NMR identifizierte α -Nootkatol **31a** hatte einen KI von 1683 (DB5).

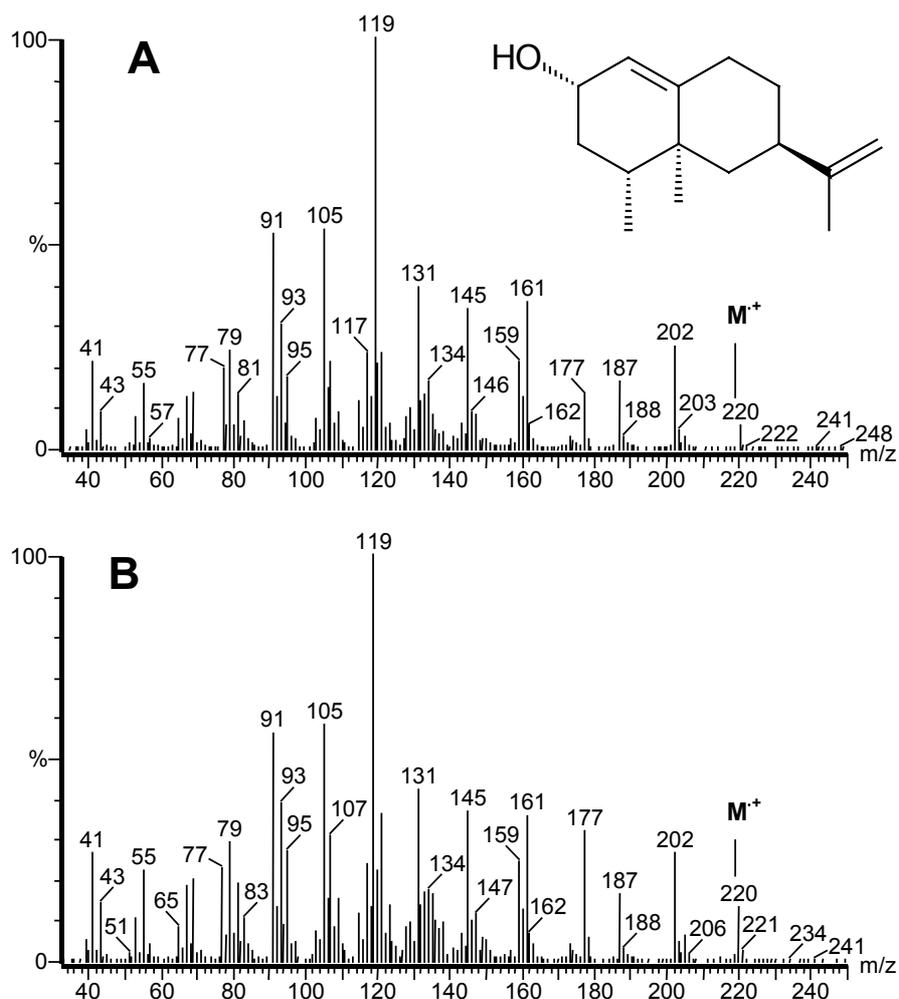


Abbildung 2-36: Massenspektrum des β -Nootkatols (**31b**) als Syntheseprodukt (**A**) und Biotransformationsprodukt (**B**), EI, 70 eV.

2.3.4.3 (+)-Nootkaton (32)

32 wurde durch den Kovats Index und das Massenspektrum einer kommerziellen bzw. synthetischen Referenz identifiziert. Dabei wurde Nootkaton durch Oxidation von (+)-Valencen mit tert.-Butylchromat dargestellt (5.7.2).

2.3.4.4 Nootkaton-11,12-epoxid (33) und Oxidationsprodukt 34

Der Metabolit **33** mit dem Kovats Index von > 2800 (CW20M; KI [DB5] 2011) besaß eine Molekülmasse von m/z 234. Die Bestimmung der exakten Molekülmasse gestaltete sich aufgrund der Koelution von **33** und **34** Verbindungen und weiterer Metabolite zunächst als schwierig, wurde aber durch Massenspektroskopie im CI-Modus mit m/z 235 ($M^+ + H$) bestätigt (**Abb. 2-37**). Somit wurde die Molekülmasse durch Oxyfunktionalisierung von m/z 204 ($[M^{+\bullet}]$ des Valencens) um 30 erhöht, was einer zusätzlichen Epoxy- oder Hydroxy- ($m/z + 16$) und einer Carbonylfunktion ($m/z + 14$) entspricht. **33** wurde chemisch aus Nootkaton (**32**) durch eine Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoesäure hergestellt (5.7.3); die Massenspektren erwiesen sich als identisch zu **Abb. 2-38**. **33** wurde nicht silyliert. Somit handelte es sich um ein Epoxynootkaton.

Auffallend war eine Fragmentierung zwischen den C-Atomen C7 und C11 mit der Masse m/z 177, die nur durch eine Epoxidierung an C11 und 12 erklärt werden konnte. Somit handelte es sich hier um ein Nootkaton-11,12-epoxid (4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4,4a-dimethyl-6-(2-methyloxiranyl)- (4R,4aS,6R)-2(3H)-Naphthalenone; CAS 438536-22-2).

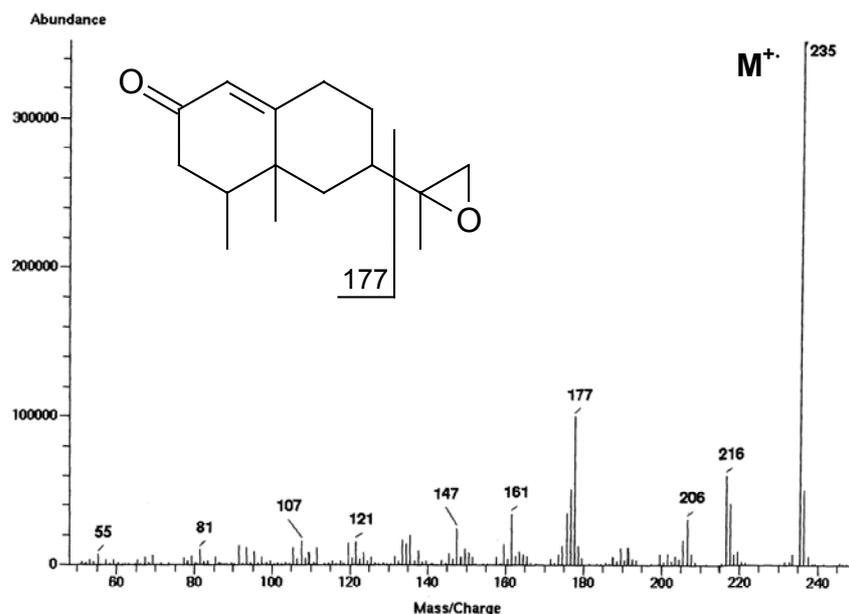


Abbildung 2-37: Massenspektrum (CI) von Verbindung **33** aus der Transformation von Valencen mit *C. globosum*.

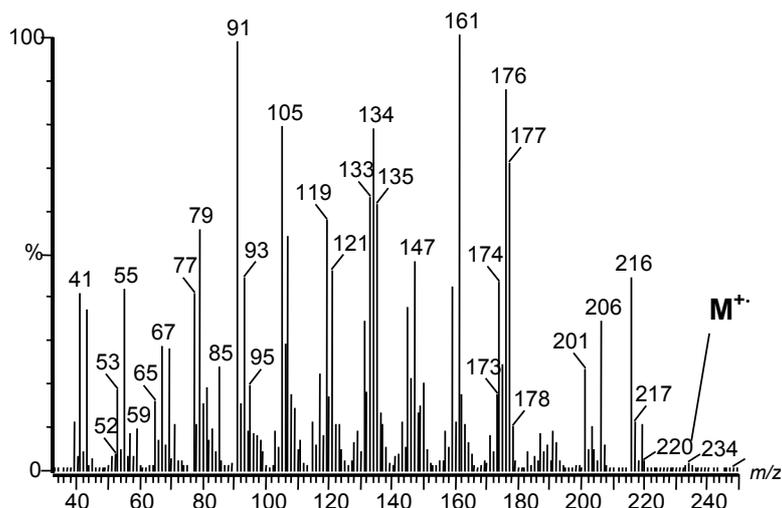


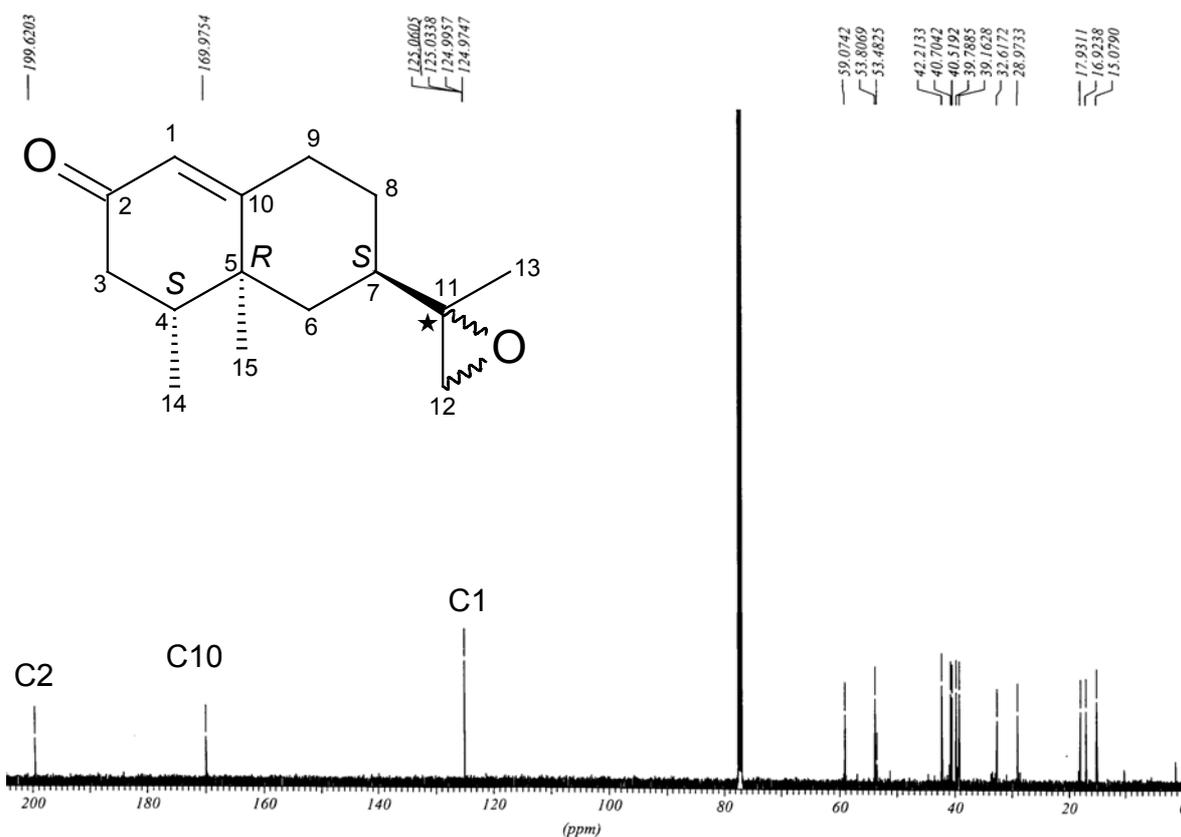
Abbildung 2-38: Massenspektrum (EI) von Verbindung **33** aus der Transformation von Valencen mit *C. globosum*.

Die Verbindungen hatten ein Absorptionsmaximum bei 239 nm (konjugiertes System, Messung HPLC-DAD, 2.3.8.2).

Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen von **33** lieferten die chemischen Verschiebungen eines Nootkaton-11,12-epoxids (**Tab. 2-9**). Die jeweiligen C-Atome wurden durch das Inkrementensystem (ChemDrawUltra) berechnet und mit den ermittelten Werten verglichen. Das breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR (**Abb. 2-39**) lieferte 15 C-Atome, wobei durch ein HMQC 4 C-Atome als quartär, 6 als tertiär/methyl und 5 als methylen-C-Atome identifiziert wurden. Das C-Atom 2 bildet das Keton mit einer typischen Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 199,6$, das Methylen-C-Atom hat eine für Methylengruppen typische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 125,1$. Wie in 2.3.4.1 beschrieben, lösten sich die Signale der ursprünglichen Doppelbindung zwischen den C-Atomen 11 und 12 zu Signalen im Tieffeld auf $\delta_{\text{C}} = 59,1$ und $53,5$; ebenso löste sich das ursprüngliche Signal im ^1H -NMR (**Abb. 2-40**) zu einem Duplett mit $\delta_{\text{H}} = 2,59$ und $2,65$. Die Signale des Methylenkohlenstoffs 1 blieben im Vergleich zum NMR-Spektrum des Valencens im Hochfeld. Die Stereochemie der Verbindung wurde durch die *cross*-Signale im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY festgelegt. Hier korrelierten die Protonen am C-Atom 4 (S-Konfiguration) mit den Protonen am stereochemisch nahen C13 (S-Konfiguration, NOE). Die Signale des ^1H -NMR stimmten mit denen in Chayen *et al.* (1987) überein.

Tabelle 2-9: Strukturdaten des Nootkaton-11,12-epoxids (**33**).

Position C-Atom	¹³ C-NMR δ (100 MHz, CDCl ₃)	¹³ C-NMR (berechnet)	¹ H-NMR δ (500 MHz, CDCl ₃)	Multiplizität, J, Integral	¹ H-NMR (ber.)
1	125,1	119,8	5,76	s, 1H	5,85
2	199,6	197,6	-	-	-
3	42,2	45,5	2,26 und 2,43	dd, 16 Hz, 2H	2,90
4	39,8	32,0	1,9-2,0	m, H	1,90
5	39,2	41,2	-	-	-
6	40,5	35,3	~1,2	m, 2H	1,21
7	40,7	42,2	1,86	m, 1H	1,78
8	29,0	28,1	~1,2	m, 2H	1,29
9	32,6	32,5	2,3-2,4	m, 2H	1,96
10	170,0	162,6	-	-	-
11	59,1	60,5	-	-	-
12	53,5	52,1	2,59 und 2,65	m, 2H	2,46
13	17,9	21,3	1,58	s, 3H	1,26
14	15,1	15,3	0,98	d, 10,5 Hz, 3H	1,06
15	16,9	19,7	1,07	s, 3H	1,26

**Abbildung 2-39:** ¹³C-NMR-Spektrum von **33**.

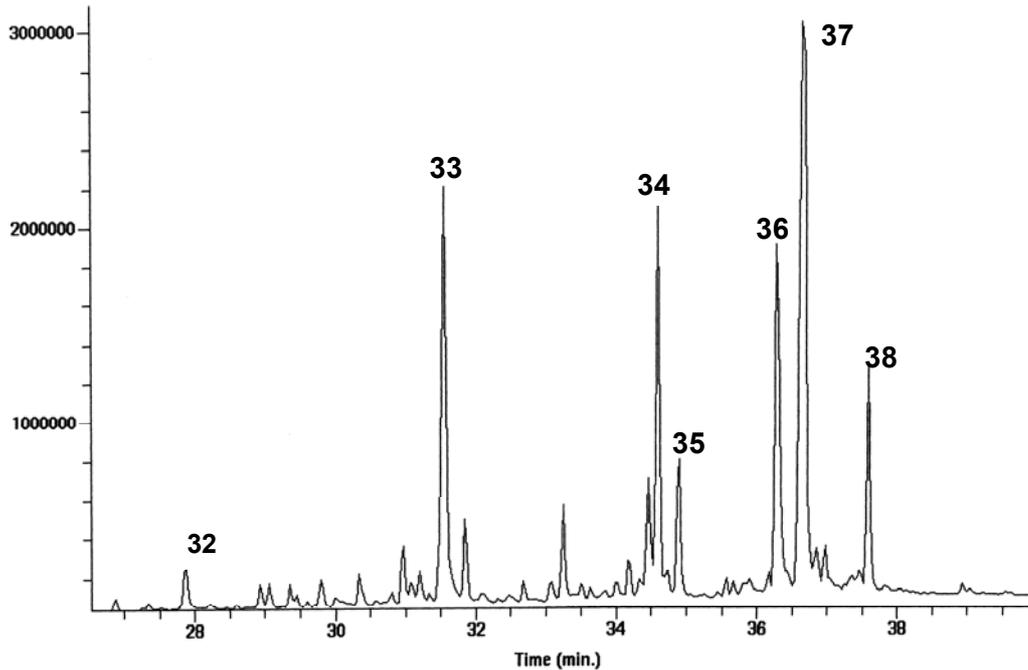
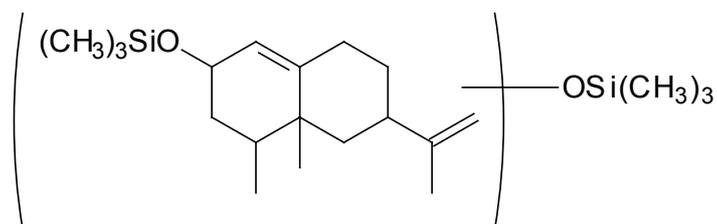


Abbildung 2-41: Gaschromatographische Trennung der mehrfach oxidierten Produkte auf DB5 nach Silylierung aus einem Extrakt der Valencentransformation mit *C. globosum*.

Valencendiole 1 (35) und 2 (36):

Für die Verbindungen **35** (KI 2121, CW 20M) und **36** (KI 2197, CW 20M) wurden molekulare Massen von m/z 380 (silyliert, CI/EI-Mischkammer, **Abb. 2-43** und **2-44**) für beide Moleküle bestimmt. Somit wurde die Molekülmasse des Valencens von m/z 204 um 176 erhöht. Dies entspricht zweier zusätzlicher Hydroxyfunktionen am Valencengrundgerüst, die silyliert vorliegen (+ 2 x 16 [O], + 2 x 72 [Si(CH₃)₃], - 2 x 1 [H]). Die im MS auftretenden Massen 73 ([CH₃)₃Si⁺ +H) und 75 ([CH₃)₂SiO⁺ +H) bestätigen den silylierten Zustand des Moleküls. Da keine weiteren einfach hydroxylierten Produkte des (+)-Valencens nachzuweisen waren, sind die Diole vom Nootkatol abzuleiten. Somit ist das C-Atom 2 hydroxyliert (**Abb. 2-42**).



35 + 36

Abbildung 2-42: Valencendiol 1 und 2 (**35** bzw. **36**), silyliert.

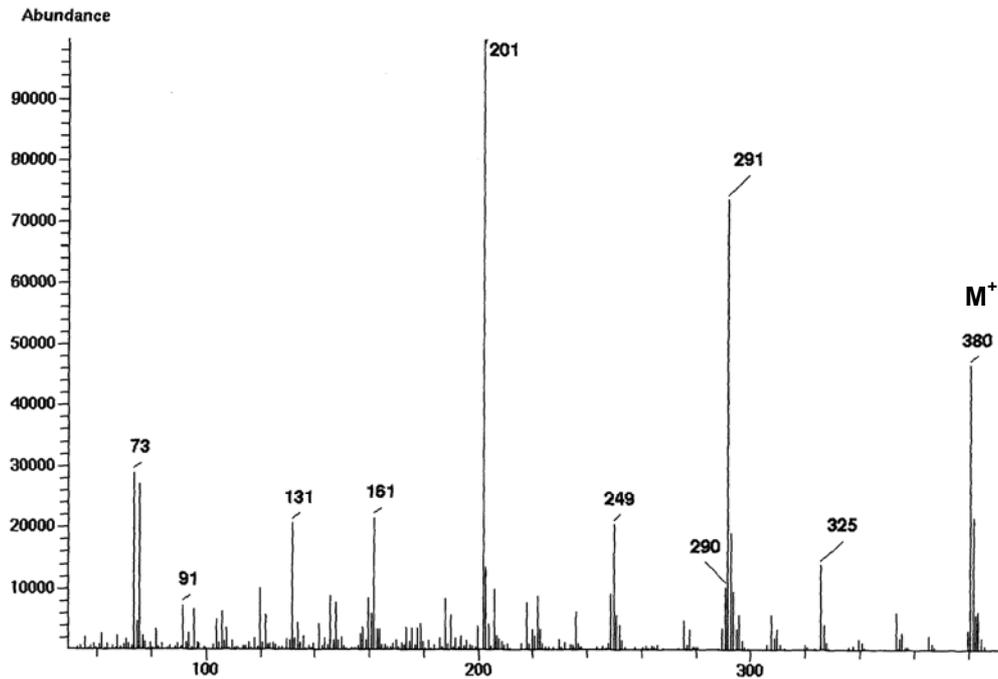


Abbildung 2-43: Massenspektrum des Valencendiol 1 (CI/EI-Mischkammer, 35).

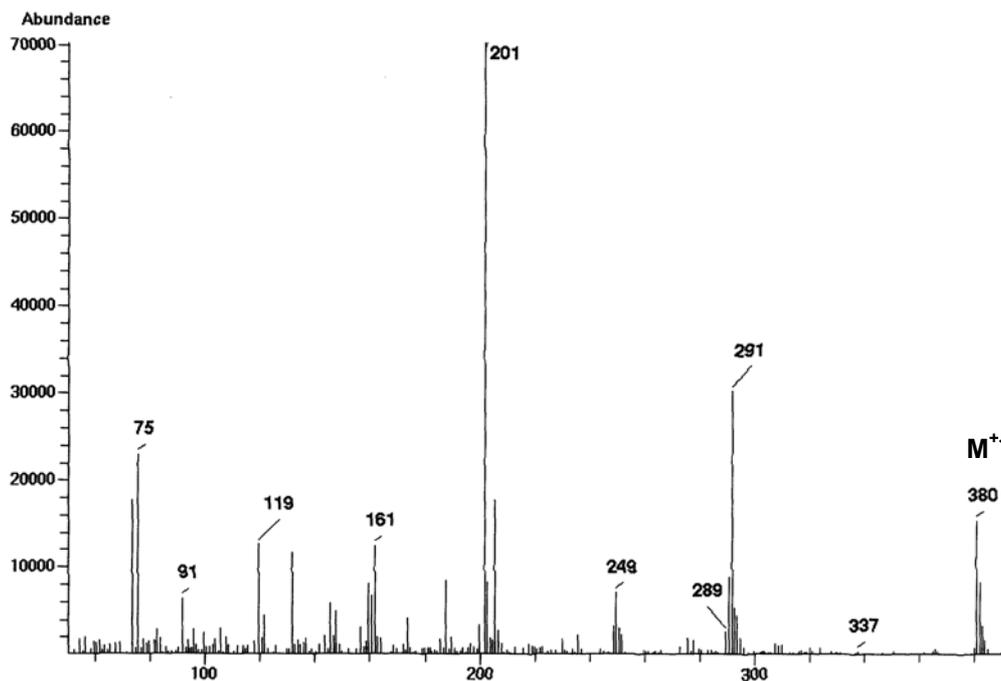


Abbildung 2-44: Massenspektrum des Valencendiol 2 (CI/EI-Mischkammer, 36).

Valencenketodiol/Hydroxyvalencensäure (37)

Das Produkt **37** mit dem KI 2290 trat nach 7 Transformationstagen in einer Konzentration von 0,7 mg L⁻¹ auf. Die Existenz der Verbindung wurde über die LC-MS/LC-UV-Spur (2.3.8.2) mit einer gemessenen Molekülmasse m/z 250 bestätigt. Hieraus ergab sich ein

mögliches Dihydroxy-oxo-valencen oder eine Hydroxyvalencensäure, wobei die Regiochemie nicht näher bestimmt wurde.

Valencetriol/Epoxyvalencendiol (38)

Das Produkt **38** mit dem KI 2343 trat nach 7 Transformationstagen in einer Konzentration von 2 mg L⁻¹ auf. Die Masse wurde auf m/z 396 im silylierten Zustand bestimmt, wobei die Molekülmasse nur aus dem Fragment m/z 381 durch Verlust eines Methylradikals erschlossen werden konnte. Aus der Molekülmasse ließe sich sowohl ein Triol wie auch ein Epoxydiol ableiten, wenn man davon ausgeht, dass eine Hydroxyfunktion aufgrund sterischer Hinderung nicht hydroxyliert werden konnte (wie z.B. am C-Atom 7). Die Existenz der Verbindung wurde mit der LC-MS-/LC-UV-Spur (2.3.8.2) durch die auftretende Masse m/z 252 bestätigt. Das Molekül hatte ein Absorptionsmaximum bei 239 nm (konjugiertes System).

2.3.5 Sensorische Bewertung der Transformationsmetaboliten

Zur sensorischen Bewertung wurden die Geruchseindrücke und absoluten Schwellenwerte der underivatisiert gaschromatographierbaren Verbindungen aus Extrakten der (+)-Valencen-Biotransformation mit *Chaetomium globosum* über GC-Olfaktorimetrie bestimmt (5.6; 5.9.2.4). Interessant waren hierbei neben den zum Teil schon bekannten sensorischen Eigenschaften die niedrigen Geruchsschwellen des Valencen-11,12-epoxid. Sesquiterpenoide mit mehr als einem Sauerstoffatom im Molekül waren aufgrund ihrer Schwerflüchtigkeit nicht erfassbar (**Tab. 2-10**).

Tabelle 2-10: Geruchsqualität und Geruchsschwelle der Valencenoxidationsprodukte (GC-O).

Substanz	KI (CW 20M)	Geruchsqualität	Geruchsschwelle (ng / Geruchsreiz)
Valencen-11,12-epoxid (30)	2081	citrus, herb (Tamarine)	< 5 ng
β -Nootkatol (31b)	2394	leicht süß	~ 50 ng
α -Nootkatol (31a)	2426	Grapefruit, säuerlich	~ 50 ng
Nootkaton (32)	2471	Grapefruit	< 1 ng
Epoxy-/Hydroxynootkatone (Koelution 33 und 34)	> 2800	-	-

Teilzusammenfassung für 2.3.4 und 2.3.5:

- (+)-Valencen wurde zu Valencen-11,12-epoxid und Nootkatol oxidiert, das weiter zu Nootkaton dehydriert wurde. Hieraus wurden mehrfach oxidierte Metaboliten wie Epoxynootkaton, Hydroxyoxovalencen, Valencendiole, Valencenketodiole und Valencentricole gebildet.
- Für die flüchtigen, sensorisch wahrnehmbaren Verbindungen Valencen-11,12-epoxid, Nootkatol und Nootkaton wurden außerordentlich geringe Geruchsschwellenwerte von unter 100 ng gemessen, wobei der Geruchseindruck vorwiegend Grapefruit-Charakter hatte.

2.3.6 Verteilung von Substrat und Produkten in Medium und Mycel

Die Verteilung des Substrats (+)-Valencen und dessen Oxidationsprodukte in Mycel und Medium während des Transformationsversuches von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* wurde zur Bestimmung der Freisetzung der Terpene untersucht. Insbesondere sollte ein Vergleich mit Monoterpentransformationen (Onken, 1999) durchgeführt werden. Es erfolgte die Untersuchung des extrazellulären Mediums, einer cytosolischen und einer Zellwand/Membran-Fraktion. Die Gewinnung der *extrazellulären* Fraktion erfolgte nach vier Tagen Transformationszeit (Kulturalter 7 Tage, Valencendosierung 2,25 mM) durch Zentrifugation, zweimaliges Waschen des Mycels und anschließender Extraktion der vereinten wässrigen Phasen (5.5.3.4). Danach wurde die verbliebene Zellmasse (20,3 g Biofeuchtmasse) mit der Rührwerkskugelmühle unter Zusatz von 1 mg Natriumazid zur Inaktivierung enzymatischer Aktivitäten aufgeschlossen. Eine anschließende Zentrifugation bei 12.000 g lieferte die überstehende, *cytosolische* Fraktion sowie das verbleibende Pellet als *Zellwand/Membranfraktion* (Zellfragmente). Die Verteilung von Substrat und Produkten nach vier Tagen Transformationszeit zeigt **Abb. 2-45**, wobei die Angaben auf 1 L Kulturvolumen hochgerechnet wurden.

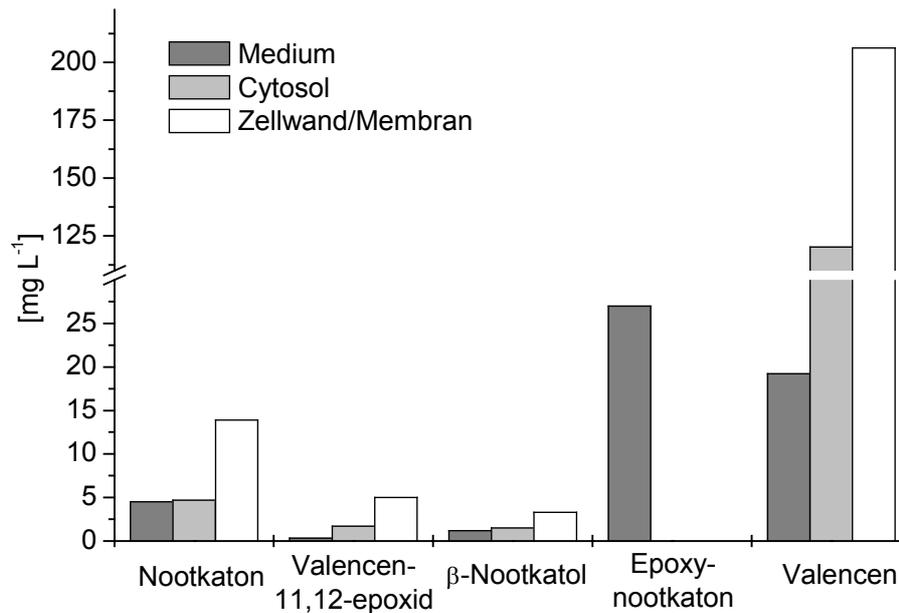


Abbildung 2-45: Verteilung von Valencen und dessen Biogeneseprodukten in den genannten Fraktionen nach Zellaufschluss von *C. globosum* (Valencendosierung in Transformation 2,25 mM).

Das Substrat (+)-Valencen akkumulierte als lipophiles Substrat (3.4.3.1) zu mehr als 94% im Mycel (59,7% in Zellwand- und Membranfraktion, 34,8% im Cytosol), wohingegen nur 5,4% im wässrigen Medium gefunden wurden (Zugabe absolut 460 $\mu\text{L L}^{-1}$; 2,25 mM, Bilanzlücke Valencen ca. 25%). Es wurde ein Gehalt bestimmt, der höher als die Valencenlöslichkeit in Wasser (0,5 mg L^{-1}) ist. Dies lag in der inhomogenen Verteilung des Substrates im Medium begründet („Tröpfchenbildung“). Mehr als 80% des Nootkatons akkumulierten ebenfalls im Mycel, während nur 19,5% in das Medium abgegeben wurden. Höher oxidierte Produkte wie das Epoxynootkaton wurden aufgrund ihrer verbesserten Wasserlöslichkeit (130 mg L^{-1} im Gegensatz zu 43,8 mg L^{-1}) ausschließlich im Medium gefunden (obwohl der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von $\log P_{O/W}$ 2,78 dies nicht zwingend ergibt; siehe auch 3.4.3.1). Die absolute Nootkatonmenge wurde nach Zellaufschluss auf ca. 20 mg L^{-1} bestimmt.

Zur Veranschaulichung der Akkumulation des (+)-Valencen wurde das Mycel mikroskopisch untersucht (**Abb. 2-46** und **2-47**), wobei das Valencen als Tröpfchen in den Mycelpellets deutlich zu erkennen war. Das lipophile Mycel absorbierte den überwiegenden Teil des Precursors.

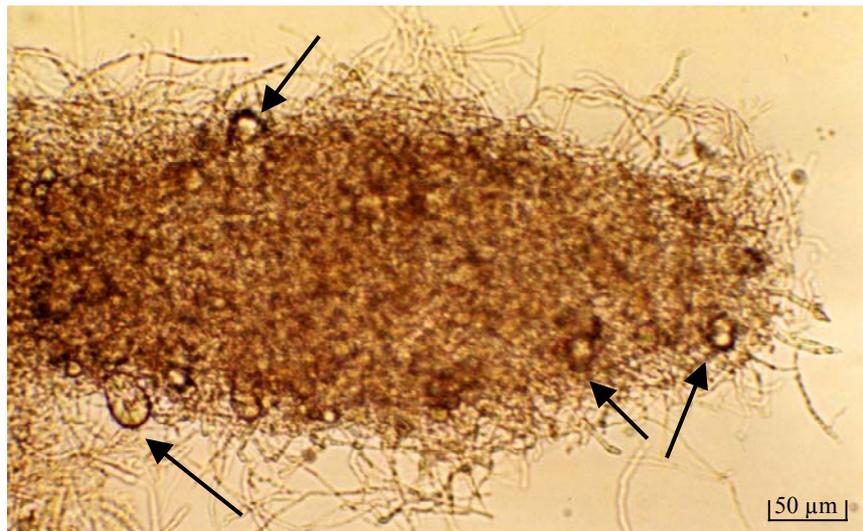


Abbildung 2-46: Lichtmikroskopische Aufnahme des Mycels von *Chaetomium globosum* am 7. Tag der Valencentransformation mit eingelagerten Valencentröpfchen (Pfeile, Vergrößerung 1:200).

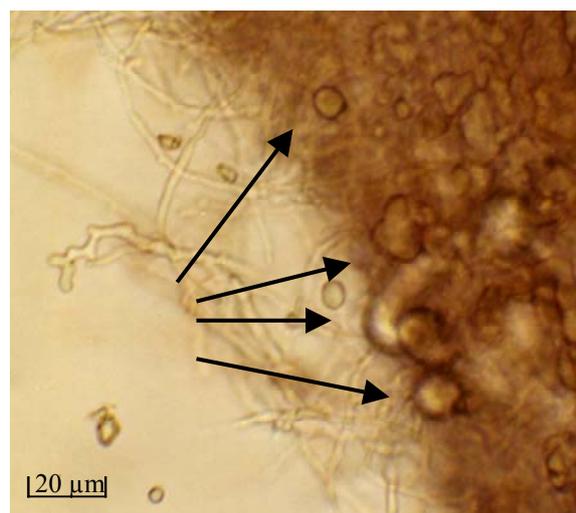


Abbildung 2-47: siehe **Abb. 2-46**, Vergrößerung 1:500.

2.3.7 Transformation im Rührkesselreaktor

Die im Schüttelkolben erfolgreiche Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton mit *C. globosum* wurde zum *Scale-up* in einen 2 L-Rührkesselreaktor (*stirred tank reactor*, STR) übertragen (5.1.6; 5.2.2.9). Eine Begasung über einen Membranschlauch, der auf einer Spule zentral in den Reaktor eingebracht wurde (5.1.6), gestaltete sich als schwierig, da der Ascomycet stark zur Adhäsion an der Membran tendierte und aufgrund ungenügender Substrat/Produktverteilung (2.3.6) keine repräsentative Produktgewinnung gelang.

Um den Austrag von Edukt und Produkten aus dem Reaktor zu bestimmen, wurde die Abluft über eine Lewatit-Adsorption-Säule geleitet. Diese wurde anschließend nach 5.5.1.4 aufgearbeitet.

Für eine optimale Sauerstoffzufuhr musste neben der Berücksichtigung der Sauerstoffzehrung der Austrag des (+)-Valencen aus dem Medium quantifiziert werden. Für eine ausreichende Valencenverfügbarkeit im Medium und einen geringen Austrag wurde deshalb eine niedrige Belüftungsrate gewählt. Vorversuche einer Inkubation mit (+)-Valencen dotiertem Medium zeigten, dass der Precursor Valencen innerhalb von 1 h bei einer Dosierung von 75,5 mg (gewählte Belüftung 0,9 vvm, 200 rpm) zu 18% aus dem Medium durch Kulturbelüftung ausgetragen wurde. Die Wiederfindung des Nootkaton im Kulturmedium betrug dagegen nahezu 100%, es fand also nur ein marginaler Austrag statt. Durch eine exponentielle Approximation ($c_t = c_c \cdot 0,823^t$) verblieb deshalb nach 24 h nur ca. 1% des zudosierten Terpens im Medium.

Um den Verbleib des Valencens im Kulturmedium zu erhöhen, wurde die Belüftung während der Transformation auf 0,08 vvm gesenkt. Die Dosierung des (+)-Valencens betrug zum Transformationsstart 400 μL (0,36 mmol L^{-1} Kulturmedium) und wurde am 2., 3., 4. und 5. Kultivierungstag wiederholt (insgesamt somit 1,44 mmol L^{-1}). Es erfolgte eine tägliche Probenahme gemäß 5.5.1.3.

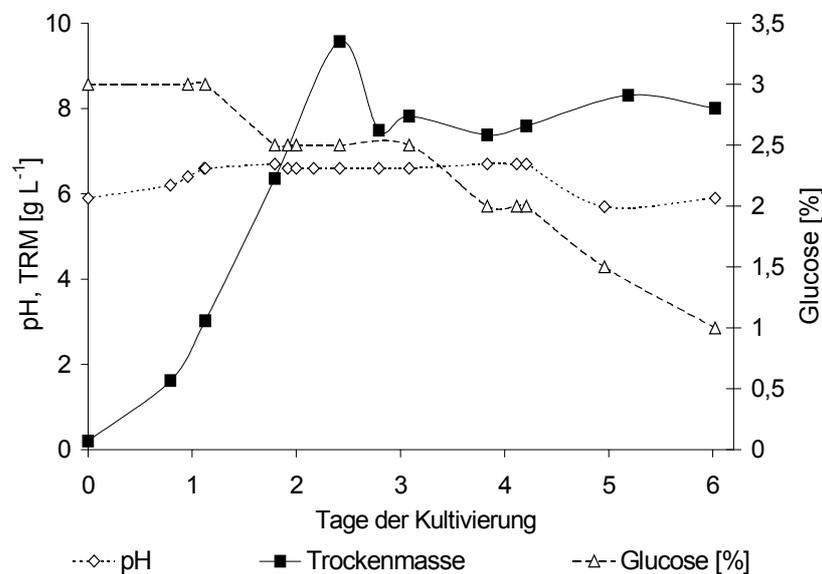


Abbildung 2-48: Kultivierungsparameter von *C. globosum* während der Transformation von (+)-Valencen im Bioreaktor (Valencendosierung erfolgte ab dem 2. Kulturtag gestuft bis auf eine Konzentration von 1,44 mM).

Wie aus **Abb. 2-48** ersichtlich, kam es zum Zeitpunkt der Terpenzugabe erst zu einem leichten Rückgang und dann zu einer Stagnation der Biomassebildung, jedoch fand weiterhin eine leichte Glucosezehrung statt. Optisch ging diese Beobachtung mit einer leicht milchigen Trübung des Mediums einher, die eine *submerse Sporulation* darstellte (**Abb. 2-49**). Die Sporen (Konidien) waren elliptisch und dickwandig, aus denen sich z.T. wieder neue Hyphen bildeten (nicht als Kontamination zu deuten). Die Pellets der Submerskultur zerfielen mit zunehmender Kultivierungszeit und führten zu einem Trübungseffekt des Mediums (**Abb. 2-50**).

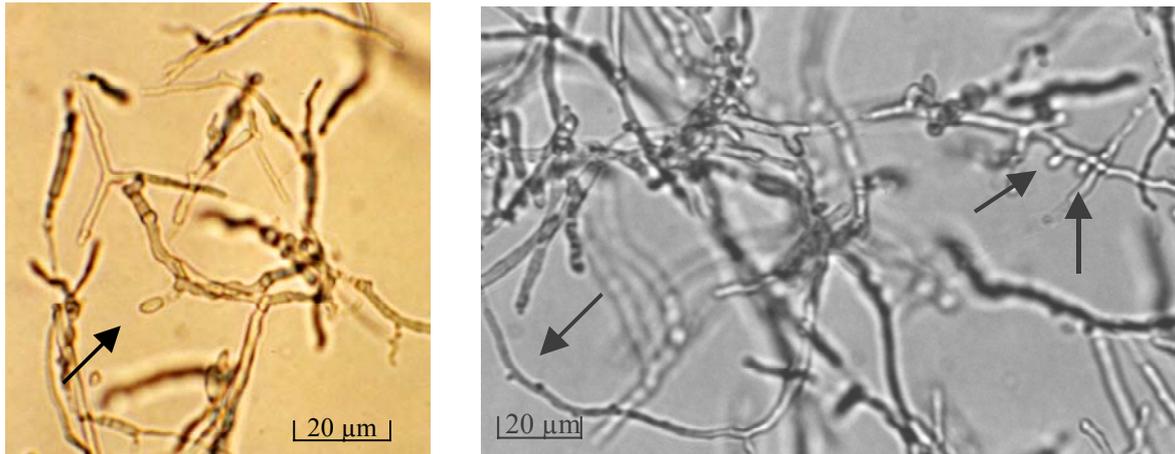


Abbildung 2-49 A und B: Ansätze von submerse Konidiosporenbildung und verdickter Mycelwand in Submerskulturen von *C. globosum* (Medium des Bioreaktors, 1:500).



Abbildung 2-50: Vereinzelt Mycel von *C. globosum* im Medium der Bioreaktorkultivierung („Trübungseffekt“, 1:200).

Die Biotransformation von (+)-Valencen erbrachte eine maximale Nootkatonkonzentration im mg-Bereich und war im Vergleich zur Schüttelkolbenkultivierung langsamer; es fand eine weitergehende Oxidation des Nootkatons zu mehrfach oxidierten Verbindungen wie

Epoxynootkaton statt, die am vierten Kultivierungstag ein Maximum erreichte (**Abb. 2-51**). Aus der zudosierten Precursormenge berechnete sich zum Transformationsmaximum am 5. Tag ein Umsatz von 0,65 mol% (7,2 mg Nootkaton pro 5 L Kulturvolumen; 1,44 mg L⁻¹).

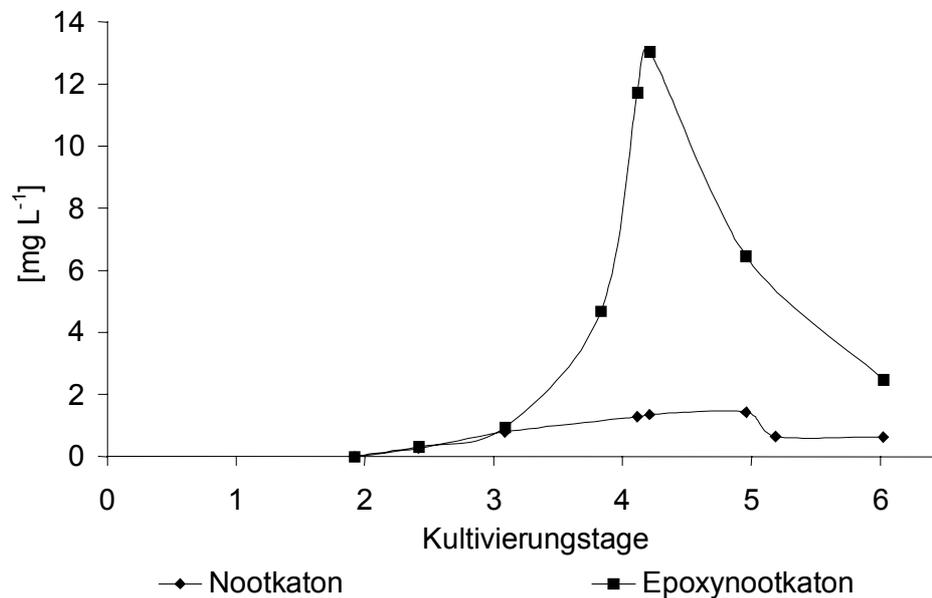


Abbildung 2-51: Nootkatonbiogenese und Weiteroxidation zum Hydroxynootkaton bei der Valencentransformation mit *C. globosum* im Bioreaktor (2 L SNLH-Medium, 24 °C, 250 rpm, 0,08 vvm).

Teilzusammenfassung für 2.3.6 und 2.3.7:

- Der Precursor (+)-Valencen wie auch seine Oxidationsprodukte reichert sich aufgrund ihrer Lipophilie zu mehr als 95% in zellulären Kompartimenten an. Eine Ausnahme bildeten mehrfach oxidierte Produkte, die zum überwiegenden Teil im Medium zu finden waren.
- Die Biotransformation von (+)-Valencen im Bioreaktor führte zu sehr geringen Nootkatonausbeuten von nur 1,4 mg L⁻¹, wobei mehrfach oxidierte Metaboliten verstärkt entstanden. Es fand eine submerse Sporulation statt. Valencen wurde zu einem erheblichen Teil mit der Abluft aus dem Reaktor ausgetragen, während Nootkaton im Reaktor verblieb.

2.3.8 Charakterisierung der Nootkatongenese

Um die Transformation von (+)-Valencen charakterisieren zu können, wurden bestimmte Intermediate untersucht und Repressor- und Induktorstudien durchgeführt. Zur physiologischen Untersuchung der Enzymkatalyse können Metabolitenstudien oder ein molekularbiologischer Ansatz zum Erfolg führen. Da die molekularbiologische Charakterisierung nicht Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, wurde die stereochemische Genese des Intermediates Nootkatol und die Bildung eines Valencen-2-hydroperoxid (3.3.1.2) gesondert untersucht, um den Reaktionsverlauf postulieren zu können. Geeignete Induktor- und Repressorstudien unterstützten dabei die Untersuchungen bezüglich der Enzymkatalyse.

2.3.8.1 Stereochemie der Nootkatolbildung

Zur Untersuchung der Nootkatole, die bei der Transformation von (+)-Valencen zu Nootkaton auftraten, wurden die jeweiligen Extrakte der enzymatischen Transformation mit Laccasen aus *Trametes spec.* (2.3.8.2) und *Chaetomium globosum* mittels GC-MS untersucht und mit synthetischen Standards verglichen (2.3.4.2). Die Transformation mit *C. globosum* lieferte, wie schon beschrieben, neben Nootkaton ausschließlich das als Intermediat auftretende β -Nootkatol (78% ee; **Abb. 2-52**).

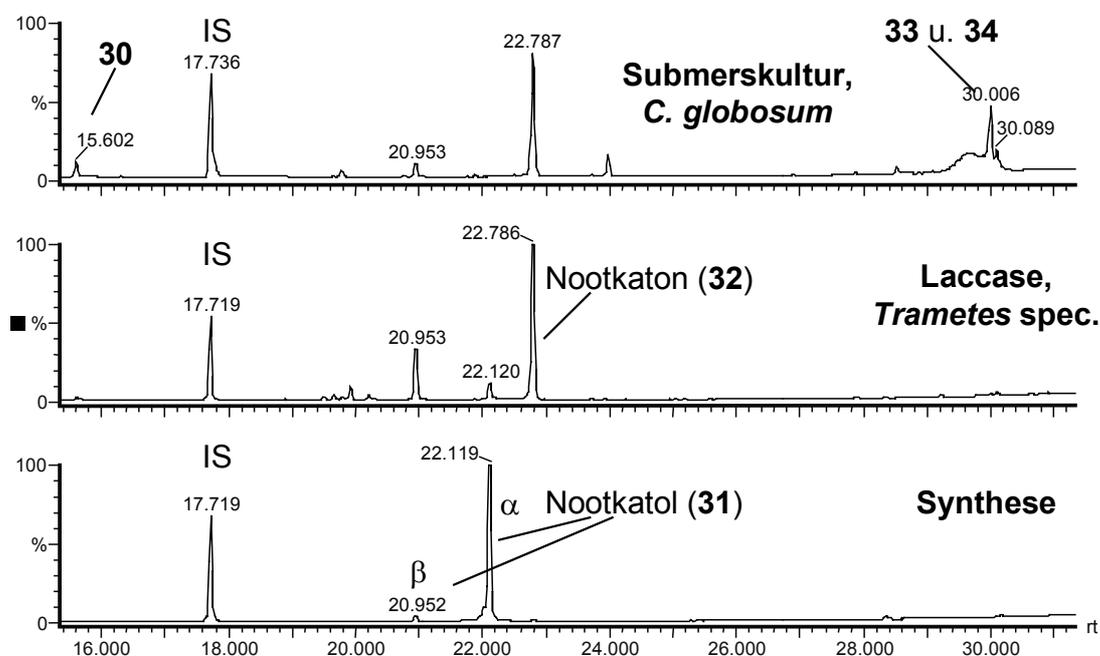


Abbildung 2-52 Vergleich der Gaschromatogramme von Extrakten aus Valencentransformationen (2,25 mM Dosierung) und chemischer Synthese von Nootkatol.

α -Nootkatol wurde nur in Spuren nachgewiesen ($< 0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Weitere wichtige Metabolite wie Valencen-11,12-epoxid und Hydroxynootkaton entstanden bei der Transformation mit *C. globosum*, während bei einer Laccase-katalysierten Transformation dagegen nur α - und β - Nootkatol (2.3.8.2; Verhältnis ca. 3:1; β -Nootkatol ee 53,5%) und Nootkaton nachgewiesen wurde. Weitere, vom Nootkaton abzuleitende Produkte traten nicht auf. Die Autoxidation von Valencen führte zu einer racemischen Bildung des Nootkatols (**Abb. 2-28**).

2.3.8.2 Laccase katalysierte Transformation von (+)-Valencen zum Nachweis des Valencen-2-hydroperoxids

Ziel des Versuches war die Nootkatonherstellung über die enzymatische Transformation von (+)-Valencen mit einem Laccasepräparat aus *Trametes spec.* Hierbei stand insbesondere die Identifizierung eines Valencen-2-hydroperoxids im Vordergrund (2.3.8.3), das bei einer Transformation mit Laccasen als Intermediat auftritt (Huang *et al.*, 2001). Es wurde (+)-Valencen in Citratpuffer mit Zusatz des Emulgators Tween 80 mit Laccase umgesetzt (5.3.3). ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure] Diammioniumsalz) wurde verwendet, um den Einfluss von Radikalinitiatoren zu testen.

Laccase katalysierte die Umsetzung von (+)-Valencen zu Nootkaton mit Umsätzen von maximal 0,3 mol% nach 44,5 h (**Tab. 2-11**). Eine Degradation des Hydroperoxids kann durch Erwärmung auf 50 °C erfolgen, um die Menge an Nootkaton zu erhöhen. Da die analytische Erfassung des Hydroperoxids ein Ziel des Versuches war, wurde dieser Schritt nicht durchgeführt. Die Intermediate α - und β -Nootkatol traten im Verhältnis 1:2 auf.

Tabelle 2-11: Nootkatol- und Nootkatonbildung aus Valencen katalysiert mit Laccasen aus *Trametes spec* (30,1 mM Valencendosierung; Transformationszeit 44,5 h).

	β -Nootkatol	α -Nootkatol	Nootkaton	Umsatz nach 44,5 h
	[mg L ⁻¹]			[mol%]
Laccase + ABTS	27,6	16,6	40,0	0,203
Laccase	43,5	30,4	65,4	0,332
ABTS	5,5	4,2	11,4	0,058
Kontrolle	3,3	2,4	6,9	0,035

Der Nachweis des für eine Laccase-Katalyse relevanten Valencen-2-hydroperoxids sollte mittels LC-MS durchgeführt werden können (3.3.1.2; Huang, 2002). Die Trennung erfolgte an einer RP-18-Phase mit einem Methanol-Wasser-Gradienten (5.9.3.2). Für die Molekülmassenbestimmung wurde die MS im APcl-positiv Modus verwendet, wobei die

Molekülmassen insbesondere nach erfolgter Protonierung als $[M^++1]$ erkannt wurden. Charakteristisch traten ebenfalls Methanol-Addukte $[M^++1+32]$ durch den verwendeten Eluenten Methanol auf (**Abb. 7-3**).

Das Valencen-2-hydroperoxid wurde mit der vorliegenden Methodik (Huang *et al.*, 2002) im Extrakt der Valencentransformation mit *Chaetomium globosum* nicht nachgewiesen. Hiernach sollte die Elution des Peroxids zwischen Nootkaton und (+)-Valencen erfolgen. Es wurde jedoch ein Molekül mit der Masse m/z 237 und dem nur schwach vorhandenen Methanol-Addukt m/z 269 detektiert, dessen Spektrum sich aufgrund chromatographisch unvollständiger Trennung mit dem Hydroxyketon m/z 235 $[M^++1]$ überlagerte (**Abb. 2-53**, Spektrum siehe Anhang **Abb. 7-3**). Aufgrund des aufgetretenen Elutionsverhaltens handelte es sich hier womöglich um das gaschromatographisch schon identifizierte Diol. Zusätzlich wurden die Massen für mehrfach oxidierte Valencenmetaboliten wie z.B. m/z 251 für Ketodiole (**37**), m/z 253 für Trioie (**38**) und m/z 235 für Hydroxyketone (**33** und **34**) nachgewiesen.

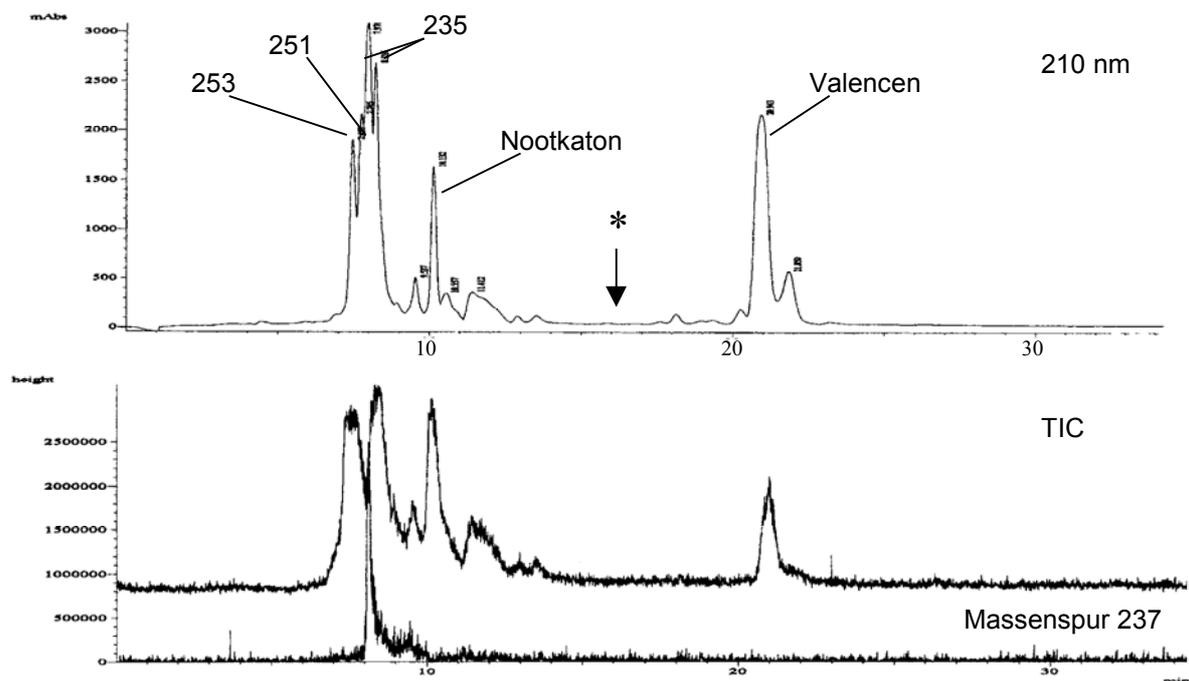


Abbildung 2-53: LC-Chromatogramm des Extraktes aus Valencentransformation mit *C. globosum* am vierten Kultivierungstag (UV 210 nm und TIC mit Massenspur 237), * Elutionszeit des Valencen-2-hydroperoxids nach Huang (2001).

2.3.8.3 Induktor-/Repressorstudien

Zur Untersuchung der Katalyse wurden folgende Induktor- und Repressorstudien durchgeführt:

Die Induktion des katalytischen Oxidationszyklus einer möglichen Cytochrom-P450-Monooxygenase ist durch einen Zusatz von Fe(III) möglich, das, zellulär aufgenommen, die Metabolisierung von (+)-Valencen erleichtert. Repressiv auf Cytochrom-P450-Monooxygenasen wirkt Proadifen (auch: SKF-525A; Lewis, 1996). Die von Peroxidasen katalysierte Nootkatonbiogenese kann durch einen Singulett-Sauerstoff-Radikalfänger DABCO (Diazabicyclo[2.2.2]octan) zu 95% gehemmt werden (Willershausen, 1996). Der generierte aktive Sauerstoff wird abgefangen, wodurch die Katalyse indirekt inhibiert wird.

Zur Untersuchung des jeweiligen Induktors bzw. Repressors erfolgte ein Zusatz der jeweiligen Substanz (Fe[III] 0,3 mM als Eisen[III]chlorid; Proadifen 0,1 mM; DABCO 0,1 mM) zur Kultivierung vor der Valencenzugabe.

Die Induktion durch den Zusatz von Fe(III) wie auch ein Zusatz des $^1\text{O}_2$ -Radikalfängers DABCO (0,1 mM) zur Hemmung der peroxidativen Bildung von Nootkaton veränderte die Nootkatonbiogenese nicht.

Die Kultivierung mit Zusatz des Cytochrom-P-450-Monooxygenase-Inhibitors zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Nootkatongenese (~65% Restaktivität bezüglich der Kultivierung ohne Inhibitor, **Abb. 2-54**). Ebenfalls wurden die höher oxidierten Produkte wie z.B. Epoxy-/Hydroxyketone mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 24 h vermindert gebildet. Eine Hemmung der Weiteroxidation von Nootkaton auf 25% Restaktivität fand statt. Die zelluläre Verfügbarkeit des Inhibitors Proadifen im Transformationsversuch war offensichtlich gegeben, da keine toxischen Effekte wie Wachstumshemmung durch den Inhibitor eintraten.

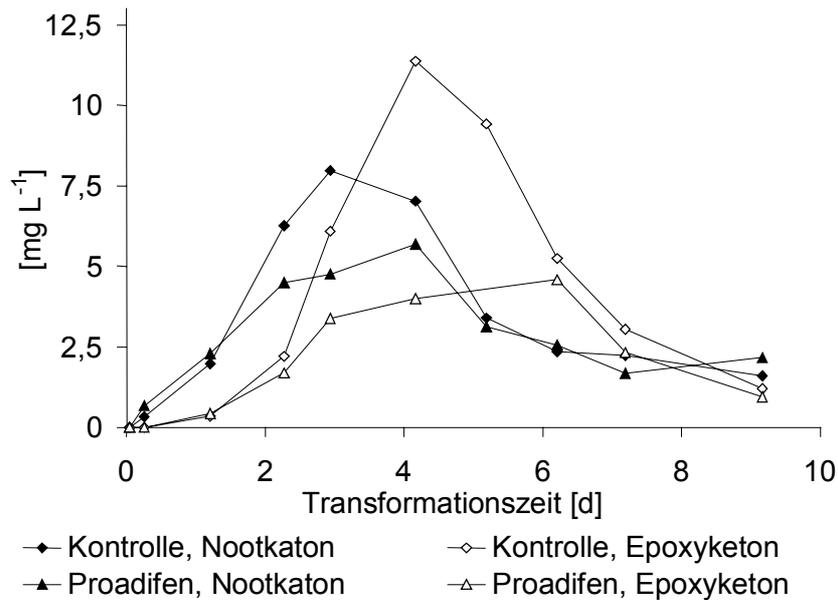


Abbildung 2-54: Valencentransformation mit *C. globosum* unter Zugabe eines Cytochrom-P450-Monooxygenase Inhibitors Proadifen (0,1 mM; Valencendosierung 2,25 mM).

Teilzusammenfassung für 2.3.8:

- Untersuchungen der gebildeten Intermediate zeigten, dass der Reaktionsweg der Oxidation von (+)-Valencen zu Nootkaton mit *Chaetomium globosum* fast ausschließlich über das β -Nootkatol erfolgte, wohingegen die Laccase katalysierte Nootkatongenese über beide Nootkatole stattfand. Ein Valencen-2-hydroperoxid war nicht nachzuweisen. Eine Umsetzung von (+)-Valencen mit einer Laccase aus *Trametes spec.* führte zu einer Nootkatonbildung von bis zu 70 mg L⁻¹.
- Die Zugabe von Monooxygenase-Inhibitoren führte zu einer verringerten Bildung von Nootkaton. Eine eventuell vorhandene Katalyse über Singulett-Sauerstoff, der bei einer Peroxidase Katalyse entsteht (3.2.4), wurde durch den Zusatz eines Singulett-Sauerstoff-Radikalfängers nicht gehemmt. Ebenfalls wurde die Transformation mit *C. globosum* nicht durch Supplementierung mit Fe(III) induziert.

2.3.9. Optimierung der Valencenbiotransformation

Die nachfolgenden experimentellen Untersuchungen dienten der Optimierung der Transformation von (+)-Valencen zu Nootkaton mit *Chaetomium globosum*. Folgende Parameter wurden untersucht:

- Verfügbarkeit von C-Quellen und Sauerstoff (Begasung)
- die Verfügbarkeit des Substrates (direkte Zugabe, emulgierte Form, Dampfraumzugabe)
- Erhöhung der Substratmenge
- Erhöhung der Biomasse durch Konzentrierung der Kulturen
- Substratadaptation
- Substratverteilung und Kultivierung in Zwei-Phasen-Systemen.

2.3.9.1 Transformation mit verminderter Glucoseversorgung

Terpene können parallel zur Glucosezehrung co-metabolisiert oder auch direkt als C-Quelle mineralisiert werden (Onken, 1998; van der Werf, 1997). Um die Abhängigkeit der Transformation von der leicht verfügbaren C-Quelle Glucose ermitteln zu können, wurde diese erheblich vermindert. Hierzu wurde der Glucosegehalt zum Zeitpunkt der Inokulierung von 30 g L^{-1} auf 5 g L^{-1} verringert. Dies hatte zur Folge, dass zum Zeitpunkt der Terpenzugabe (nach drei Tagen) die Glucose bis auf $2,5 \text{ g L}^{-1}$ verbraucht war, während der Gehalt in der Kontrollkultur noch 15 g L^{-1} betrug. Am dritten Transformationstag nach Valencenzugabe war die Glucose in der glucosereduzierten Kultivierung verbraucht.

Die Transformation in glucosereduziertem Medium zeigte im Vergleich zur Kontrollkultivierung bis zum zweiten Kulturtag eine leicht erhöhte Kinetik der Nootkatonbildung und etwa eine Verdoppelung der Konzentration (**Abb. 2-55**). Nach kurzfristiger Abnahme der Nootkatonkonzentration wurde ein Wiederanstieg der Nootkatonbildung auf 15 mg L^{-1} und Epoxynootkaton auf 25 mg L^{-1} am fünften Tag erreicht. Die Glucose war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen. Der Nootkatonabbau gegen Ende der Kultivierung war im glucosereduzierten Medium weniger stark ausgeprägt.

Da ein Kulturwachstum ab der Valencenzugabe in beiden Ansätzen nicht mehr stattfand, wurde auch im glucosereichen Medium Glucose nur gering verbraucht, so dass ein Restgehalt von 10 g L^{-1} in der Kontrollkultur verblieb. Der pH-Wert stieg in der glucosereduzierten Kultivierung an (von pH 7 bis 8,5), während er im Kontrollversuch nahezu konstant blieb (pH 7,5).

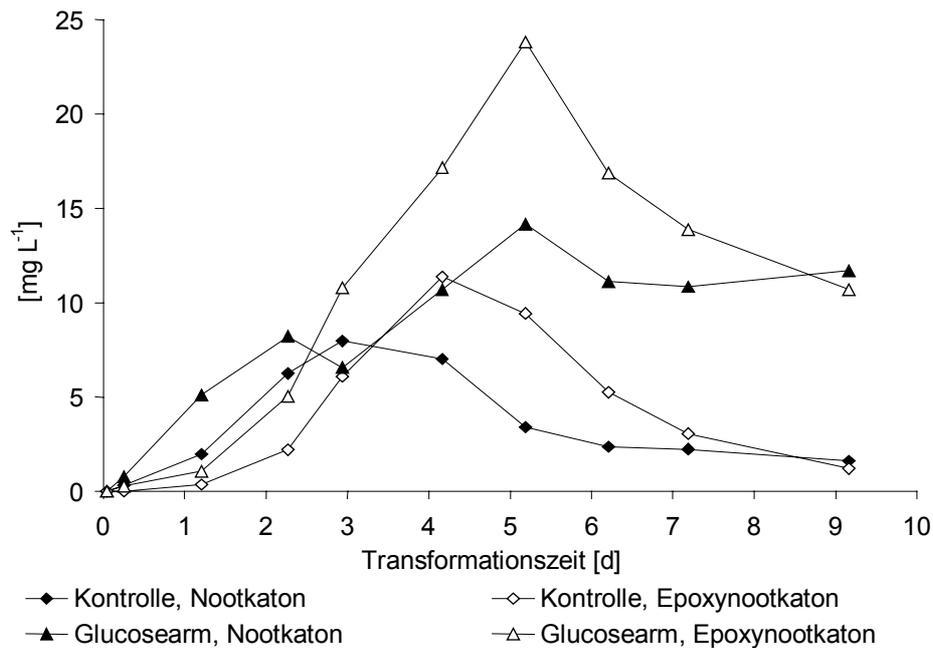


Abbildung 2-55: Kinetik der Produktbildung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei der Valencentransformation mit *C. globosum* in Schüttelkolbenkultur (Dosierung 3 mM, glucosearme Kultivierung 0,5% Glucosegehalt zu Beginn der Kultivierung, Kontrolle 3%).

Das beobachtete zweite Maximum in der Nootkatonbildung ist offensichtlich auf die Glucoseverarmung des Kulturmediums zurückzuführen, da ein Wiederanstieg der Nootkatongenese simultan zum Zeitpunkt des vollständigen Glucoseverbrauchs stattfand.

2.3.9.2. Verfügbarkeit von Sauerstoff

Eine Korrelation von Sauerstoffbedarf und Transformationsrate für die Biotransformation von (+)-Valencen konnte nicht mit einer herkömmlichen Sauerstoff-Elektrode (Clark-Prinzip) gemessen werden. Die Diffusion des im Medium vorliegenden Terpens in die Elektrodenmembran erhöhte die Ansprechzeit der Elektrode, was bis zur Bildung einer Diffusionsbarriere und somit zu keinen verwertbaren Messergebnissen führte (Schäfer *et al.*, 2003).

Zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffzufuhr bot sich die Variation der Verhältnisse Oberfläche der Submerskultur zu Kulturvolumen (Mediumvolumen) an, wodurch unterschiedliche Sauerstoffeinträge feststellbar waren. Für die Experimentalkulturen wurden die Oberfläche/Volumen-Verhältnisse durch Kulturkolben mit unterschiedlichen Größen und Füllvolumen eingestellt (5.2.3.5). Es wurden die Transformationsprodukte 96 h nach Zugabe von 2,25 mM Valencen gemessen und in Korrelation zum Verhältnis Oberfläche zu Volumen ($A \cdot V^{-1}$) des Kulturmediums gesetzt. Obwohl die Nootkatongehalte aufgrund niedriger Biomassen deutlich unter den schon beschriebenen Transformationsergebnissen von

8 mg L⁻¹ (2.3.3) lagen, zeigte sich nach anfänglicher Stagnation des Nootkatongehaltes ein Anstieg durch Zunahme des Verhältnisses $A \cdot V^{-1}$ (**Abb. 2-56**). Dieser Zusammenhang spiegelte sich ebenfalls in der Korrelation des Verhältnisses $A \cdot V^{-1}$ zur Produktausbeute pro Trockenmasse (TRM) wieder.

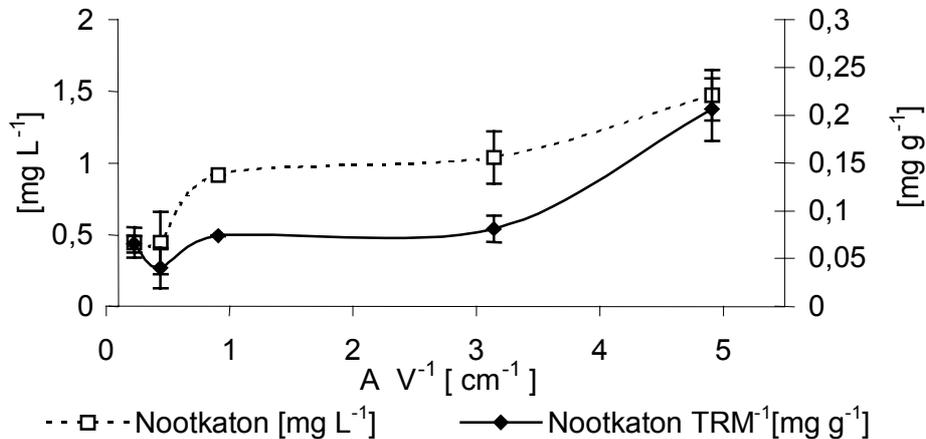


Abbildung 2-56: Korrelation des Quotienten aus Kulturoberfläche und Füllvolumen $A \cdot V^{-1}$ zum Nootkatongehalt und Produktausbeute pro Trockenmasse nach 96 h Transformationszeit (*C. globosum*, Schüttelkolbenkultivierung, 2,25 mM Valencendosierung).

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Sauerstoffzufuhr auf die Transformationsreaktion zu testen, bot sich durch eine Begasung der Submerskultur mit reinem Sauerstoff an. Hierzu wurde der Kopfraum einer 200 mL-Submerskultur (500 mL-Kolben) mit Sauerstoff angereichert (Zufuhr unter gasdichten Bedingungen jeweils 300 mL vor Substratzugabe; siehe 5.2.3.5). Es kam hierdurch zu einem erhöhten Sauerstoffeintrag in das Medium. Für einen Kontrollversuch wurde zum einen die Sauerstoffanreicherung durch eine Stickstoffzufuhr gleicher Menge ersetzt, zum anderen eine Kultivierung ohne Anreicherung durchgeführt. Gemessen wurde die gebildete Nootkatonmenge nach einer Transformationszeit von 96 h. Wie aus **Abb. 2-57** ersichtlich, veränderte die Sauerstoffzufuhr die gebildete Nootkatonmenge trotz erhöhten Sauerstoffeintrages bei vergleichbaren Biomassen nicht (vgl. Ansatz „Sauerstoff“ zu „Kontrolle“ in **Abb. 2-57**).

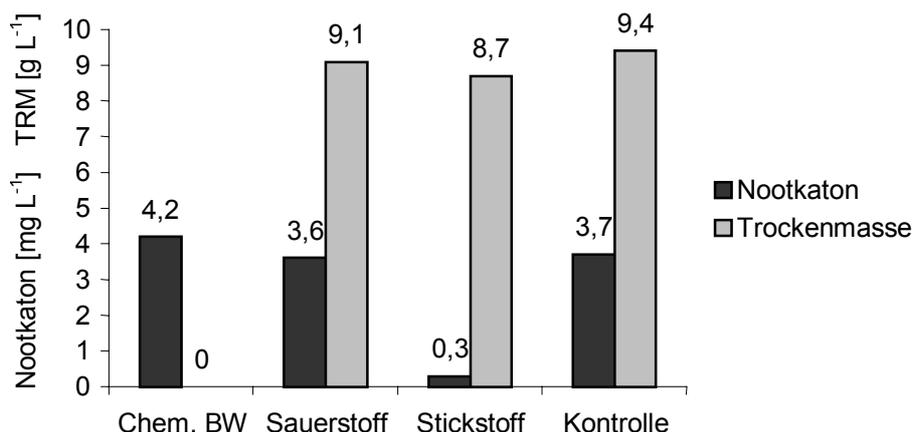


Abbildung 2-57: Valencentransformation von *C. globosum* unter Sauerstoffanreicherung im Kopfraum im Vergleich zur Kultivierung mit Stickstoffanreicherung, Kontrollkultur (keine Anreicherung) und chemischem Blindwert mit Sauerstoffanreicherung, nach 96 h Transformationszeit (*C. globosum*, Schüttelkolbenkultivierung, 2,25 mM Valencendosierung).

Verglichen mit der autoxidativen Nootkatonbildung in Submerskultivierung ohne Gasaustausch (2.3.1) kam es durch eine Sauerstoffbegasung zu einem erhöhten chemischen Blindwert (chem. BW), während eine Stickstoffzufuhr die Bildung signifikant unterdrückte. Somit scheint der im Medium vorhandene Sauerstoff unabdingbar für die Oxidation von Valencen zu sein. Eine Limitierung des Sauerstoffs für die Biotransformation schien bei einer natürlichen Sauerstoffsättigung des Kulturmediums von ca. 0,25 mM O₂ nicht vorzuliegen. Somit verstärkte sich durch die Sauerstoffanreicherung nur die Autoxidation von (+)-Valencen zu Nootkaton, während die Transformationsmenge konstant blieb.

2.3.9.3 Substratzuführung in Emulsionen

Geringe Umsätze bei Terpententransformationen können unter anderem auf die schlechte Wasserlöslichkeit der Terpene zurückzuführen sein, die zu einer Limitierung des Substrates am Wirkort führt. Eine Verbesserung der Löslichkeit und somit Verfügbarkeit des Substrates kann durch Zugabe in wässrige Tensidlösungen erreicht werden. Daher wurde die Wirkung einer Dosierung des Substrates in Emulsionen auf die Transformationsrate der Valencenbikonversion untersucht. Hierzu wurden die O/W-Emulgatoren Tween 40 (Polyoxyethylen-sorbitanmonopalmitat) und Triton X-100 (Polyoxyethylen-octylphenyl-ether) verwendet. Die Herstellung der Emulsionen erfolgte in einem 10 mM TRIS-Präparationspuffer unter Stickstoffbegasung, Temperierung bei 50 °C und Homogenisierung im Ultraschallbad (5.2.3.2). Die Emulsionen wurden auf zwei Arten hergestellt. Bei der

Verwendung des Detergenzes Triton X-100 bzw. Tween 40 in einem zuvor optimierten Verhältnis Substrat zu Emulgator von 3:1 und nachfolgender Erwärmung wurde eine klare Emulsion erhalten (Ansatz A). Hieraus lässt sich im Vergleich zu Ansatz B (keine Erwärmung) eine geringe Micellengröße ($< 0,2 \mu\text{m}$) und somit eine stabilere Emulsion ableiten.

Zur Erzielung einer verbesserten Löslichkeit wurde Valencen ebenfalls im Cosolvens Ethanol (0,5% v/v Endgehalt) zum wässrigen Medium zugegeben.

In allen Experimenten blieb die gebildete Nootkatonmenge unter der des Kontrollversuchs (**Abb. 2-58**). Eine Ausnahme bildete der Versuch mit Tween 40. Wurde (+)-Valencen in Tween 40 emulgiert und zudosiert, so wurde für die untemperierte Emulsion im Vergleich zum Kontrollversuch eine um den Faktor 2 gesteigerte Nootkatonbildung erhalten, Valencen wurde wesentlich geringer verstoffwechselt, wenn das Substrat in der stabileren, temperierten Emulsion dosiert wurde.

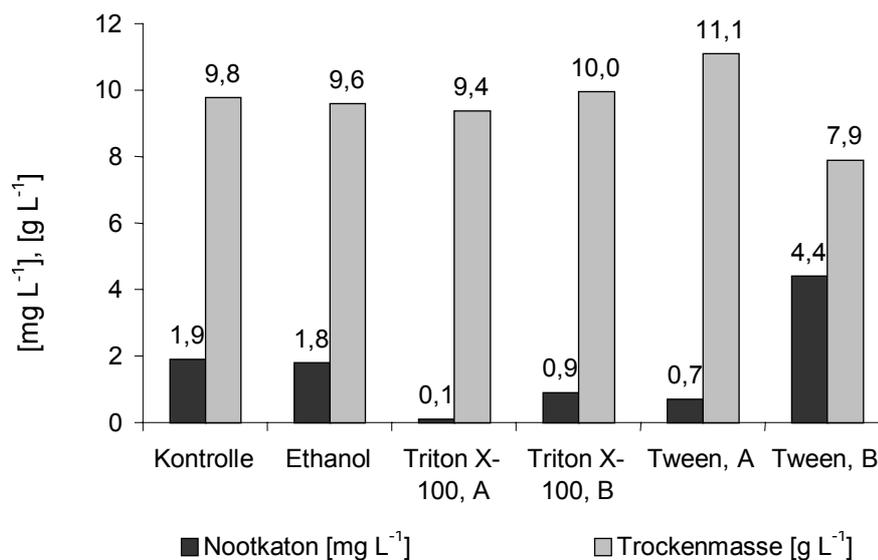


Abbildung 2-58: Transformationsleistung und Trockenmasse von *C. globosum* in Schüttelkolbenkultivierung 96 h nach erster Substratzugabe von 1,8 mM (+)-Valencen (Ansatz A: erwärmt; B: nicht erwärmt).

Bemerkenswert ist das Verhältnis des Epoxynootkatons zu Nootkaton im Ansatz Tween B, das sich im Vergleich zum Kontrollversuch zugunsten des Nootkatons verschob (nicht dargestellt).

2.3.9.4 Substratdosierung über den Dampfraum

Neben einer direkten Zuführung des Substrats in das Kulturmedium können flüchtige Verbindungen in Submerskultivierungen auch über den Dampfraum in das Kulturmedium eingetragen werden. Hierbei sorgte ein im Kulturkolben angebrachtes Reservoir, das mit (+)-Valencen gefüllt war, für einen mit Valencen gesättigten Kopfraum im Schüttelkolben. Durch ein sich einstellendes Diffusions- und Verteilungsgleichgewicht sollte eine permanente Verfügbarkeit des Substrates im Medium erreicht werden (Onken, 1998). Die Zuführung von (+)-Valencen über den Dampfraum war über ein Reservoir aufgrund des geringeren Dampfdrucks des (+)-Valencens im Vergleich z.B. zum *R*-(+)-Limonen nicht möglich. So wurden nur sehr geringe Mengen (+)-Valencen im Kulturmedium gefunden (2-5 mg L⁻¹, entsprechen 0,2-0,5 mg über den Kultivierungszeitraum bei einer Dosierung von 460 mg im Reservoir), eine Transformation fand nicht statt.

2.3.9.5 Dosierung unterschiedlicher Substratmengen

Die Substratdosierung in einer Biotransformation kann einen Einfluss auf die entstehende Produktmenge und die Produktausbeute der Transformationsreaktion haben. So werden, wie für Transformationskinetiken üblich, Substratsättigungskonzentrationen erreicht. Zur Ermittlung der optimalen Valencendosierung wurden parallel fünf unterschiedliche Valencendosierungen (2,4; 4,8; 9,6; 14,4; 24,0 mM) verwendet und zu einer drei Tage alten Experimentalkultur direkt zudosiert. Die Konzentration von 24 mM stellte hierbei die Konzentration der beginnenden Phasentoxizität dar (g L⁻¹ Bereich, 3.4.2). Höhere Dosierungen wurden in Zusammenhang mit der Kultivierung in Biokonzentraten untersucht (2.3.9.8). Nach einer Transformationszeit von 76 h (ca. 3 Tage) wurden die entstandenen Metabolite bestimmt und der berechneten Ausbeute gegenübergestellt (**Abb. 2-59**).

Es fand eine proportional zur Valencenmenge erhöhte Nootkatongenese mit einer Maximalkonzentration von 25 mg L⁻¹ statt. Ebenfalls stieg die Genese der Nebenprodukte mit erhöhter Substratdosierung leicht an. Die effektive Ausbeute von Nootkaton bezüglich seines Precursors (+)-Valencen blieb konstant bei ca. 0,5 mol% und erhöhte sich nicht. Eine weitere Optimierung bezüglich höherer Valencendosierungen erschien im Hinblick auf eine gleichbleibende Nootkatonausbeute nicht sinnvoll, sofern die Umsetzung zwar zu höheren Produktmengen, aber nicht zu verbesserten Ausbeuten führte. Die chemische Bildung von Nootkaton bei einer Dosierung von 22,5 mM war nach 76 h zu vernachlässigen (siehe **Abb. 2-62**).

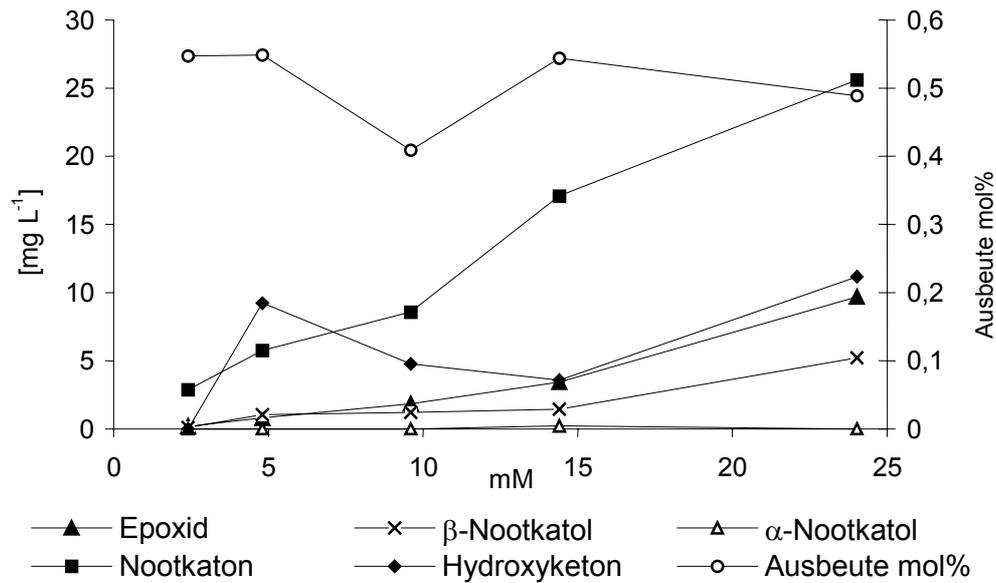


Abbildung 2-59: Valencentransformation von *C. globosum* im Schüttelkolben mit unterschiedlicher Substratdosierung (2,5-24 mM, t=76 h) mit der effektiven Nootkatonausbeute in mol%.

Teilzusammenfassung von 2.3.9.1 bis 2.3.9.5:

- Die Transformation von Valencen mit vermindertem Glucosegehalt führte zu einem Anstieg der Nootkatonbildung zum Zeitpunkt des Glucoseverbrauchs auf 14 mg L⁻¹.
- Die Erhöhung der Sauerstoffzufuhr durch ein vergrößertes Oberfläche-Volumen-Verhältnis führte zum leichten Anstieg der Nootkatonbildung. Eine Zufuhr von Sauerstoff in den Kulturkolben bewirkte einen Anstieg der chemischen Bildung von Nootkaton, eine Stickstoffzufuhr führte zu einer Hemmung der Transformation.
- Die Zuführung des Substrates in stabilen Emulsionen führte zu einer Herabsetzung der Nootkatonbildung. Die Verwendung von Tween 40 in Suspensionen zeigte eine um den Faktor 2 gesteigerte Produktbildung.
- Eine Valencendosierung über den Dampfraum des Kulturkolbens war aufgrund des niedrigen Dampfdruckes des Valencens nicht möglich.
- Eine Erhöhung der zudosierten Substratmenge führte zu einer proportional gesteigerten Nootkatonbildung von bis zu 25 mg L⁻¹ bei einer maximalen Substratkonzentration von 24,0 mM. Es ergab sich jedoch keine Verbesserung der molaren Umsatzrate.

2.3.9.6 Korrelation von Biomasse und Nootkatonbildung

Die Erhöhung der Biomasse und somit die Menge an verfügbarem Biokatalysator stellt einen weiteren Faktor dar, mit dem die Menge an Valencentransformationsprodukten gesteigert werden kann. Ziel dieses Versuches war die Untersuchung des Einflusses einer Erhöhung aktiver Biomasse auf die Nootkatonbildung.

Hierzu wurden zu fünf Transformationsansätzen (Doppelansatz) jeweils eine definierte Menge an Biofeuchtmasse zugesetzt und mit frischem Kulturmedium auf 50 mL Transformationsvolumen aufgefüllt (gravimetrisch). Dieser Konzentrationsreihe verschiedener Biomassen wurde eine konstante Menge an (+)-Valencen von 0,5 % (v/v, 24,5 mM) zudosiert. Die Biofeuchtmassenkonzentrationen betragen 152, 295, 456, 613, 850 und 991 g L⁻¹ (5.2.2.7), wodurch der Kulturansatz mit der höchsten Biofeuchtmasse eine „musähnliche“ Konsistenz hatte. Die angegebene maximale Biofeuchtmasse von 991 g L⁻¹ entsprach nach dieser Methode in etwa einer Biotrockenmasse von 32 g L⁻¹. Die erhöhte Biofeuchtmasse war durch einen verbliebenen Wassergehalt zu erklären. Die Kultivierung erfolgte bei 200 rpm und 24 °C.

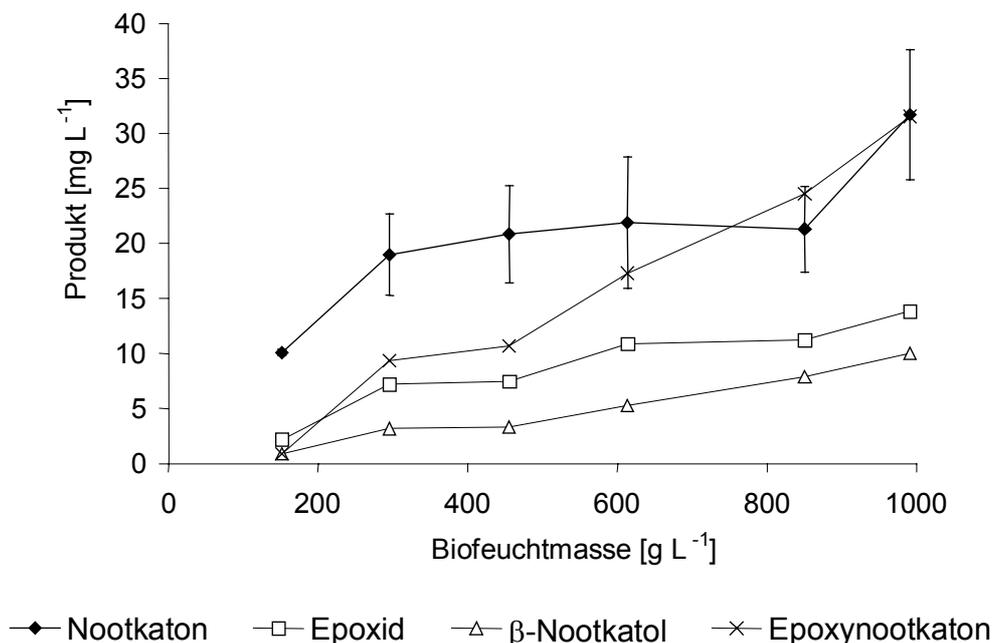


Abbildung 2-60: Biotransformation von (+)-Valencen nach 48 h Transformationszeit in Biokonzentraten mit unterschiedlichen Biofeuchtmasseanteilen (*C. globosum*, Valencendosierung 24,5 mM).

Mit steigender Biofeuchtmasse zeigte sich eine nahezu lineare Produktzunahme für β-Nootkatol, die Epoxy-/Hydroxyketone und das Valencen-11,12-epoxid, wobei der Anstieg der Epoxyketone wesentlich steiler verlief (**Abb. 2-60**). Die Zunahme von Nootkaton nahm erst

zu, stagnierte dann und stieg erst bei der höchsten Biofeuchtmasse sprunghaft an. Hierbei wurde ein Unterschied zwischen normaler Submerskultivierung und konzentrierter Kultur (Biokonzentrate) von dem Faktor von 2,5 bis 3 gefunden. Die Verwendung sehr hoher Zelldichten führte zu einer erhöhten absoluten Nootkatonbildung, jedoch wurde keine effektive Steigerung der Produktausbeute bezüglich der Biomasse erzielt. Statistische Schwankungen relativierten den auftretenden Effekt des sprunghaften Anstiegs der Nootkatonkonzentration für Biofeuchtmassen $> 900 \text{ mg L}^{-1}$.

2.3.9.7 Kinetik der Transformation mit erhöhten Zelldichten und hoher Substratdosierung

Um die Generierung oxidierter Valencenmetabolite in Kulturführungen mit konzentrierter Biomasse kinetisch verfolgen zu können, wurde eine Transformation von 0,5% (v/v) Valencen in Biokonzentraten (Biotrockenmasse von 38 g L^{-1}) durchgeführt und täglich Proben entnommen. Dabei wurde Nootkaton bis zu 25 mg L^{-1} innerhalb von 48 h gebildet (**Abb. 2-61**). Nach einem Abfall der Nootkatonkonzentration war ein Anstieg ab dem fünften Transformationstag zu beobachten. Im Vergleich mit dem chemischen Blindwert (Inkubation von mycelfreiem Medium und 1% [v/v] Substrat, **Abb. 2-62**) ist ersichtlich, dass bis zum vierten Transformationstag eine Biotransformation vorlag, ab diesem Zeitpunkt der chemische Blindwert jedoch stark anstieg, weil die erhöhte Nootkatonmenge sich additiv aus chemischem Blindwert und der Biotransformation zusammensetzte.

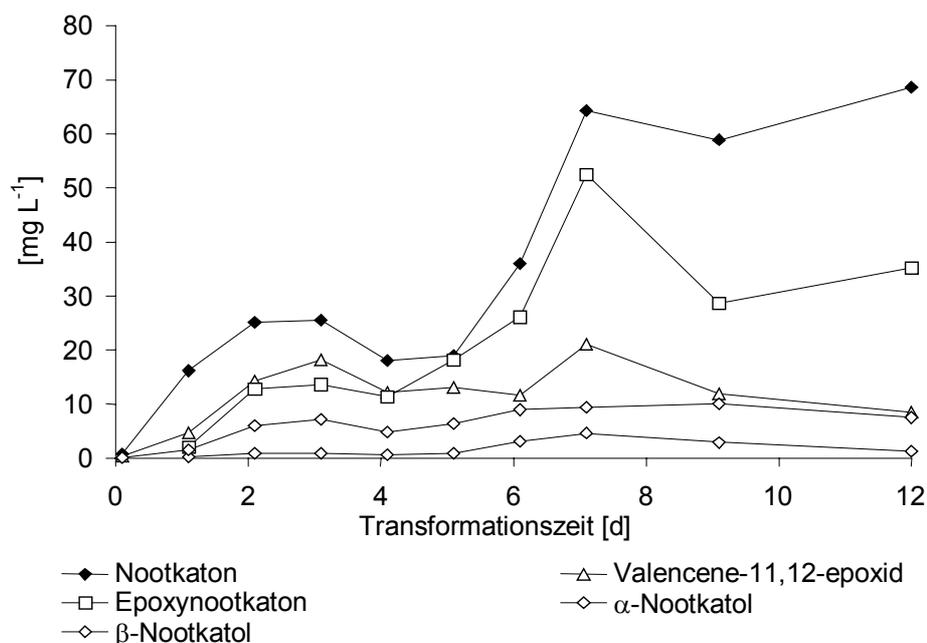


Abbildung 2-61: Biotransformation von Valencen mit *C. globosum* in Biokonzentraten (Dosierung 1%, 24 mM; Trockenmasse $t(0) = 38 \text{ g L}^{-1}$).

Bei einer Dosierung von 24 mM (+)-Valencen 1% (v/v) kam es ab dem vierten Kulturtag zu einer wesentlich höheren chemischen Bildung von Nootkaton im Vergleich zur Submerskultivierung (2.3.1), bei der die Dosierung bei 2,25 mM lag. Besonders auffällig war dies bei der Betrachtung der Bildung von α - und β -Nootkatol, wobei biochemisch zunächst nur β -Nootkatol gebildet wurde und das autoxidativ gebildete α -Nootkatol erst ab dem fünften Transformationstag in deutlichen Mengen auftrat. Bezüglich des Maximums am zweiten Tag wurden 0,38 mg Nootkaton pro g Trockenmasse und Tag gebildet. Die Transformation wurde hinsichtlich ihres Volumen/Zeit-Verhältnisses um den Faktor 6,5 gegenüber der Submerskultivierung verbessert (siehe **Tab. 2-12**). Das Mycel blieb über die gesamte Transformationszeit vital. Die Vitalität wurde durch Ausplattieren des Kulturmycels überprüft.

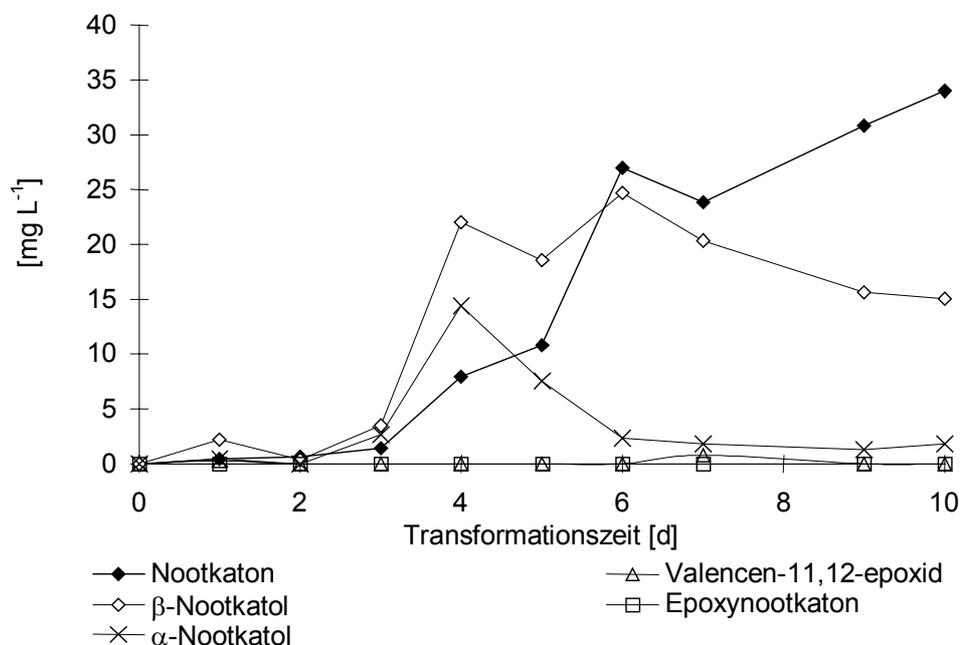


Abbildung 2-62: Chemische Bildung von Nootkaton im SNLH-Medium (pH 6,0, Dosierung 1%, 24 mM).

2.3.9.8 Optimierung der Substratdosierung in Kultivierungen mit erhöhten Zelldichten

Ziel des Versuches war die Optimierung der Substratzugabe in konzentrierten Kulturen von *Chaetomium globosum*. Hierzu wurden unterschiedliche Dosierungen an (+)-Valencen im Bereich 24,5 mM (0,5% v/v) bis 490 mM (10% v/v) zu einer nach 5.2.2.7 vorbereiteten konzentrierten Kultur gewählt. Die Konzentrationen von bis 10% (v/v) (+)-Valencen als zweite Phase erschienen im Hinblick auf die technologische Anwendung für eine

Zweiphasenkultivierung als sinnvoll (siehe 2.3.9). Die Produktbildung wurde nach 72 h insgesamt aus beiden Phasen bestimmt.

Die Nootkatongenese wurde bei einer Erhöhung der Valencendosierung von 0,5 auf 2% (v/v; 25-100 mM) bis auf 120 mg L^{-1} erhöht (**Abb. 2-63**). Ein Maximum von 130 mg L^{-1} wurde bei einer Zugabe zwischen 100-240 mM (+)-Valencen erreicht. Im Gegensatz zur Nootkatongenese wurden für die weiteren Transformationsprodukte maximale Konzentrationen (bis zu 20 mg L^{-1}) bei Valencendosierungen im Bereich von 24 bis 96 mM erzielt. Die maximale Nootkatonausbeute von 0,5 mol% sank hingegen ab einer Dosierung von >100 mM Valencen. Bei einer Dosierung >250 mM Valencen wurde keine Steigerung der Produktkonzentration im Kulturmedium mehr erzielt, sondern eine drastische Abnahme verzeichnet. Insgesamt jedoch gelang eine Steigerung der Nootkatonkonzentration um den Faktor 5 bei Erhöhung der Valencenkonzentration auf 200-250 mM (5% [v/v]). Die chemische Bildung von Nootkaton erfolgte innerhalb der kurzen Inkubationszeit nur bis zu einem Gehalt von 4 mg L^{-1} (2.3.9.7).

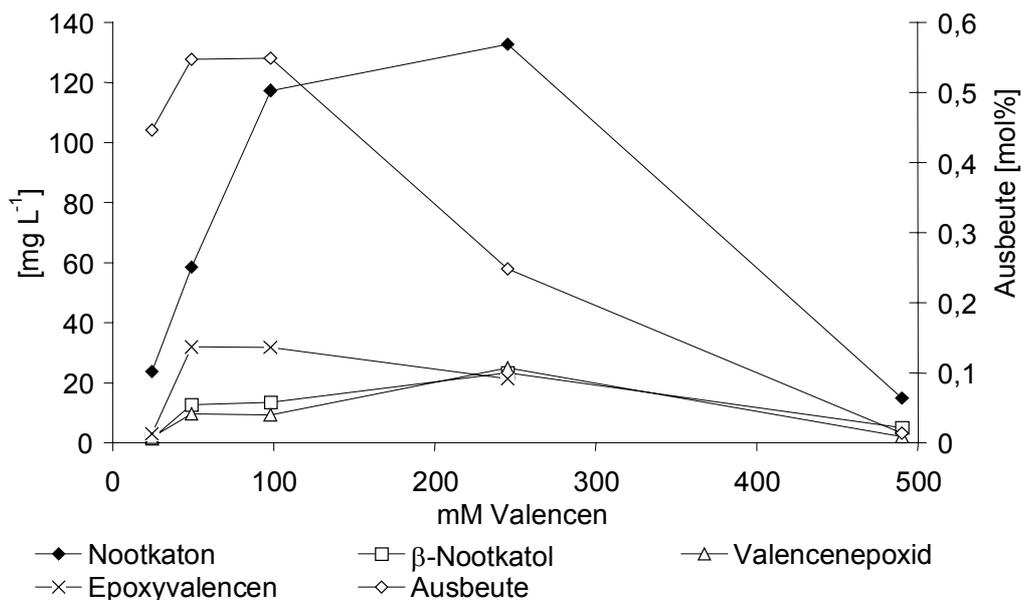


Abbildung: 2-63: Valencentransformation mit *C. globosum* in konzentrierten Kulturen mit unterschiedlicher Substratdosierung nach 72 h (Trockenmasse $\sim 38 \text{ g L}^{-1}$).

Teilzusammenfassung von 2.3.9.6 -2.3.9.8

- Die Erhöhung der Biomasse im Transformationsansatz führte zu einer linearen Zunahme der Produktbildung. Abweichend hierzu zeigte Nootkaton eine leicht sigmoidale Korrelation. Es wurde keine relative Steigerung der Produktausbeute bezüglich der Biomasse nachgewiesen.
- Die Transformationskinetik bei Verwendung hoher Zelldichten zeigte ein Produktmaximum von 25 mg L^{-1} Nootkaton nach 48 h. Ab dem vierten Transformationstag setzte verstärkt eine chemische Bildung ein, so dass sich die Maximalkonzentration von 70 mg L^{-1} Nootkaton additiv aus chemischer und biologischer Bildung zusammensetzte.
- Die Optimierung der Substratzugabe zu konzentrierten Kulturen von *C. globosum* führte zu maximalen Nootkatonbildungen von bis zu 130 mg L^{-1} bei einer Dosierung von 250 mM (+)-Valencen. Die Nootkatonumsatzrate von maximal 0,5 mol% sank ab einer Zugabe von 100 mM stark ab.

2.3.10 Induktion und Adaptation von Transformationskulturen

Eine Adaptation von Kulturen mit Terpenen führt zu einer Einstellung des Metabolismus auf die veränderte Umgebung. Sie wird mit einer niedrigen Substratdosierung in die Vorkultur erreicht. Eine Induktion der Transformationskultur führt zur Expression bestimmter benötigter katabolischer Enzyme. Hohe Dosierungen eines lipophilen Induktors können ebenfalls in Zusammenhang mit einer Zwei-Phasen-Kultivierung verwendet werden. Insbesondere unpolare Lösungsmittel werden in Biotransformationen für eine kontinuierliche Substratversorgung des wässrigen Mediums mit lipophilen Substraten durch Einstellung des Löslichkeitsgleichgewichtes und für eine gleichzeitige Extraktion der Produkte eingesetzt. Sie können aber auch induktiv wirken, wenn sie wie *R*-(+)-Limonen strukturähnlich sind und einem ähnlichen Metabolismus verglichen zum Substrat unterliegen. Somit kann Limonen sowohl als Induktor wie auch als extraktives Solvens wirken.

2.3.10.1 Adaptation von Vorkulturen mit (+)-Valencen

Durch Dosierung des Precursors in Vorkulturen können die Pilze an bestimmte Substrate im Medium adaptiert werden. Dabei findet eine Anpassung des Metabolismus statt (Onken, 1998).

Zur Substratadaptation der Transformationskultur *C. globosum* wurden zu 200 mL Vorkulturen 20 μ L (+)-Valencen (0,4 mM) dosiert (5.2.2.5). Eine vergleichende Kultivierung ohne Adaptation wurde parallel mitgeführt. Die Transformationskulturen wurden unter Zusatz von 2,25 mM (+)-Valencen wie in 2.3.3 inkubiert.

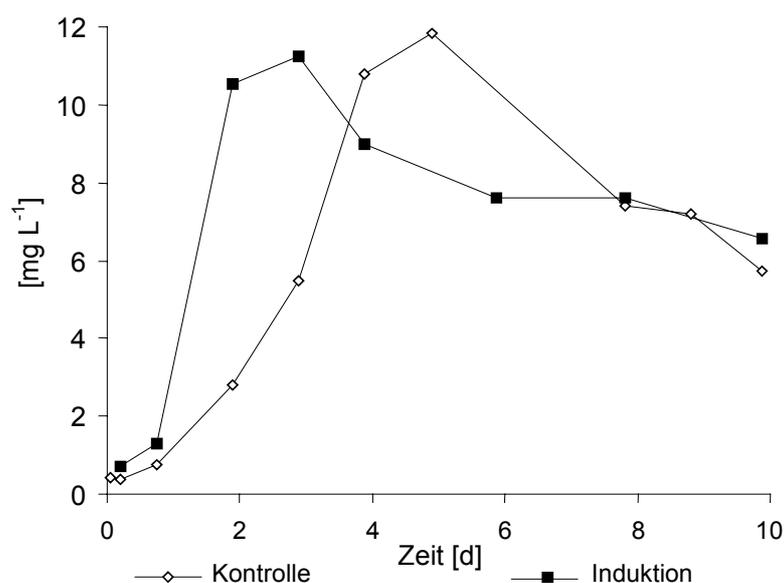


Abbildung 2-64: Vergleich der Nootkatonbiogenese von adaptierter zu nicht adaptierter Kultur von *C. globosum* in 200 mL-Submerskultur (Dosierung 2,25 mM Valencen).

Es zeigte sich eine beschleunigte Kinetik der Nootkatongenese nach Substratadaptation der Vorkultur (**Abb. 2-64**). Das Maximum der Nootkatonbildung wurde nach ca. 48 h Transformationszeit beobachtet, während es in nicht adaptierten Kulturen erst nach 96 h auftrat. Es gab keinen Unterschied bezüglich der gebildete Nootkatonmenge von maximal 12 mg L^{-1} zwischen adaptierter und nicht adaptierter Kultur.

2.3.10.2 Co-induktiver Effekt von Limonen

Das Monoterpen Limonen ($\log P_{\text{OW}}$ 4,03; Meylan und Howard, 1995) bot sich als natürliches Substrat zur Co-Induktion der Valencenbiotransformation an, wenn die Metabolisierung beider Substrate über dieselbe Enzymkaskade verläuft. Da es in hohen Konzentrationen als Hauptkomponente neben dem (+)-Valencen in etherischen Ölen von Orangen enthalten ist und als Reststoff anfällt (siehe 3.2.2), konnte die biotechnologische Anwendbarkeit der gefundenen Valencentransformation auf mit Limonen verunreinigte Substrate festgestellt werden. Ziel dieses Versuches war die Bestimmung des Einflusses von *R*-(+)-Limonen als „Co-Induktor“ auf die Transformation von Valencen mit *Chaetomium globosum* in Submerskultivierung. Zur Ermittlung eines konzentrationsabhängigen Effektes wurde am dritten Kultivierungstag den Experimentalkulturen *R*-(+)-Limonen in steigenden Konzentrationen zu einer konstanten Valencenmenge zugegeben. Die 200 mL-Kulturen enthielten somit zu Transformationsbeginn neben 2,5 mM (+)-Valencen 0; 2,5; 7,5; 30 und 75 mM (0; 0,034; 0,102; 0,408; 1,02% [w/v]) *R*-(+)-Limonen (5.2.2.8). Die Gehalte an Transformationsmetaboliten wurden durch Extraktion des Zellüberstandes und der organischen Phase bestimmt und als Gesamtgehalt beider Phasen angegeben.

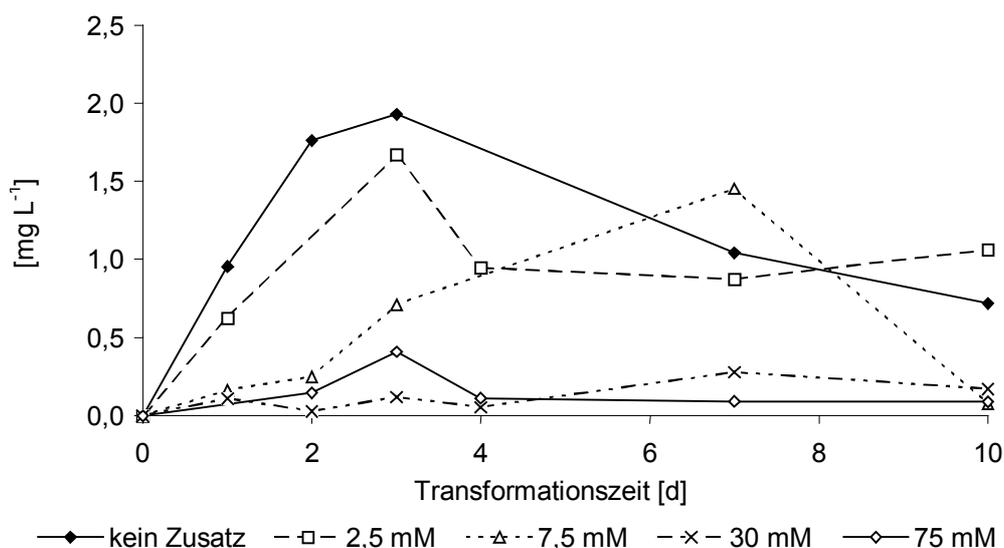


Abbildung 2-65: Zeitabhängige Nootkatonbildung mit *C. globosum* bei unterschiedlichen Limonenkonzentrationen in 200 mL-Submerskultur (Valencendosierung 2,25 mM).

Aus **Abb. 2-65** wird ersichtlich, dass die Nootkatonbiogenese schon bei äquimolaren Zusätzen von *R*-(+)-Limonen vermindert wird. Bis zu einer Limonenkonzentration von 7,5 mM wird Valencen noch zu Nootkaton transformiert, bei höheren Cosolvenskonzentrationen tritt jedoch eine drastische Abnahme der Transformationsleistung ein. Die angewandten Konzentrationen wirkten offensichtlich stark inhibierend und/oder zelltoxisch.

Die Transformationsprodukte des Limonens wie z.B. *trans*-/*cis*-Carveol, Perillaalkohol, Perillaaldehyd und *cis*-Limonenepoxid wurden nach 72 h mit zunehmenden Limonendosierungen verstärkt gebildet (**Abb. 2-66**).

Die Bildung von Perillaalkohol erreichte ein Maximum von 15 mg L⁻¹ bei einer Limonendosierung von 30 mM und stagnierte bei höheren Limonenkonzentrationen.

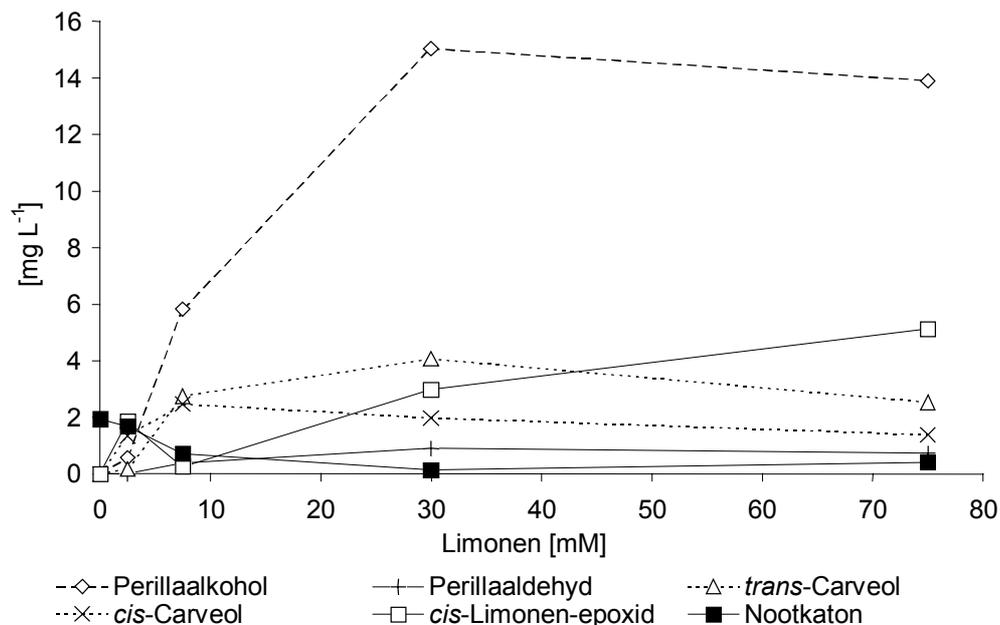


Abbildung 2-66: Bildung von Nootkaton und Limonentransformationsprodukten in Abhängigkeit zur Limonenkonzentration bei *C. globosum* in Schüttelkolbenkultur nach 72 h Transformationszeit.

Eine ähnliche Bildungskinetik war bei den anderen Oxidationsprodukten des Limonens zu beobachten (maximale Bildungskonzentrationen Perillaalkohol 15 mg L⁻¹, Perillaaldehyd 1 mg L⁻¹, *trans*-Carveol 4 mg L⁻¹, *cis*-Limonenepoxid bis zu 5 mg L⁻¹ nach 71 h).

Es wurde somit ein gegenläufiger Effekt von zunehmender Inhibierung der Nootkatonbildung und ansteigender Genese von Transformationsprodukten des Limonens beobachtet.

2.3.11 Zweiphasen-Kultivierungen mit n-Decan

Die Oxidationsprodukte des (+)-Valencens reichern sich überwiegend im Mycel an (siehe 2.3.6) und können deshalb nicht *in situ* durch Medienabtrennung gewonnen werden. Um eine Nootkatonfreisetzung aus den Transformationskulturen zu erreichen, wurde eine Zweiphasen-Kultivierung mit n-Decan als Cosolvens durchgeführt. n-Decan wurde aufgrund des hohen Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten ($\log P_{O/W}$ 5,67; Meylan und Howard, 1995), der damit einhergehenden geringeren Cytotoxizität als Limonen (Tan, 1998) und wegen seiner relativ geringen Flüchtigkeit gewählt. Hierzu wurden Biokonzentrate vorbereitet (5.2.2.7) und durch Zusätze an frischem SNLH-Medium und n-Decan auf Konzentrationen von 0 bis 100% des organischen Solvens und ein Gesamtvolumen von 50 mL eingestellt (5.2.2.8). Dabei führten Gehalte von bis zu 20% n-Decan zu einer Emulsionsbildung, wodurch keine repräsentative Probenahme mehr möglich war. Es erfolgte eine Valencendosierung von 1 % (v/v).

Die Verwendung von 25% Decan steigerte die Transformation um ca. 5 mg L⁻¹ (Abb. 2-67), während der Zusatz von 50% zu einer geringeren Nootkatonbildung verglichen mit der Kontrolle führte. Eine Konzentration von 100% wiederum zeigte eine leichte Erhöhung der Nootkatonbildung. Es war zu beobachten, dass ein zunehmender Zerfall des Mycelverbandes eintrat. Die Vitalität des Mycels während der Kultivierung wurde durch Ausplattieren auf Agarmedium nachgewiesen.

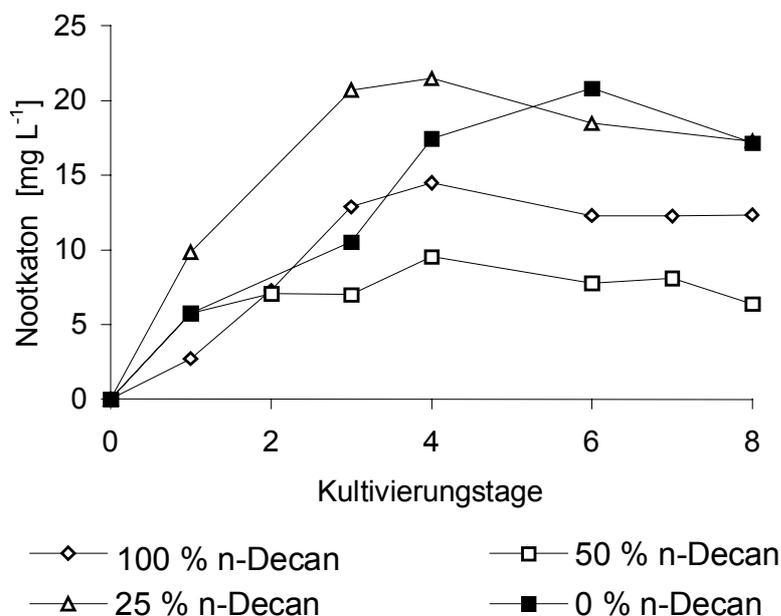


Abbildung 2-67: Nootkatonbildung von *C. globosum* unter Zusatz der jeweiligen Decanmengen (berechnet auf ein Kulturgesamtvolumen von 40 mL, Dosierung 24 mM; 1 % v/v).

Nootkaton reichert sich zu > 95% in der Decanphase an, während Medium und Mycel nur geringe Nootkatonmengen enthielten (**Abb. 2-68**). Im Kontrollversuch befand sich Nootkaton zu ca. 75% in der Mycelfraktion und 25% im Medium. Das Ergebnis bestätigte die ungünstige Verteilung der angestrebten Produkte zugunsten der lipophilen, zellulären Bestandteile. Auftretende Nebenprodukte reicherten sich ebenfalls zu mehr als 95% in der Decanphase an. Das Verhältnis von α - zu β -Nootkatol von 1: 4-6 während der Umsetzung war wiederum ein Indikator für eine Biotransformation mit nur geringer chemischer Nootkatonbildung. In den Kultivierungen mit Cosolvens konnte nur eine geringe Oxidation des gebildeten Nootkatons zu höher oxidierten Verbindungen nachgewiesen werden. Dagegen wurden nur im Ansatz ohne Zusatz von n-Decan bis zu 5 mg L⁻¹ Epoxy-nootkaton gefunden.

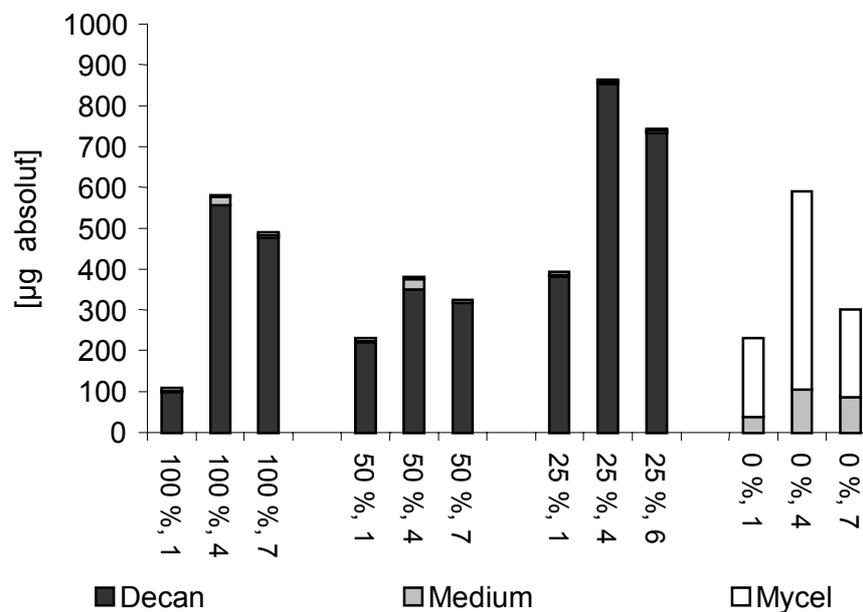


Abbildung 2-68: Verteilung der absoluten Nootkatonmenge in den jeweiligen Phasen der Ansätze 100 %, 50 % und 0 % Decanzusatz am 1., 4. und 7. Transformationstag der Valencenumsetzung mit *C. globosum* im Zwei-Phasen-System (Valencendosierung 24 mM).

Die Kultivierung mit n-Decan als Cosolvens im Bereich von 25% führte somit im Vergleich zur Verwendung von Limonen (siehe Verteilungskoeffizienten 3.4.3.2) zu einer erheblich besseren Produktfreisetzung. Somit ist eine extraktive Produktabtrennung möglich.

Teilzusammenfassung 2.3.10 und 2.3.11:

- Die Valencenadaptation von Vorkulturen führte zu einer beschleunigten Nootkatongenese, nicht jedoch zu erhöhten Produktausbeuten.
- Eine Biotransformation unter Zusatz des induktiven Cosolvens Limonen verminderte die Bildung von Nootkaton drastisch. Es wurde keine Induktion durch Limonen festgestellt.
- Die Verwendung von n-Decan in einer Konzentration von 25% (v/v) führte nicht zu einer Hemmung der Nootkatonbildung. Nootkaton und weitere lipophile Produkte reichern sich zu mehr als 95% in der Decanphase an und wurden somit aus dem lipophilen Mycel extrahiert.

2.3.12 Transformation mit Lyophilisaten

Neben dem Monoterpen *R*-(+)-Limonen (2.2.8.1) wurde ebenfalls das Sesquiterpen (+)-Valencen mit Lyophilisaten von ausgewählten Kulturen umgesetzt. Es wurden dabei neben nicht induzierten Kulturen auch mit Limonen induzierte Kulturen verwendet.

2.3.12.1 Aktivitätsscreening mit Lyophilisaten

Die Transformation wurde mit 30 mg L⁻¹ Lyophilisat (gewonnen aus ~330 mg Biofeuchtmasse) in 1,5 mL MOPS-Puffer (pH 7,0) mit einer Zugabe von 27,4 mM (+)-Valencen durchgeführt, wobei die Umsetzung wie bei der Submerskultivierung bei 24 °C im 4 mL-Vial bei 200 rpm für 24 h stattfand (5.4.1). Während Kulturen wie z.B. *Chaetomium globosum* und *Phanerochaete chrysosporium*, die in Submerskultivierung Valencen oxidierten, nach Lyophilisierung keine oder nur geringe Produktbildung zeigten, oxidierten Kulturen, die vormals keine Oxidationsprodukte bildeten, wie z.B. *Pleurotus sapidus*, Valencen zu Nootkatol und Nootkaton. So transformierten Lyophilisate einer mit Limonen induzierten Kultur von *P. sapidus* (+)-Valencen bis zu 200 mg L⁻¹ Nootkaton (**Abb. 2-69**), obwohl dieser Organismus in Submerskultivierung wesentlich geringere Produktbildungen zeigte (2.3.2).

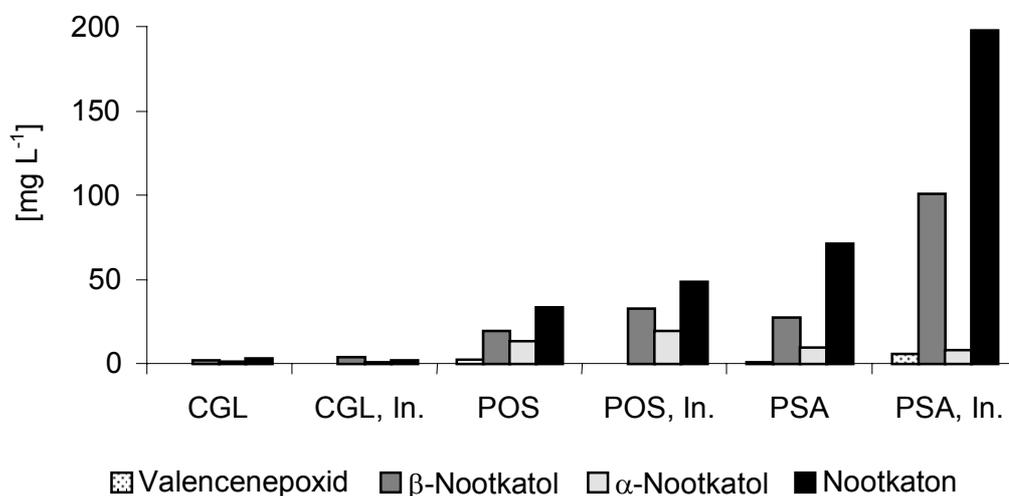


Abbildung 2-69:Produkte der Transformation von (+)-Valencen (27,4 mM) mit Lyophilisaten von *Chaetomium globosum* (CGL), *Pleurotus ostreatus* (POS) und *Pleurotus sapidus* (PSA) in MOPS-Puffer. Der Zusatz „In.“ bezeichnet die Limonen-induzierte Kultur (Dosierung 30 mM; 24 h Transformationszeit).

Ebenfalls bildeten Lyophilisate von *P. ostreatus* Produkte. Zum Vitalitätstest wurden die Lyophilisate auf SNLH-Medium ausplattiert. Hierbei zeigten insbesondere *P. sapidus* und

C. globosum ein wesentlich langsames Anwachsen der Kultur, *P. ostreatus* hingegen wuchs als einziger Pilz nicht an.

2.3.12.2 Bildungskinetik von Oxidationsprodukten mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus*

Zur Ermittlung einer günstigen Transformationszeit der Oxidation von Valencen zu Nootkaton mit *P. sapidus* wurde eine Kinetik der Lyophilisat-katalysierten Oxidation untersucht. Hierzu wurden 671 mg Lyophilisat einer adaptierten Kultur von *P. sapidus* in 21 mL Puffer mit 140 μL (+)-Valencen (30 mM) umgesetzt und eine Kinetik über zwei Tage aufgenommen. Es zeigte sich eine maximale Nootkatonkonzentration von 250 mg L^{-1} nach 13 h (5.4.2; **Abb. 2-70**).

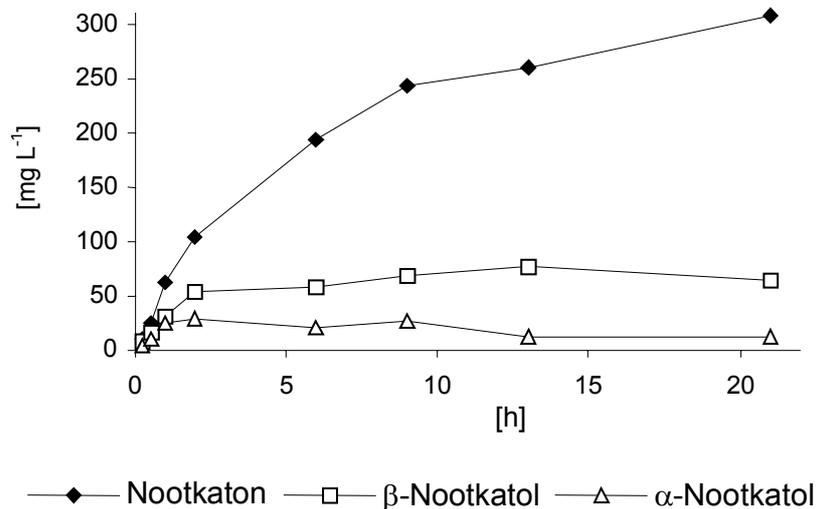


Abbildung 2-70: Kinetik der Genese von Nootkaton und der Nootkatole mit Lyophilisaten von adaptierten *P. sapidus* Kulturen in MOPS-Puffer (Dosierung 30 mM Valencen).

Dies entsprach einem Umsatz von 4,24 % (+)-Valencen in 13 h. β -Nootkatol wurde bis zu 60 mg L^{-1} und α -Nootkatol bis zu 20 mg L^{-1} gebildet, wobei die Maximalkonzentration für α -Nootkatol schon nach 2 h eintrat. Die Transformationsleistung pro Trockenmasse und Zeit betrug 14,4 $\text{mg g}^{-1}\text{d}^{-1}$ und verbesserte sich somit im Vergleich zur konzentrierten Submerskultivierung (24 mM Substratdosierung, 2.3.9.6) um den Faktor 27.

Substratumsetzungen in niedrigen Konzentrationsbereichen von 1 und 2 mM (+)-Valencen zeigten eine gehemmte Substratbildung innerhalb der ersten Stunde nach Substratzugabe (**Abb. 2-71**). Diese Hemmung war auch bei einer Valencendosierung von 30 mM zu beobachten. Es wurde eine höhere molare Ausbeute bei einer Dosierung von 1 mM mit

7,6% und bei 2 mM mit 8,2% im Vergleich zur Dosierung von 30 mM nach 4 Stunden Transformationszeit berechnet. Somit ließ sich die molare Ausbeute steigern, jedoch war die absolute Produktmenge bei der Transformation mit 30 mM am höchsten.

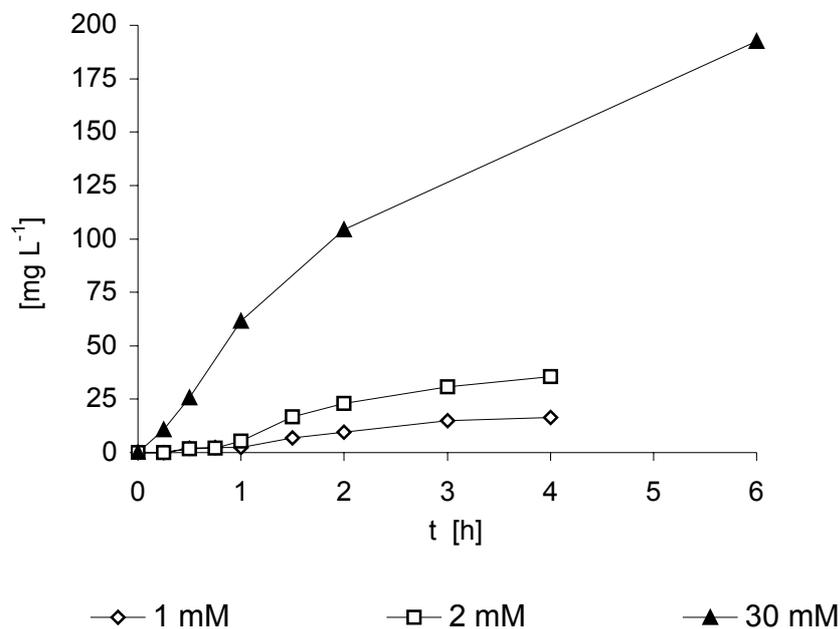


Abbildung 2-71: Transformation von Valencen mit Lyophilisaten aus *P. sapidus* in MOPS-Puffer unter Zugabe verschiedener Substratmengen.

Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Transformationsmethoden (Submerskultivierung, Biokonzentrate, Lyophilisate) durch Berechnung der Produktmenge pro Trockenmasse, Zeit und Volumen und der molaren Ausbeuten zeigt **Tab. 2-12**. Eine Transformation in Lyophilisaten (*P. sapidus*) lieferte eine 45-fach gesteigerte absolute Produktmenge und zeigte eine 102-mal höhere Nootkatongenese pro Trockenmasse und Zeit als die Submerskultivierung mit *C. globosum* (Maximalwerte zugrunde gelegt, siehe auch 2.3.12.3). Bei Verwendung von Biokonzentraten von *C. globosum* fand eine um den Faktor 2 beschleunigte Nootkatongenese im Vergleich zu Submerskultivierung statt. Die Nootkatonbildung bezüglich des Volumens berechnet zeigte eine deutliche Konzentrierung durch verkleinerte Transformationsansätze (Faktor 6,5). Die molare Ausbeute pro Zeit verringerte sich jedoch aufgrund der eingesetzten Valencenmenge von 1,6 auf 0,5 mol%. Lyophilisate erreichen eine 3,4-mal höhere molare Ausbeute als eine 200 mL-Submerskultivierung.

Tabelle 2-12: Vergleich der Valencenbiokonversionen in Submerskultivierungen und Biokonzentraten von *C. globosum* mit Lyophilisaten von *P. sapidus*.

Kultur	Transformationsmethode	Nootkaton [mg L ⁻¹]	Trockenmasse [g L ⁻¹]	Nootkaton pro Trockenmasse und Zeit [mg g ⁻¹ d ⁻¹]	Nootkaton pro Volumen und Zeit [mg L ⁻¹ d ⁻¹]	molare Ausbeute [mol% d ⁻¹]
<i>C. globosum</i>	Submerskultur	7,9 ± 0,8	9,9 ± 0,6	0,20	1,98	1,6
	Biokonzentrat	26,3 ± 1,4	34,7 ± 3,5	0,38	13,2	0,5
	Lyophilisat	n.n.	n.n.	-	-	-
<i>P. sapidus</i>	Submerskultur	1,2	8,3	0,04	0,3	0,2
	Lyophilisat	352 ± 14	31,9 ± 3,1	20,4	650	5,4

2.3.12.3 Optimierung der Substratdosierung

Zur Ermittlung der günstigsten Substratdosierung für die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* wurden unterschiedliche Dosierungen von 6 bis 300 mM eingesetzt. Eine maximale Nootkatongenese von ca. 350 mg L⁻¹ wurde im Bereich 30 mM (+)-Valencen gemessen (**Abb. 2-72**). Höhere Konzentrationen führten zu einer verminderten Valencenoxidation. Die Bildungskinetik von Nootkatol und Valencen-11,12-epoxid verlief in etwa parallel zur Nootkatongenese.

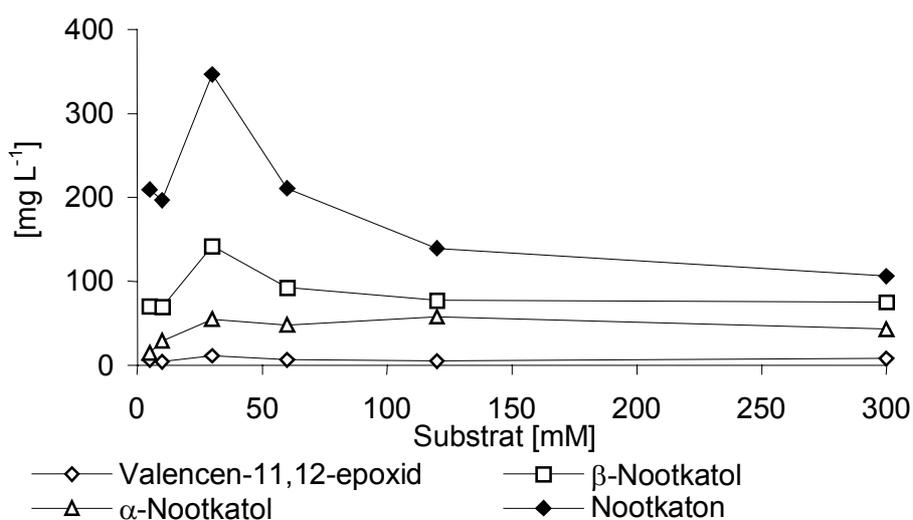


Abbildung 2-72: Valencentransformation mit Lyophilisaten von *P. sapidus* in MOPS-Puffer mit unterschiedlicher Substratdosierung (Transformationszeit 13 h).

2.3.12.4 Cofaktorabhängige Transformation und Einfluss von Medienbestandteilen

Die Transformation von (+)-Valencen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* wurde auf die Abhängigkeit der Cofaktoren NADH/NADPH getestet. Da die Transformation von Limonen im Medium im Vergleich zum MOPS-Puffer eine höhere Bildung an Oxidationsprodukten zeigte (2.2.8.1), wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der Valencentransformation von einzelnen Medienbestandteilen getestet. Hierzu erfolgte eine Zugabe der Cofaktoren NADH (1 mM und 10 mM) und NADPH (1 mM) und des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Inhibitors Proadifen (1 mM) zu einem im MOPS-Puffer rehydratisierten Lyophilisat. Medienbestandteile wie Glucose (30 g L⁻¹), Spurenelementlösung (1 ml L⁻¹, [5.2.1.1]) und Hefeextrakt (1,5 g L⁻¹) wurden analog zur Zusammensetzung des SNLH-Mediums separat zugegeben. 30 mM (+)-Valencen wurde zu den Ansätzen zudosiert.

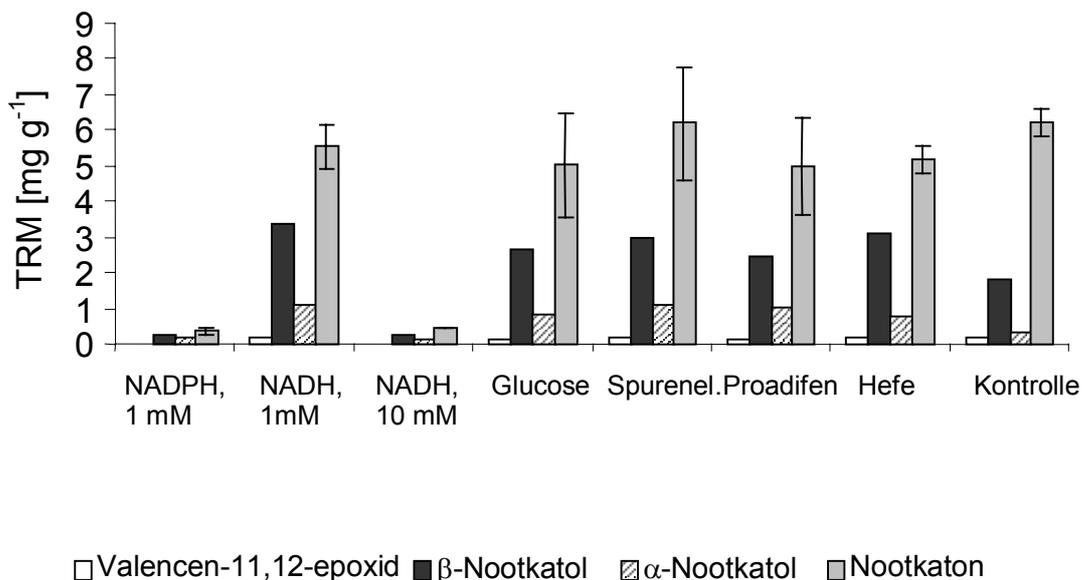


Abbildung 2-73: Abhängigkeit der Valencentransformation mit Lyophilisaten von *P. sapidus* in MOPS-Puffer von Cofaktoren und Medienbestandteilen (Dosierung 30 mM Valencen; Transformationszeit 13 h; Glucose 30 g L⁻¹; Proadifen 1 mM; Hefeextrakt 6 g L⁻¹; Spurenelemente wie im SNLH-Medium, siehe 5.2.1.1).

Die Zugabe von Medienbestandteilen und Cofaktoren beeinflusste die Valencentransformation im Vergleich zur Kontrolle mit Ausnahme der Zugabe von NADPH nur geringfügig (**Abb. 2-73**). Die Zugabe des Cosubstrates NADPH besaß einen stark inhibierenden Effekt, während der Cytochrom P450 Monooxygenasen Inhibitor nur eine leichte Hemmung auf die Produktbildung zeigte. Das biologische Reduktionsmittel NADH wurde ebenfalls in hohem Überschuss zugegeben, da bei einer Zugabe von 1 mM maximal

eine Verdoppelung der Produktgenese von 350 mg L^{-1} (entsprechen ca. $1,5 \text{ mM}$ NADH-Verbrauch) erwartet werden konnte, inhibierte jedoch in einer Konzentration von 10 mM ebenfalls die Produktgenese.

Teilzusammenfassung von 2.3.12:

- Die mit Lyophilisaten von *P. sapidus* katalysierte Valencentransformation führte zu entscheidend höheren Produktbildungen von 350 mg L^{-1} Nootkaton in erheblich kürzeren Transformationszeiten (13-14 h) im Vergleich zu *Chaetomium globosum* in Submerskultivierung. Ebenfalls stieg der molare Umsatz auf mehr als 5% an.
- Während die Biotransformation mit hoher Biomasse im Vergleich zur normalen Submerskultivierung nur zu einer Verbesserung des Volumen-Zeit-Verhältnisses um den Faktor 6,5 führte, die absolute Nootkatonmenge bezüglich der Trockenmasse und Zeit aber konstant blieb, verbesserte sich die Transformationsleistung bei Lyophilisaten bezüglich der absoluten Nootkatonmenge pro Trockenmasse und Zeit um das 102-fache. Dies entspricht einer 3,4-fachen Steigerung der molaren Ausbeute.
- Das Maximum der Produktbildung bei der Transformation mit Lyophilisaten wurde bei einer Substratdosierung von 30 mM festgestellt.
- Die Produktausbeute wurde durch Zudosierung des Cofaktors NADH sowie weiterer Medienbestandteilen nicht gesteigert. NADPH und NADH hatten einen stark inhibierenden Effekt auf die Genese der Oxidationsprodukte, der Inhibitor Proadifen zeigte keine Wirkung.

2.4. Biotransformation des Sesquiterpens Farnesen

Die Isomere des Sesquiterpens Farnesen (3,7,11-Trimethyl-dodeca-1,3,6,10-tetraen; CAS 502-61-4; siehe auch 3.3.1.3) wurden mittels Biotransformationen mit katalytisch aktiven Mikroorganismen wie z.B. *P. sapidus* unter verschiedenen Kulturführungen (Submerskulturen, Biokonzentrate und Lyophilisate) umgesetzt und entstandene aromarelevante Verbindungen identifiziert. Die Auswahl der möglichen bioaktiven Mikroorganismen erfolgte wie in den Untersuchungen zur Limonentransformation beschrieben (2.2.2.1). Farnesen wurde als Substrat verwendet, weil seine Oxidationsprodukte wie insbesondere das terminal oxidierte α -Sinensal ausserordentlich geruchsaktive Terpenoide darstellen. Deshalb wurden besonders Mikroorganismen berücksichtigt, die für die terminale Oxidation lipophile Substrate bekannt sind.

2.4.1 Transformationsleistung verschiedener Mikroorganismen

Das Aktivitäts-Screening wurde zunächst mit ausgewählten Kulturen als 200 mL-Submerskultivierung mit direkter Zugabe von 2,25 mM Farnesengemisch durchgeführt (5.2.2.6 und 5.2.3.1). Diese Kultivierungsart lieferte Oxidationsprodukte des Farnesens in Spurenbereichen ($<0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Deshalb wurde ein weiteres Screening mit konzentrierten Kulturen durchgeführt. Hierbei wurden zu den Biokonzentraten (5.2.2.7) 0,5% (v/v) Substrat dosiert. Die Probenahme erfolgte nach 24 (ein Tag) bzw. 96 Stunden (vier Tage). Es wurden wesentlich höhere Produktkonzentrationen erzielt als in vorhergehenden Submerskultivierungen. Die untersuchten Mikroorganismen sind der **Tab. 5-1** im experimentellen Teil zu entnehmen. In Abschnitt 2.4.2 sind die bezüglich der Farnesenoxidation aktivsten Kulturen dargestellt.

2.4.2 Transformationsleistung mit konzentrierten Kulturen

Die Ergebnisse des Screenings nach 24 bzw. 96 Stunden zeigten Oxidationsprodukte des Farnesens von Gehalten bis zu 70 mg L⁻¹ in der Submerskultur (**Abb. 2-74**).

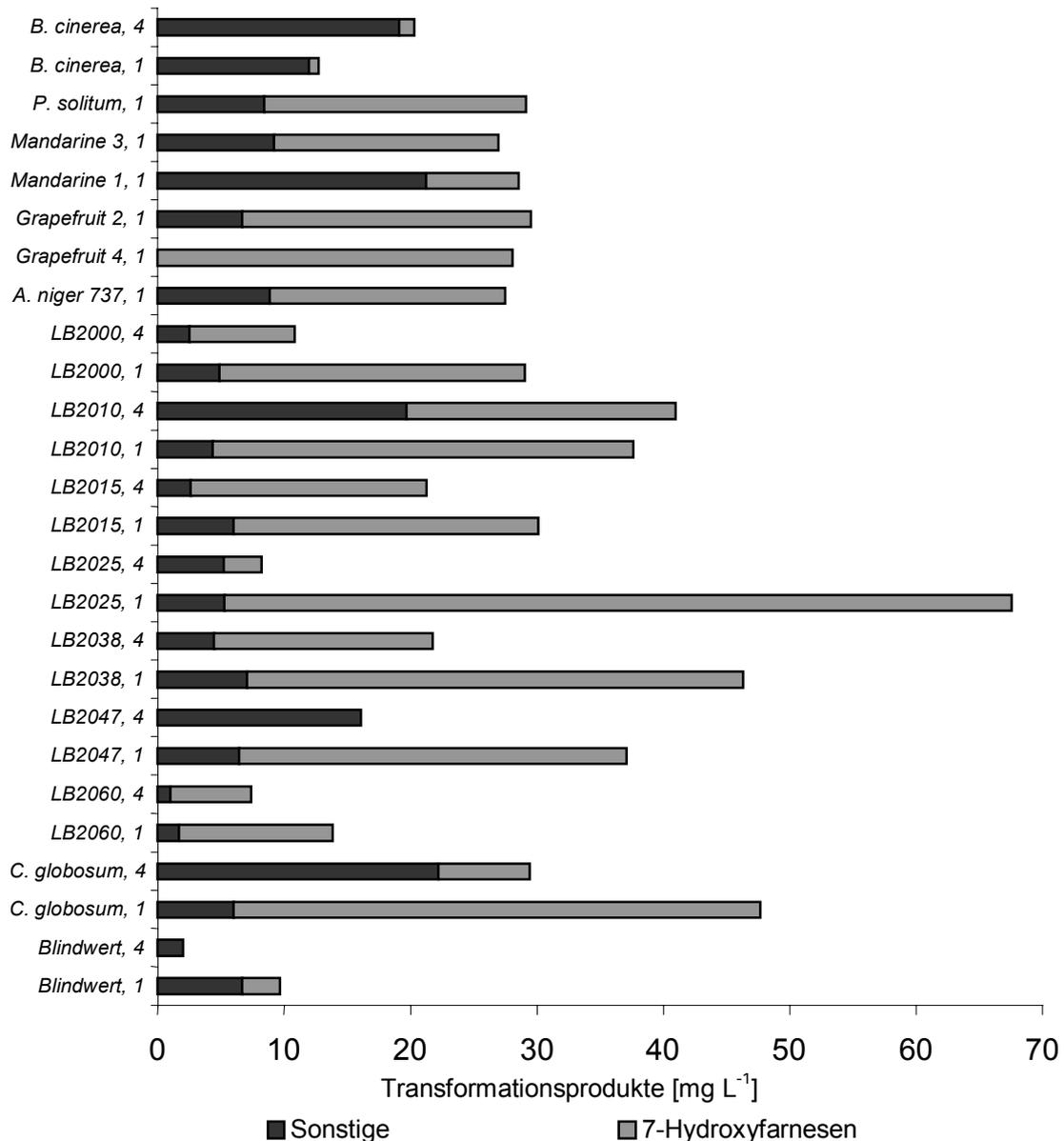


Abbildung 2-74: Produktbildung aus der Farnesenbiotransformation in Biokonzentraten (Dosierung: 24 mM; die Ziffern bezeichnen den jeweilige Tag der Probenahme, die Bezeichnung der Stämme befindet sich unter 5.1.1.1, **Tab.: 5-1**; Isolate wurden nach der jeweiligen Frucht benannt).

Das Oxidationsprodukt mit einem KI von 2233 (CW 20M), identifiziert als Farnesen-7-ol (2.4.5.1), stellte ein wesentliches Hauptprodukt der Farnesenoxidation mit einem maximalen Anteil von >99% dar (isolierte Kultur aus Grapefruit). Die Farnesenautoxidation (chemischer Blindwert, Dosierung von 0,5% v/v Farnesen in SNLH-Medium) war mit Gehalten von

10 mg L⁻¹ vergleichsweise gering, wobei eine Abnahme bei längeren Transformationszeiten zu beobachten war. Die autoxidative Bildung von Farnesenoxidationsprodukten ist 2.4.4 (**Abb. 2-76**) zu entnehmen.

2.4.3 Sensorische Bewertung von Farnesenoxidationsprodukten

Die Transformationsprodukte aus Farnesen wurden durch GC-Olfaktometrie sensorisch bewertet. Hierbei zeigte sich für alle oxyfunktionalisierten Verbindungen eine äußerst geringe Geruchsschwelle von weniger als 100 ng absolut (**Tab. 2-13**). Das 7-Hydroxyfarnesen zeigte einen besonders auffälligen Geruch nach Orange mit leicht blumiger Note. Die anderen Verbindungen hatten sensorische Ähnlichkeiten mit Farnesen, besaßen also einen citrusartigen bis leicht herben Geruchseindruck.

Tabelle 2-13: Produkte der Farnesentransformation mit Aromaeindruck (GC-O).

Verbindung	KI (CW 20 M)	Geruchsqualität	Geruchsschwelle (GC-O; ng / Geruchsreiz)
Unbekannt / MW 220	2032	schwach süß	< 5 ng
Unbekannt / MW 220	2055	citrus schalig	~ 50 ng
7-Hydroxyfarnesen (45)	2233	blumig / orange	< 50 ng
Unbekannt / MW 218	2250	-	-
Unbekannt / MW 218	2280	schalig, citrus	< 15 ng
Unbekannt / MW 220	2356	leicht herb	~ 70 ng

2.4.4 Kinetik der Farnesentransformation mit *C. globosum*

C. globosum bildete mehrere interessante Metabolite, deren Bildungskinetik nachfolgend untersucht wurde. Es wurde zunächst ein Vergleich von autoxidativer und biochemischer Genese der oxidierten Farnesene durchgeführt. Hierzu wurden 50 mL aufkonzentrierte Kulturen (5.2.2.7) von *C. globosum* mit 0,5 % (v/v, 25 mM) supplementiert und die Bildungskinetik über einen Zeitraum von vier Tagen verfolgt (**Abb. 2-75**). *C. globosum* katalysierte dabei die Transformation von Farnesen zu 7-Hydroxyfarnesen mit Gehalten von bis zu 170 mg L⁻¹ innerhalb von 24 h. Die Biotrockenmasse für diese Transformation betrug 30 g L⁻¹. Der Terpenalkohol war mit > 87% Hauptprodukt der Umsetzung, weitere Produkte werden mit den jeweiligen Kovats-Indices benannt. Das Oxidationsprodukt mit dem KI von 2055 (CW 20M) erreichte einen Gehalt von bis zu 40 mg L⁻¹ in 74 h.

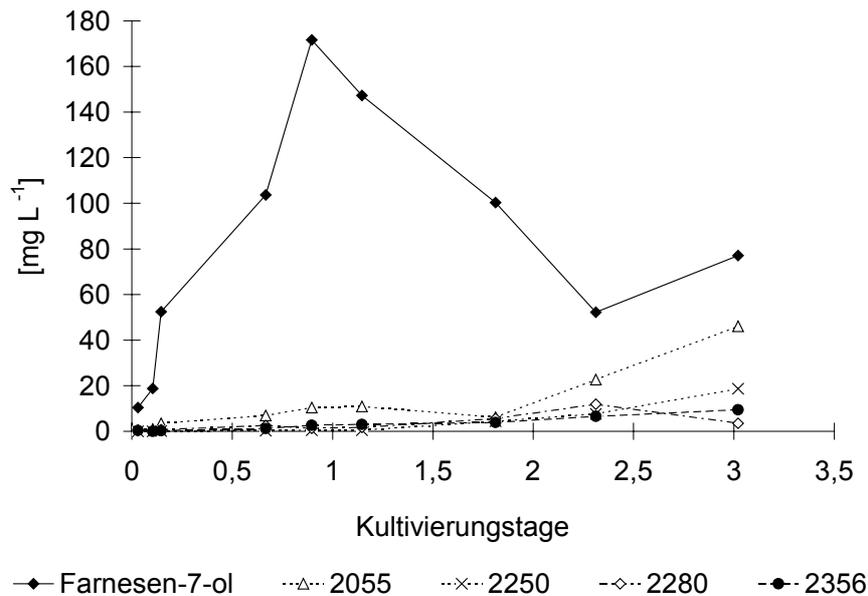


Abbildung 2-75: Produktbildungskinetik der Farnesenbiotransformation mit *C. globosum* in Biokonzentrat (24 mM Substratdosierung).

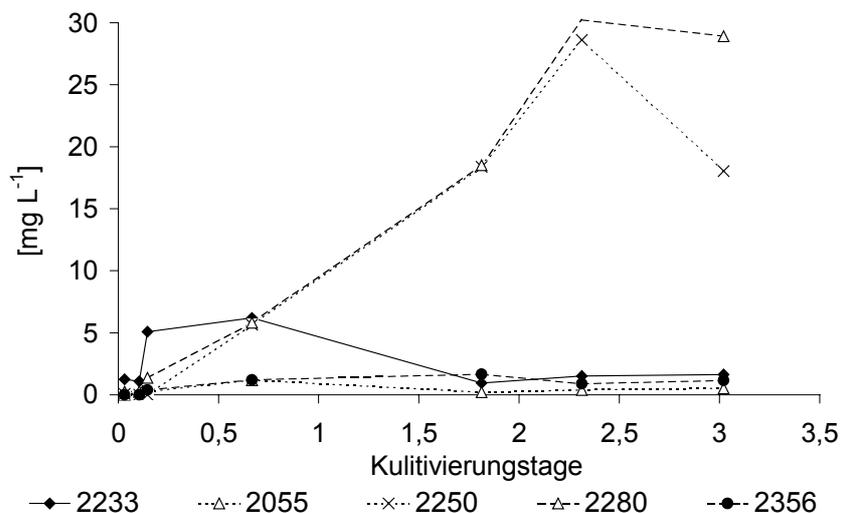


Abb. 2-76: Bildungskinetik der Autoxidationsprodukte von Farnesen in SNLH-Medium.

Durch Vergleich der Biotransformation (**Abb. 2-75**) mit der chemischen Oxidation von Farnesen (**Abb. 2-76**) war die Bildung der Verbindungen mit KI 2250 und 2280 (CW 20M) auf die Autoxidation des Farnesens zurückzuführen. Die autoxidative Bildung zeigte mit 30 mg L^{-1} in etwa dieselbe Produktmenge wie die biokatalytische Bildung. Dagegen bildeten sich nur ca. 5 mg L^{-1} des Transformationsmetaboliten 7-Hydroxyfarnesen sowie Spuren der untersuchten, flüchtigen Verbindungen (2.4.3).

2.4.5 Identifizierung der Transformationsmetabolite von Farnesen

2.4.5.1 Identifizierung des (*all-Z*)-7-Hydroxyfarnesen (**45**)

Das Transformationsprodukt mit dem KI von 2233 (CW 20 M) wurde als Hauptkomponente gebildet (2.4.4). Zur Isolierung und Identifizierung wurden Biokonzentrate von *C. globosum* nach 24-stündiger Transformation extrahiert. Der Extrakt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (5.9.1) und nachfolgend durch präparative Gaschromatographie auf eine Reinheit >92% gebracht (5.9.2.6).

Die Auswertung der Kernresonanzspektren $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ und HMQC-Spektren ergab die Struktur des 7-Hydroxyfarnesen ([7Z,9Z]-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,7,9,11-tetraen-6-ol; CAS 25249-86-9; **45**, **Abb. 2-78**), das mit den theoretisch nach dem Inkrement-System (Hesse *et al.*, 2002) berechneten chemischen Verschiebungen gut übereinstimmte (**Tab. 2-14**). Es sind nur relativ ungenaue NMR-Daten über **45** bekannt (Anet, 1969).

Tabelle 2-14: ^{13}C - und ^1H -Spektroskopische Daten für 7-Hydroxyfarnesen (**45**) im Vergleich zu berechneten Daten nach dem Inkrement-System (Hesse *et al.*, 2002; CHemDraw Ultra[®]).

Position C-Atom	$^{13}\text{C-NMR}$ $\delta(100\text{ MHz, CDCl}_3)$	$^{13}\text{C-NMR}$ (berechnet)	$^1\text{H-NMR}$ $\delta(400\text{ MHz, CDCl}_3)$	Multiplizität, J, Integral	$^1\text{H-NMR}$ (ber.)
1	113,2	116,3	5,04 und 5,21 <i>(trans/cis)</i>	dd, J = 10 Hz dd, J = 17 Hz	5,20 u. 5,27
2	141,9	136,9	6,41	dd, $J^3 = 10\text{ Hz, H}$	6,49
3	135,8	139,3	-	-	-
4	131,5	122,5	6,08	d, $J^3 = 11\text{ Hz}$	6,23
5	124,4	124,9	6,58	dd, $J^3 = 10\text{ Hz, H}$	6,47
6	142,0	135,0	5,80	d, $^3J = 15\text{ Hz, H}$	5,84
7	74,2	66,6	-	-	-
8	43,2	44,2	1,62	m, 2H	1,48
9	23,7	17,9	~ 2,0	m, 2H	1,96
10	125,0	125,8	5,13	t, J = 7 Hz, H	5,20
11	132,7	133,2	-	-	-
12	26,4	25,3	1,68	s, 3H	1,71
13	12,7	16,9	1,88	s, 3H	1,71
14	29,1	28,1	1,32	s, 3H	1,51
15	18,4	19,3	1,60	s, 3H	1,71

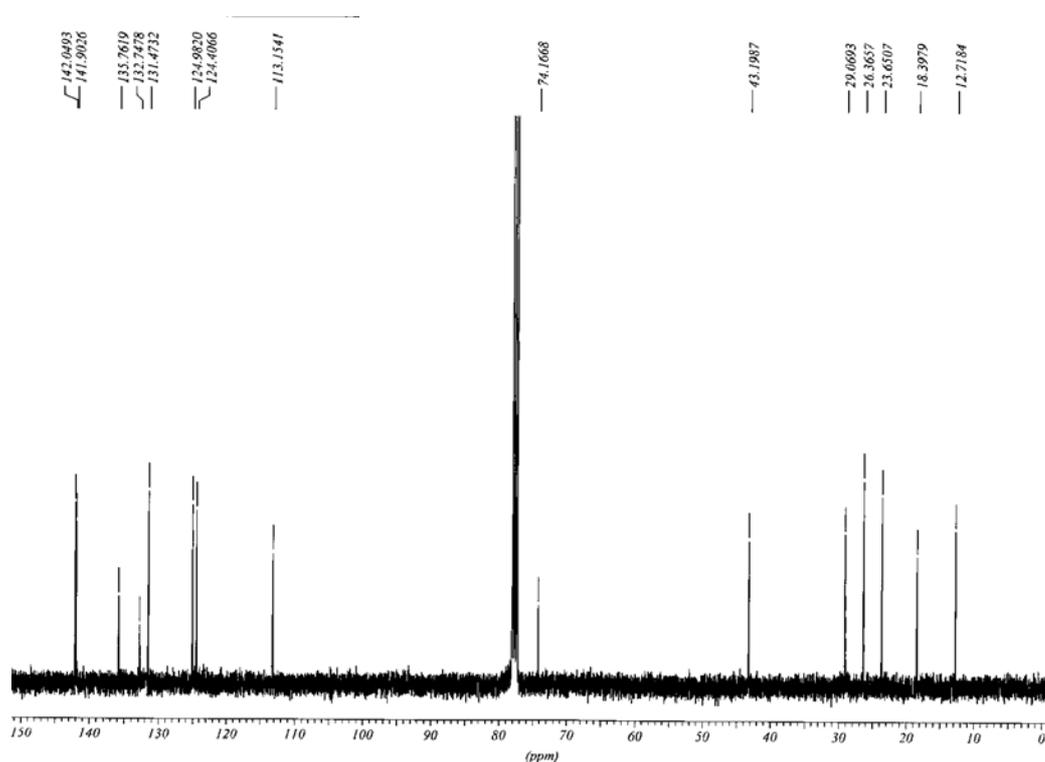


Abbildung 2-77: ^{13}C -NMR-Spektrum **45**.

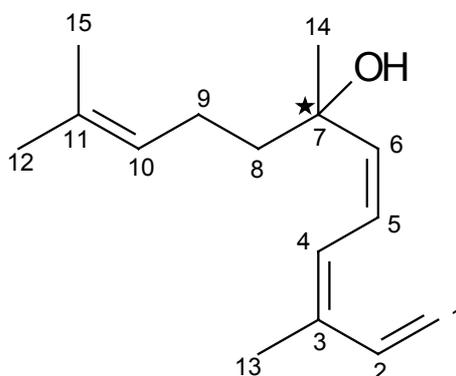


Abbildung 2-78: 7-Hydroxyfarnesen **45** mit stereochemischer *all-Z*-Orientierung.

Sechs C-Atome treten mit chemischen Verschiebungen bis 45 ppm im Hochfeld auf (**Abb. 2-77**). Es handelt sich dabei um Methyl- bzw. Methylengruppen ohne Doppelbindungen. Acht C-Atome wiesen eine starke Entschirmung mit chem. Verschiebung von 110-145 ppm auf. Dies ist charakteristisch für C-Atome mit (C=C)-Doppelbindung, wodurch sich zwangsläufig vier Doppelbindungen ergeben. Drei C-Atome mit 74,2, 135,8 und 132,7 MHz besaßen im zweidimensionalen HMQC keine Kopplung zu einem H-Atom, es handelt sich somit um quartäre C-Atome, wobei zwei als C=C vorliegen. Die chemische Verschiebung der C-Atome steht in sehr guter Übereinstimmung mit der Berechnung nach dem Inkrement-System (Hesse *et al.*, 2002). Nur das Atom C6 weicht erheblich von der

Modelrechnung ab. Das COSY-Kopplungsmuster der Protonen steht aber in guter Übereinstimmung mit der Position, so dass die Inkrement-Berechnung für dieses C-Atom nicht berücksichtigt wurde.

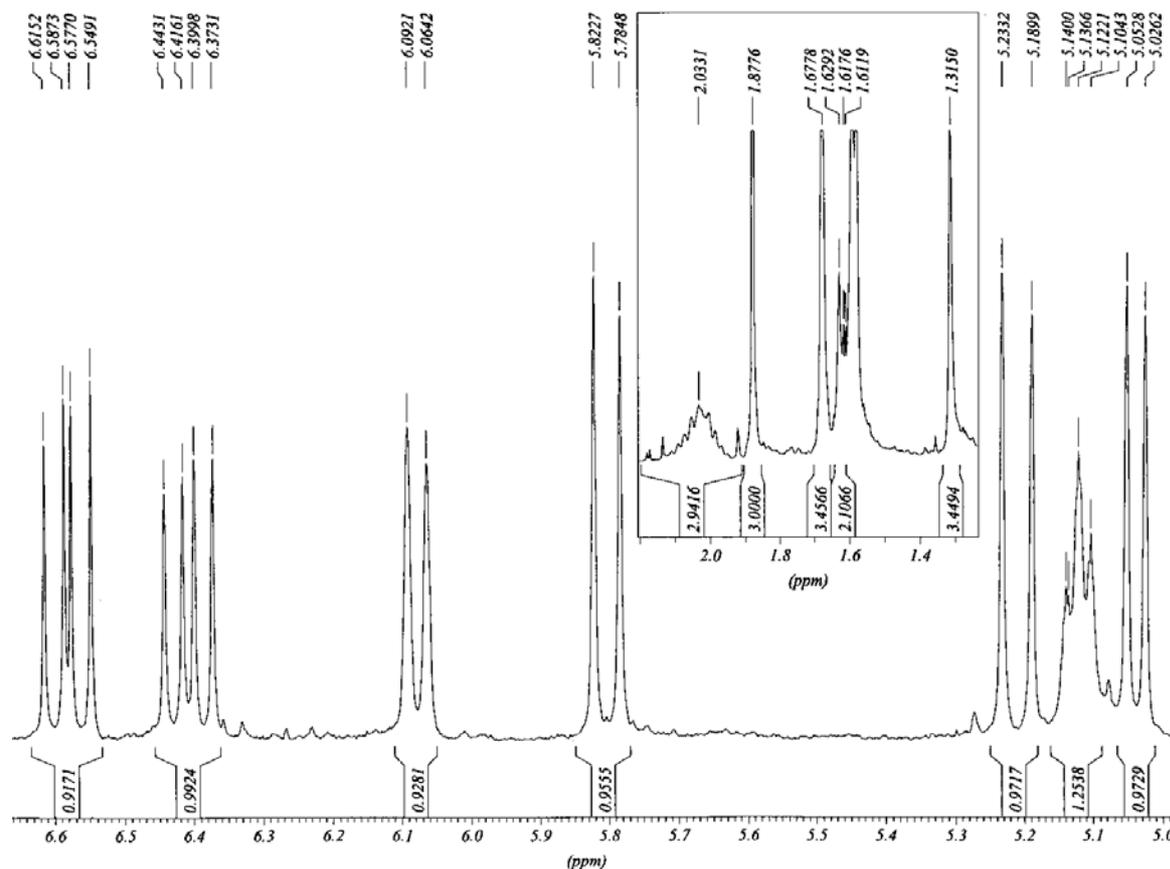


Abbildung 2-79: ^1H -NMR-Spektrum von **45**.

Die ^1H -Verschiebungen der Protonensignale wurden über ^1H , ^{13}C -spin-spin-Korrelation den jeweiligen C-Atomen zugeordnet, wobei die Integration (**Tab. 2-14; Abb 2-79**) die oben gezeigte Verteilung der Protonen widerspiegelt. Die Abfolge der Verschiebungen der Methylenprotonen im Tieffeld entspricht literaturbekannten Werten (Anet *et al.*, 1969). Folgende besondere Korrelationen konnten im ^1H , ^1H -COSY Spektrum ermittelt werden: Die Protonen des Atom C(1) korrelierten mit C(2), die Protonen von C(5) mit C(4) bzw. C(6) und die Protonen von C(9) mit C(8) und C(10). Im *long range* Bereich traten Korrelationen zwischen den Protonen von C(10) und C(12) bzw. C(15) auf, ebenfalls korrelierten die Protonen von C(4) mit C(13) (Drehsymmetrie). Die Unterscheidung der Signale von C(2) und C(5) konnte aufgrund der auftretenden Korrelation zum C(1) bzw. C(4) und C(6) durchgeführt werden.

Die Signale der Protonen von C(4) und C(6) unterschieden sich durch ihre Kopplungskonstante, die zwischen den Protonen von C(6) größer ist und deshalb eine Doppelbindung zum C(5) ergibt. Mit 11,1 Hz liegt am C(5) eine typische *E*-Kopplung zum

C(6) vor (Hensgartner, 1992). Die *long range* Kopplung J^4 der Protonen von C(4) zu C(13) beträgt 11 Hz. Da keine J^4 Kopplung vom Proton an C(4) zum Proton an C(2) vorliegt, muss die Bindung in Z konfiguriert sein.

Die Protonenverschiebungen an C4 und C6 wichen von der berechneten ab, die $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Korrelation konnte jedoch eindeutig zugeordnet werden. Das Massenspektrum des 7-Hydroxyfarnesens zeigt **Abb. 2-80**.

Abgrenzung zum 2,6,10-Trimethyl-dodeca-3,6,9,11-tetraen-2-ol und 3,7,11-Trimethyl-dodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol:

Die Abgrenzung war aufgrund sehr ähnlicher spektroskopischer Eigenschaften der oben genannten Verbindungen nötig. Die Veränderung des ^1H -NMR beruht auf der chemischen Umgebung von C(2) und C(8). Das 3,7,11-Trimethyl-1,4,6,10-dodecatetraen-3-ol (3,7,11-Trimethyl-dodeca-1,4,6,10-tetraen-3-ol) zeichnet sich durch eine Protonenverschiebung von 2,1 ppm für C(8) und von 5,99 ppm für C(2) aus, die von der umgelagerten Doppelbindung entschirmt bzw. der Hydroxygruppe abgeschirmt wird (Hengartner, 1992). Die Protonen am C(2) des 7-Hydroxyfarnesens lagen durch die Abschirmung der konjugierten Doppelbindung bei $\delta_{\text{H}} = 6,41$, die Protonen am C(8) bei $\delta_{\text{H}} = 1,62$. Beide Signale wichen somit deutlich voneinander ab.

Das 3,7,11-Trimethyl-1,3,6,9-dodecatetraen-11-ol (2,6,10-Trimethyl-dodeca-3,6,9,11-tetraen-2-ol) besitzt keine miteinander korrelierenden Protonen von Methylengruppen und ebenfalls stärker abgeschirmte Methylprotonen an C(12) und C(15) (Bohlmann *et al.*, 1980).

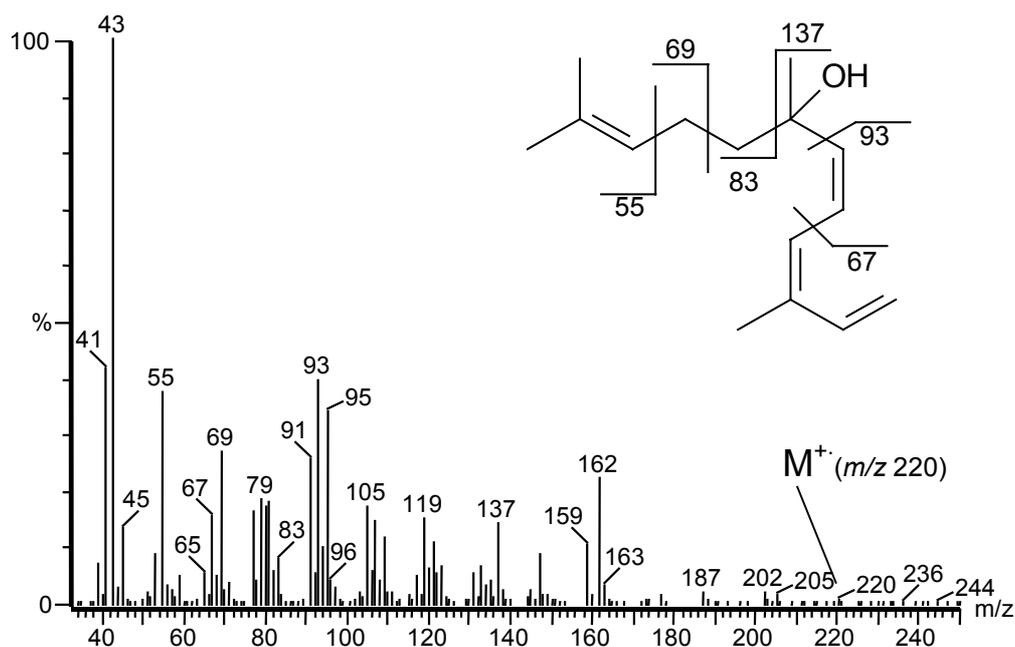


Abbildung 2-80: Massenspektrum von 7-Hydroxyfarnesen (45, EI, 70 eV).

2.4.5.2 Identifizierung weiterer Transformationsprodukte

Zur Untersuchung weiterer Transformationsprodukte wurden Extrakte aus der Transformation mit *C. globosum*, an Kieselgel fraktioniert, mit BSTFA in silylierte Derivate überführt und mittels MS-EI/CI untersucht.

Hierbei wurden die Proben insbesondere auf vorkommende Sinensale (β -Sinensal KI 2219, α -Sinensal KI 2324 auf polarer Phase, CW 20M) untersucht. Als Referenz dienten die in Orangenschalenöl vorkommenden natürlichen Sinensale. Diese waren in keinem Extrakt des Screenings nachzuweisen. Die in 2.4.4 aufgeführten Oxidationsprodukte KI 2250 und KI 2280 entstanden durch Autoxidation von Farnesen. Die Verbindungen mit dem Kovats Indices von KI 2055 und 2356 (CW 20M) besaßen jeweils eine Molekülmasse von 220. Hierbei handelt es sich um Monoole oder Epoxide des Farnesens. Eine Strukturaufklärung bezüglich der Identifizierung funktioneller Gruppen wurde teilweise durch Silylierung durchgeführt, wodurch Monoole, Diole und Triole anhand der Molekülmasse von m/z 292, 380 und 468 nachgewiesen wurden (**Tab. 2-15**).

Tabelle 2-15: Bestimmung der silylierten Transformationsprodukte von *C. globosum* nach 96 h Transformationszeit mit Struktureigenschaften, (die angegebenen Mengen beziehen sich auf die Transformation nach 48 h, ¹Masse mit silylierten Hydroxyfunktionen).

KI (DB 5)	m/z [M^+]	Gehalt / [$mg\ L^{-1}$]	Ausbeute / [%]	Struktureigenschaften
1657	220	99,1	2,0	7-Hydroxyfarnesen (45)
1839	292 ¹	30,8	0,6	9-Hydroxyfarnesen (46)
2043	328	22,4	0,4	?
2089	380 ¹	< 5	< 0,1	Diol
2202	380 ¹	77,7	1,6	Diol
2209	380 ¹	31,9	0,6	Diol
2266	380 ¹	~ 5	0,1	Diol
2355	380 ¹	5,2	0,1	Diol
2515	390	18,7	0,4	?
2752	408	53,3	1,1	?
> 2800	468 ¹	12,6	0,3	Trihydroxyfarnesen (47)

Das Massenspektrum von **46** zeigt **Abb. 2-81**. Für die Verbindung wurde ein Hydroxyfarnesen bestimmt, die Position der Hydroxygruppe wurde anhand des Fragmentierungsmusters abgeleitet (3.2.6). Die Intensität des Molekülions war im EI sehr gering und wurde durch die Abspaltung einer Methylgruppe zum Fragment m/z 277 und über CI identifiziert. Das vorliegende 9-Hydroxyfarnesen (2,6,10-Trimethyl-dodeca-3,6,9,11-tetraen-2-ol; CAS unbekannt) zeigte eine massenspektroskopische Fragmentierung an der

α -Position der Alkoholgruppe und lieferte dabei die intensitätsstarken Fragmente m/z 157 und 55. Der Zerfall des Ions m/z 157 führte zu den Ionen 41 und 93. Die Abspaltung der silylierten Alkoholfunktion ergab das Fragment 73. Es handelte sich hierbei um eine erstmals beschriebene Verbindung.

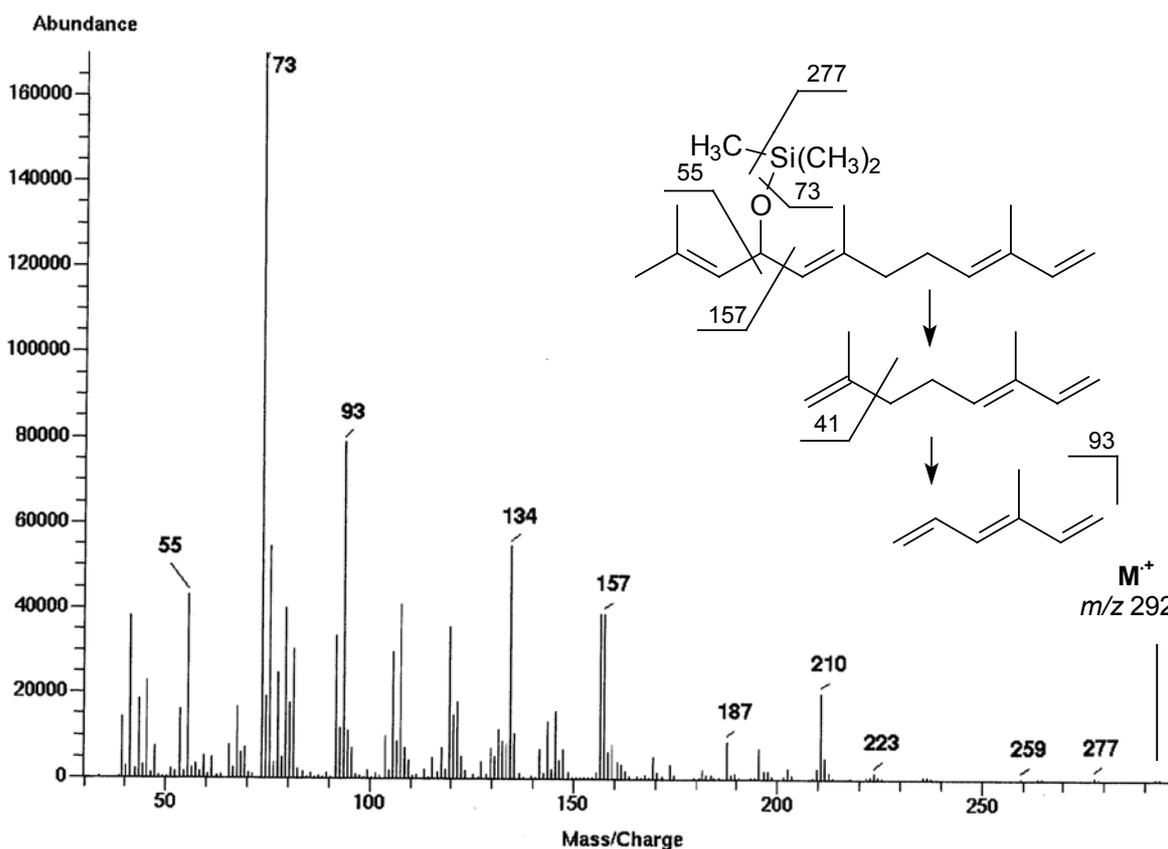


Abbildung 2-81: Massenspektrum von **46** im silylierten Zustand mit Fragmentierung.

Verbindung **47** wurde aufgrund der Molekülmasse von m/z 468 einem dreifach silylierten Triol zugeordnet (**Abb. 2-82**). Das Triol besaß eine Hydroxyfunktion am C-Atom 11. Dies wurde aus den entstehenden intensiven Fragmenten m/z 131 und 337 nach α -Spaltung festgestellt. Die anderen Positionen der Hydroxyfunktionen konnten nicht ermittelt werden. Vorgeschlagene Fragmentierungsmechanismen sowie die Spaltung zu geradzahigen Fragmentationen sind 3.2.6 zu entnehmen. Für weitere Oxidationsprodukte wurde keine Strukturaufklärung durchgeführt, da die massenspektroskopische Untersuchung aufgrund starker Molekülfragmentierung sehr komplex war. Zur Identifizierung müssten die entstandenen Sesquiterpenoide isoliert und kernresonanzspektroskopisch untersucht werden, was im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Diese aufwendige Vorgehensweise wurde unterlassen, da alle Oxidationsprodukte mit mehr als einem eingeführten Sauerstoff sensorisch nicht mehr relevant waren.

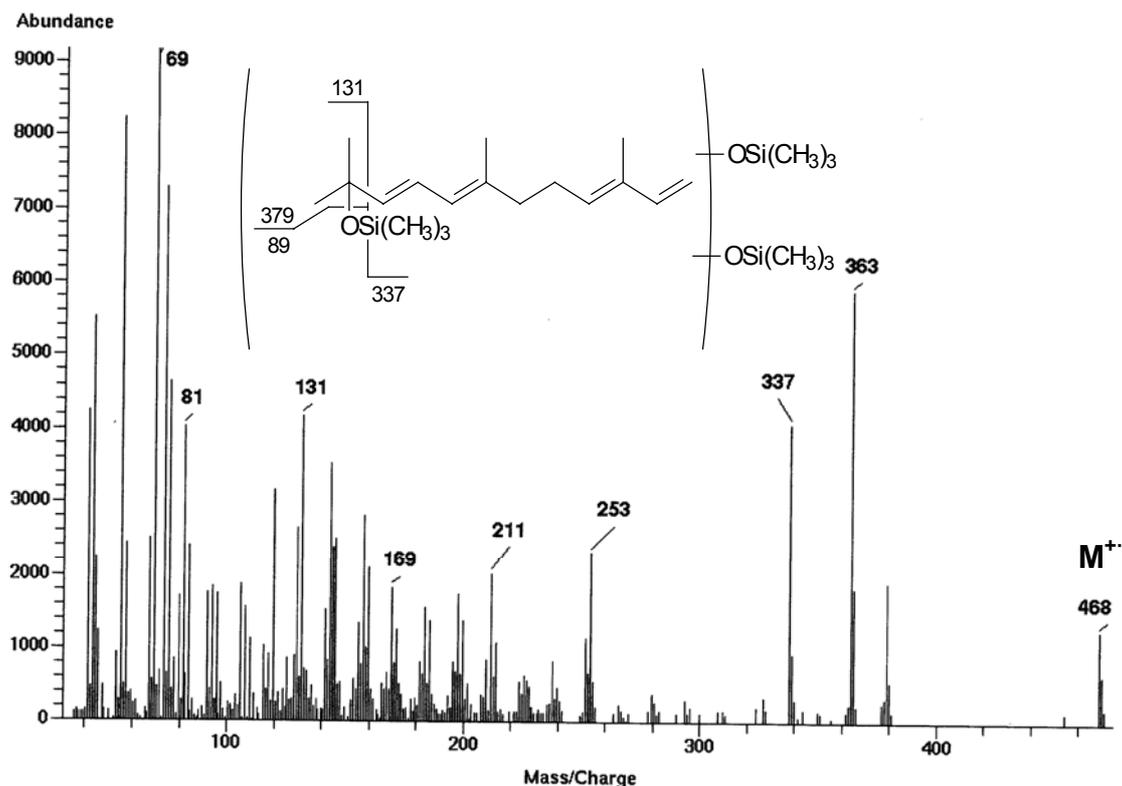


Abbildung 2-82: Massenspektrum von **47** im silylierten Zustand mit charakteristischen Fragmenten.

2.4.6 Farnesentransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen

Die Transformation wurde analog zur Limonen- und Valencentransformation durchgeführt (5.4.1). Es wurde 27,4 mM (+)-Farnesen zugegeben. Eine vollständige Aufführung der Ergebnisse der untersuchten Kulturen ist **Tab. 2-16** zu entnehmen.

Tabelle 2-16: Terpententransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen in MOPS-Puffer (Substratdosierung 27,4 mM; Transformationszeit 24 h; Gehalte in mg L⁻¹, In.: induzierte Kultur, CGL: *Chaetomium globosum*, PCH: *Phanerochaete chrysosporium*, MP: Isolat, POS: *Pleurotus ostreatus*, PSA: *Pleurotus sapidus*).

Produkt	PSA	PSA, In.	CGL	CGL, In.	PCH	PCH, In.	POS	POS, In.	MP	MP, In.
KI 2032 (CW 20M)	12,9	8,2	0	0	0,5	8,5	4,0	16,5	10,9	11,5
7-Hydroxy-farnesen	11,9	6,7	0	36,2	1,5	16,1	9,0	25,2	18,1	15,3
KI 2250 (CW 20M)	1,9	1,0	0	0	0,0	1,6	1,1	1,1	5,4	7,4
KI 2280 (CW 20M)	5,1	3,0	0	0	0,5	2,8	2,5	4,3	2,6	3,1
KI 2356 (CW 20M)	5,6	3,7	0	0	0,6	1,2	3,6	7,0	7,7	11,1

Kulturen, die in Biokonzentraten Farnesen oxidierten, zeigten nach Lyophilisierung eine wesentlich geringere Produktbildung (z.B. *Chaetomium globosum*). Ebenfalls trat für *Chaetomium* eine wesentlich höhere Selektivität auf, da das Oxidationsprodukt 7-Hydroxyfarnesen fast ausschließlich entstand. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass der Nachweis der Bildung mehrfach oxidierter Verbindungen wie Diole und Triole nicht durchgeführt wurde.

Teilzusammenfassung von 2.4:

- Das Sesquiterpen Farnesen wurde mit ausgewählten Pilzen zu aromaaktiven Verbindungen mit orangen- bis citrus-artigem Geruchseindruck oxyfunktionalisiert. Dabei traten Maximalkonzentrationen von 60 mg L^{-1} unter Screeningbedingungen auf.
- Das sensorisch interessante Oxidationsprodukt 7-Hydroxyfarnesen wurde von *Chaetomium globosum* bis zu 170 mg L^{-1} innerhalb von 23 h gebildet, isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert. Der Geruchseindruck wurde mit blumig bis orangenartig beschrieben.
- Als weiteres Oxidationsprodukt wurde ein 9-Hydroxyfarnesen erstmals massenspektroskopisch identifiziert. Sensorisch nicht interessante Monoole, Diole und Triole wurden durch Derivatisierung partiell identifiziert.
- Die Farnesentransformation mit Lyophilisaten ausgewählter Kulturen zeigte ebenfalls eine Bildung von Oxidationsprodukten, jedoch keine höheren Ausbeuten als in der Transformation mit konzentrierten Kulturen.

3 Diskussion

3.1 Biosynthese und Bedeutung von Mono- und Sesquiterpenoiden

Die Biosynthese von Mono- und Sesquiterpene kann von allen höheren Lebewesen durchgeführt werden (Luckner, 1990; Manitto, 1980). Durch den Nachweis von isoprenen Kohlenwasserstoffen (Pristan und Phytan) in Sedimenten ist wahrscheinlich, dass isoprenoide Verbindungen als Bausteine des Chlorophylls bereits vor 3 Milliarden Jahren gebildet werden konnten (Nuhn, 1997). Dabei ist eine Biosynthese über den Mevalonsäure-Weg und über einen Mevalonat-unabhängigen Anabolismus möglich (Wise und Croteau, 1999).

3.1.1 Biosynthese der Isoprengrundbausteine

Ausgehend vom AcetylCoA entsteht durch nucleophilen Angriff am C2 über das Acetoacetyl-CoA und 3-Hydroxy-3-methylglutarylCoA die Mevalonsäure als C-6-Körper (**Abb. 3-1**). Diese wird durch zweimalige Phosphorylierung mit ATP in das Mevalonsäurediphosphat überführt, aus dem durch Decarboxylierung und Dehydratisierung die Grundbausteine Isopentenylidiphosphat und durch Isomerisierung das Dimethylallyldiphosphat gebildet werden. Aus diesen isoprenoiden C5-Bausteinen können die Terpene abgeleitet werden (Dewick *et al.*, 1998; Ruzicka 1953), wobei die für die Arbeit relevanten Mono- und Sesquiterpene über die Kondensation von zwei C5-Einheiten zum Geranylidiphosphat (C10) bzw. drei C5-Einheiten zum Farnesylidiphosphat (C15) entstehen.

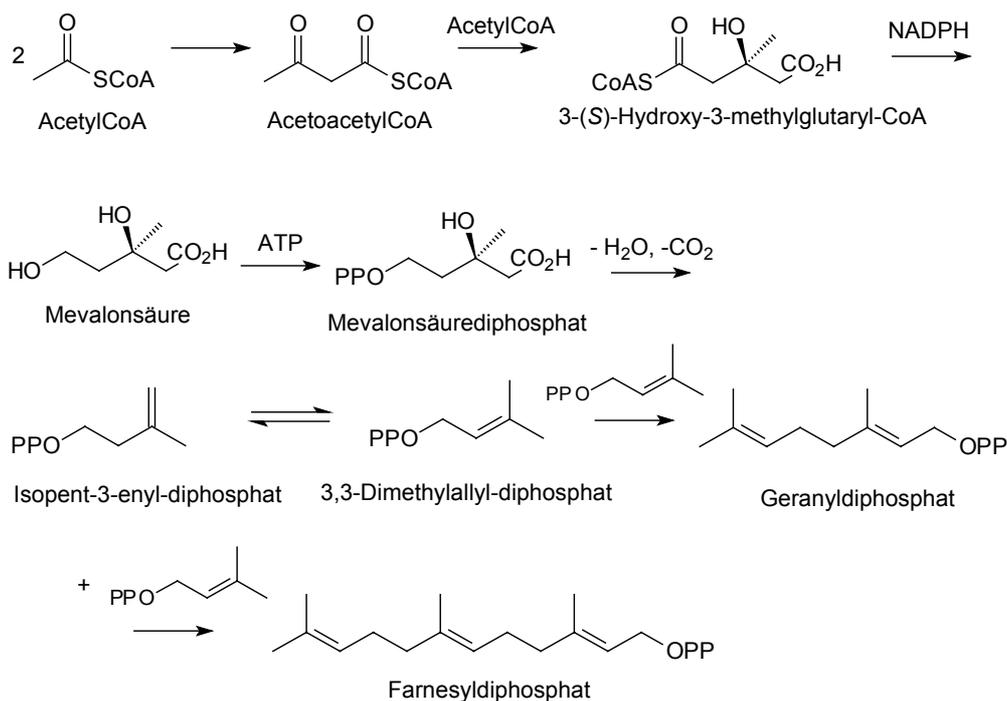


Abbildung 3-1: Biosynthese der Mono- und Sesquiterpene über den Mevalonat-Weg (Cane, 1999).

3.1.2 Cyclisierungsmechanismen

Das cyclische Monoterpen Limonen entsteht durch intramolekulare Cyclisierung der C-Atome 1 und 6 des Geranyldiphosphates. Anschließend erfolgt eine Deprotonierung des intermediären α -Terpenylkation (p-Menthenyl-Kation) an C-Atom 9 (Wise und Croteau, 1999; **Abb. 3-2**).

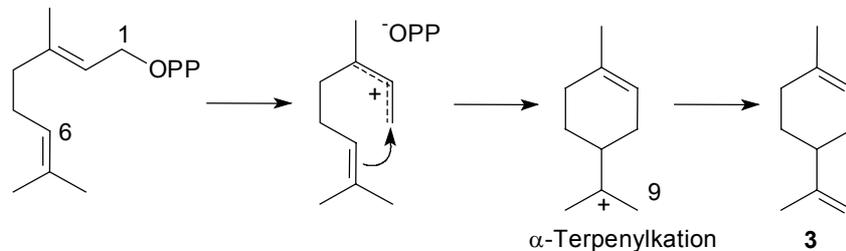


Abbildung 3-2: Biosynthese des Limonen (**3**) über das intermediäre α -Terpenylkation (Wise und Croteau, 1999).

Sesquiterpene werden im Allgemeinen vom Farnesyldiphosphat (C15) abgeleitet. Das cyclische Sesquiterpen (+)-Valencen gehört zu der Strukturgruppe der Eremophilane (IUPAC-Grundstruktur; Gilles, 1999), wobei die stereochemische Orientierung an C-Atom 4 und 5 entgegengesetzt zum Eremophilan orientiert ist. Es wird wahrscheinlich in Analogie zur Entstehung des Aristolochens über die intramolekulare Cyclisierung des C-Atoms 1 mit dem C-Atom 10 und nachfolgender Isomerisierung der Doppelbindung unter Einbeziehung eines Methyl-Shift gebildet (Cane *et al.*, 1999; **Abb. 3-3**). Hierbei führt eine Verlagerung der intramolekularen C-C-Verknüpfung zur Bildung von bicyclischen strukturisomeren (Valencen C-Atom 5 und C10, **29**; Cadinen C1 und C6, **48**). Das acyclische Sesquiterpen Farnesen kann direkt aus dem Farnesyldiphosphat durch Dephosphorylierung abgeleitet werden (**Abb. 3-1**; Crock *et al.*, 1997).

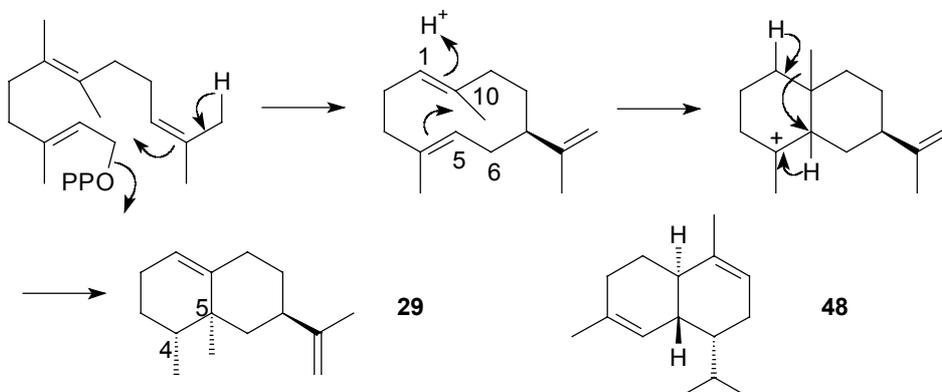


Abbildung 3-3: Biosynthese des Sesquiterpens (+)-Valencen (in Anlehnung an Cane *et al.*, 1999).

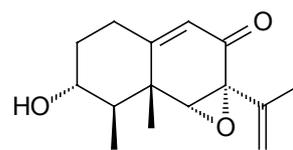
3.1.3 Physiologische Bedeutung von natürlichen Sesquiterpenoiden

Monoterpenoide können von Pilzen synthetisiert werden (Janssens *et al.*, 1992; Sunesson *et al.*, 1997). Ebenfalls können Sesquiterpene von Pilzen biosynthetisiert werden und stehen teilweise in engem Zusammenhang mit der Genese von Mycotoxinen.

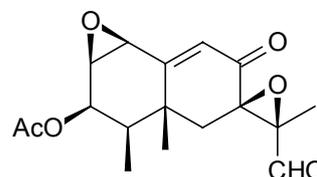
Einige Ascomyceten, Basidiomyceten und auch Hefen bilden sesquiterpenoide Aromastoffe. Die Sesquiterpenoide Dihydrofarnesol und Farnesol werden z.B. von *Ceratocystis coerulescens* und von *Saccharomyces cerevisiae* synthetisiert (Janssens *et al.*, 1992). Farnesen ist eine der Hauptkomponenten der flüchtigen Verbindungen, die von *Fusarium sambucinum* gebildet werden. Dieser Lebensmittelverderber ist ebenfalls für die Genese von Trichothecenen, einer Gruppe von Mycotoxine, bekannt (Jelen *et al.*, 1995). Farnesol leitet sich aus Farnesylphosphat, dem Grundbaustein für die Synthese von weiteren Sesquiterpenoiden, ab.

Die Wirkungen der Mono- und Sesquiterpenoide sind vielfältig. Neben der Aromawirksamkeit sind sie auch pharmazeutisch interessant, wobei viele Wirkungen, insbesondere in Pflanzenextrakten, Gegenstand der Grundlagenforschung sind (Grassmann *et al.*, 2002; Myers, 1999; Griffin *et al.*, 1999; Sime *et al.*, 2000). Sie stellen z.B. pflanzliche Abwehrstoffe gegen mikrobielle Invasoren dar. Sesquiterpenoide Sekundärmetaboliten aus Pilzen können pharmakorelevante Eigenschaften wie hormonelle, cytotoxische, phytotoxische, immunosuppressive, antivirale, antibiotische und antimykotische Wirkungen besitzen (Cane, 1999; Cutler, 1995). Die Pilztoxine Sporogen-AO, PR-Toxin und Aristolochen haben eine dem (+)-Valencen sehr ähnliche Struktur (**Abb. 3-4**). Dies lässt darauf schließen, dass verschiedene Pilze Sesquiterpene bilden und modifizieren können.

Sporogen-AO 1 aus *Aspergillus oryzae*



PR-Toxin aus *Penicillium roqueforti*



Aristolochen

Aspergillus terreus

Termitengift

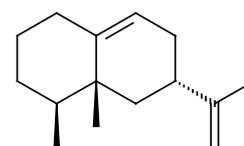


Abbildung 3-4: Physiologisch wirksame Sesquiterpene mit Eremophilangerüst (Cane, 1999).

3.1.4 Terpene als charakteristische Aromastoffe (character-impact-compounds)

Terpene werden aufgrund ihrer Geruchs-, Geschmacks- und physiologischen Aktivität von der Industrie in einer Vielzahl von Produkten wie Lebensmittel, Kosmetika, Haushalts- und pharmazeutische Mittel verwendet.

Zahlreiche Aroma- und Riechstoffe können vom Monoterpen *R*-(+)-Limonen abgeleitet werden. Die bekanntesten Vertreter stellen *R*-(-)-Carvon (Minzaroma) und *S*-(+)-Carvon (Kümmelaroma) dar, ein typisches Beispiel für die Abhängigkeit eines Geruchseindrucks von der Stereochemie eines Moleküls. Neben diesen Carbonylen sind auch Terpenalkohole wie z.B. α -Terpineol mit einem fliederartigen Geruch aromawirksam. Die Strukturisomere des Linallooxids (Furanoide und Pyranoide) besitzen ein lavendelartiges Aroma und werden in Parfümen verwendet (Schrader und Berger, 2001). Weitere terpene Aromastoffe sind **Tab. 3-1** zu entnehmen.

Das bicyclische Sesquiterpenoid (+)-Nootkaton kommt als ein typischer Aromastoff in den Schalenölen vieler Zitrusfrüchte vor. (+)-Nootkaton wurde zuerst in der Scheinzypresse *Chamaecyparis nootkatensis* entdeckt (Erdtmann und Hirose, 1962; MacLeod und Buigues, 1964). Es ist in äußerst geringen Mengen als citrusartig, nach Pampelmuse riechend wahrnehmbar (**Tab. 3-1**) und hat einen bitteren Geschmack. Neben dem hochpotenten *p*-Menth-1-en-8-thiol ist es die für das Aroma der Pampelmuse (*Citrus paradisi*) hauptverantwortliche Verbindung. Nootkaton findet unter anderem auch als Insektenrepellent Anwendung (Maupin, 2002). Zusätzlich sind im Pampelmusenöl weitere sesquiterpenoide Verbindungen wie Eremophilane und Eudesmane mit einem Gehalt von 0,5% zu finden (Ohloff, 1995). Das synthetische Isomer (-)-Nootkaton ist mit einem Geruchsschwellenwert von 1 mg L⁻¹ wesentlich weniger aromawirksam als das (+)-Nootkaton und besitzt einen holzigen Geruchseindruck.

Farnesen ist ebenfalls in fast allen Schalenölen zu finden. Das physiologisch bedeutende Isomer (*E*)- β -Farnesen ist ein in Pflanzen und Tieren weit verbreitetes Alarm- und Lockpheromon (Crock *et al.*, 1997). Es wurde zunächst in Hopfen und Äpfel gefunden und hat offensichtlich eine besondere Bedeutung in der Komposition von Apfelaroma. Das terminale Oxidationsprodukt α -Sinensal ist *flavour impact compound* für Orangen- und Mandarinenaroma und ist das Sesquiterpenoid mit der geringsten bisher bekannten Geruchsschwelle. Dagegen hat das β -Sinensal eine eher metallisch fischige Aromanote und ist für Fehlgerüche verantwortlich.

Das Biotransformationsprodukt Valencen-11,12-epoxid (2.3.4) wurde erstmals von Maupin (2002) identifiziert. Es wurde aus dem Öl der „Alaska Yellow Cedar“ (*Chamaecyparis*

nootkatensis) isoliert und wirkt als Insektenrepellent. Es ist als Inhaltsstoff von nativem Pampelmusenöl nicht bekannt.

Das Nootkaton-11,12-epoxid wurde als Metabolit im Urin nach dem Konsum von Grapefruitsaft entdeckt. Es wurde von Sesquiterpenen begleitet, die als Glucuronide vorlagen (Chayen *et al.*, 1988). Es entsteht ebenfalls photochemisch nach Bestrahlung von Nootkaton mit UV-Licht (Tateba *et al.*, 1992). Wie auch das Valencen-11,12-epoxid ist es als Insektenrepellent wirksam (Maupin *et al.*, 2002).

Das identifizierte 7-Hydroxyfarnesen (**45**, 2.4.5.1) ist ein bekannter Naturstoff, der aus der unpolaren Fraktion der Inhaltsstoffe der Gattung *Critoniella* (Asteraceae) isoliert wurde (Bussmann, 1999; Bohlmann, 1984). Während der Reife von Früchten, wie Äpfel, Quitten und Birnen, entsteht der Terpenalkohol als Abbauprodukt von Farnesen, das ein natürlicher Bestandteil von Schalenwachsen darstellt. Untersucht wurde das 7-Hydroxyfarnesen speziell als Produkt, das bei der Lagerung dieser Früchte bei tiefen Temperaturen um den Gefrierpunkt auftrat. Der Gehalt an Farnesen steigt während der Kühlung, wodurch insbesondere Terpene auf Oberflächen durch den Kontakt mit Luftsauerstoff leicht oxidieren. Somit stellt es unter bestimmten Bedingungen ein Autoxidationsprodukt dar, wie es auch bei anderen Terpenen bekannt ist. Die Oxidation von Farnesen in Lösung dagegen verläuft wesentlich langsamer (Anet, 1969), wie auch Versuche zur Autoxidation im Medium zeigten (2.3.1). Aus den Schalenwachsen wurde eine Vielzahl von Farnesenoxidaionsprodukten wie Epoxide, Diepoxide, Hydroxide und Dirole sowie Peroxide und Peroxidether festgestellt (Spicer, 1993).

Hensgartner *et al.* (1992) nutzen das 3,7,11-Trimethyl-1,3,5,10-dodecatetraen-7-ol als Vorstufe zur Synthese und Identifizierung von Carotinoiden, wie (all-E)-12'-Apo- ψ -caroten-12'-al, (5Z,5'Z)-Lycopene und (9Z, 9'Z)-Lycopene. So kann das Hydroxyfarnesen als leicht zugänglicher Synthesebaustein Verwendung finden. Das 3,7,11-Trimethyl-1,4,6,10-dodecatetraen-3-ol ist Bestandteil der Wurzeln von *Austroeupatorium chaparense*, ein Vertreter der Familie Asteraceae. Die Farnesenderivate werden hier zur phylogenetischen Einordnung der Pflanzen verwendet (Bohlmann, 1980).

Tabelle 3-1: Vorkommen und Geruchsschwellen von Aromaverbindungen, die sich aus Limonen, Valencen und Farnesen ableiten lassen, in Zitrusfrüchten und Gewürzen (Ohloff, 1994; Belitz *et al.* 2001; Rychlik *et al.* 1998; Falbe *et al.*, 1995).

Terpenoid	Vorkommen	Gehalt im jeweiligen Öl in %	Geruchsschwelle in $\mu\text{g kg}^{-1}$	Geruchseindruck
Monoterpenoide				
R(-)-Carvon	Minzöl (<i>Mentha spicata</i> L.)	bis 60	50	Minze
S-(+)-Carvon	Kümmelöl (<i>Carum carvi</i> L.)	bis 70	50	Kümmel
(+)-Pulegon	Penny royal oil (<i>Mentha pulegium</i> L.)	bis 90	-	Minze, krautig
(-)-Piperiton	Öl aus <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	bis 50	-	Minze
(-)- α -Terpineol	Limettenöl, destilliert; Pfirsich	6-9	350	Flieder/Pfirsich
1,8-Cineol	Öl aus <i>Eucalyptus globules</i> Labill.	bis 50	1,3	frisch, kühl, Campher
p-Menth-1-en-8-thiol	Pampelmuse (<i>Citrus paradisi</i> L.)	$0,1 \cdot 10^{-6}$	0,001	Grapefruit
Perillaaldehyd	Pampelmuse (<i>Citrus paradisi</i> L.)	0,2	-	Kirsche, grün
Isopiperitenon	Minze, Eucalyptus	55	-	Minze, kühl
Terpinen-4-ol	Limettenöl (<i>Citrus aurantifolia</i> C. & P.)	0,7-1,6	295-1180 ng L^{-1} (Luft)	Muskat, holzig, erdig
Linalooloxide	Pampelmusensaft, Lavendel	12,6	-	erdig, blumig, Bergamotte
Sesquiterpenoide				
(+)-Nootkaton	Pampelmuse, Schalenöl	0,5-1,8	1	Grapefruit
(-)-Nootkaton	synthetisch	-	1000	holzig
Farnesol	Blütenöle (Rose, Jasmin, etc.)	1,2	200	mild, süß-ölig, grün
α -Sinensal	Mandarinenöl, Orangenöl	0,2	0,05	Orange
β -Sinensal	Mandarinenöl (<i>Citrus reticulata</i> B.)	0,2	-	metallisch-fischig

3.2 Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen

3.2.1 Vorteile der Aromenherstellung durch Biotransformation

Die Kenntnis von neuen pharmakologischen Wirkungen und die Beliebtheit als Aromastoffe (3.1.3) ließen den Bedarf an Terpenen und Terpenoiden auf dem Weltmarkt in den letzten Jahren steigen. Die Isolierung und Gewinnung einzelner terpenoider Aromastoffe durch Extraktion von Pflanzenteilen ist kostenintensiv, da zum einen der Anteil an essentiellen Ölen, die für die Gewinnung von Terpenoiden zur Verfügung stehen, in den entsprechenden Pflanzen weniger als 5% beträgt. Zum anderen ist die Zusammensetzung etherischer Öle sehr komplex und eine Aufreinigung und Isolierung einzelner Verbindungen schwierig. Da die extraktive Gewinnung den Weltbedarf an Terpenoiden nicht decken kann, müssen deshalb chemische Synthesen verwendet werden.

Die Aromenindustrie hat ein verstärktes Interesse, die verwendeten chemischen Synthesen, oft aus mehreren komplexen Stufen bestehend, durch biotechnologische Herstellungsverfahren zu ersetzen. Neben der dadurch erreichten verbesserten Verbraucherakzeptanz („Natürlichkeit“ siehe Einleitung) besitzt die biokatalytische Oxyfunktionalisierung von Terpenen zu Terpenoiden weitere Vorteile. Eine hohe Produktreinheit mit wenigen Nebenprodukten kann durch eine hohe Chemo-, Regio- und Stereospezifität der Bildungsreaktionen erreicht werden. Es können inerte C-Atome selektiv angegriffen werden, die nur schwer durch chemische Synthesen funktionalisiert werden können. Da das Medium, in dem der aktive Organismus kultiviert und in dem nachfolgend die Biotransformation durchgeführt wird, überwiegend wässrig ist, stellt die Biokatalyse eine ökonomisch wie auch ökologisch akzeptablere Synthese dar. Ebenfalls wird unter milden Reaktionsbedingungen gearbeitet. Regenerierbare Rohstoffe können zum Einsatz kommen. Mehrstufige Chemosynthesen können so durch eine einstufige Biotransformation (*Biokonversion*) ersetzt werden.

Mittlerweile ist eine Vielzahl an Bakterien, Hefen und höheren Pilzen bekannt, die Terpenkohlenwasserstoffe zu einer Reihe von kommerziell interessanten Verbindungen oxidieren. Mit molekularbiologischen Methoden wurden in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte erzielt. So gelang mit der Klonierung des gesamten Limonenabbauweges aus *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli* die Limonentransformation zu Carvon, α -Terpineol und Perillasäure (Oriel *et al.*, 1997; Savithiry *et al.*, 1997). Ebenfalls wurden Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus *Mentha spec.*, die die stereoselektive Hydroxylierung von Limonen zu Carveol ermöglichen, erfolgreich in Expressionssysteme kloniert und sezerniert (Lupien *et al.*, 1999; Haudenschild *et al.*, 2000). Eine Aufklärung der Terpensynthesen im Anabolismus der Pflanzen ist erfolgt (Wise und Croteau, 1999; Cane, 1999). Hohe und industriell relevante

Ausbeuten wurden für die regioselektive Herstellung von Perillasäure (**47**) mit *Pseudomonas putida* (3 g L⁻¹ Kulturmedium, 48 h; Speelmans *et al.*, 1998) und von α -Terpineol (**9**, 3,2 g L⁻¹, 96 h, Tan *et al.*, 1998; Tan und Day, 1998b) erreicht (**Abb. 3-5**).

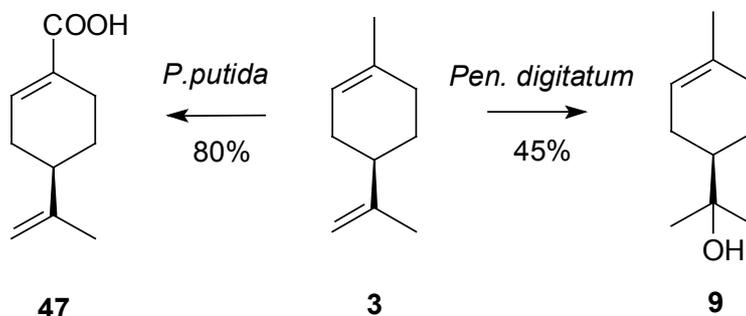


Abbildung 3-5: Biotransformation von *R*-(+)-Limonen (**3**) zu Perillasäure (**47**) und α -Terpineol (**9**) mit molaren Ausbeuten bezüglich **3**.

3.2.2 Rohstoffquellen

Für Terpenbiotransformationen werden preisgünstige und leicht verfügbare Substrate benötigt, die zu hochwertigen Aromastoffen umgesetzt werden sollen. Monoterpene wie *R*-(+)-Limonen und α -Pinen sind mit einem Gehalt von mehr als 90% Hauptbestandteile von Orangen- oder Pinienöl. *R*-(+)-Limonen fällt als Nebenprodukt in der Citrus-Industrie in Mengen von 100.000 t pro Jahr an (Ziegler, 1998) und ist neben α -Pinen ein kostengünstiges und leicht verfügbares Terpen natürlichen Ursprungs (Duetz *et al.*, 2001). Es wird durch fraktionierte Destillation gewonnen. Dagegen sind die Konzentrationen von Sesquiterpenen in essentiellen Ölen wesentlich geringer. Pampelmusenöl ist bekannt für seinen relativ hohen Sesquiterpenanteil von bis zu 1%. Es wird in Mengen um 30 t pro Jahr produziert, wobei die Produktion aufgrund zunehmender Nachfrage ansteigt. Aus ihm, wie auch aus dem Öl der Valencia-Orangen, kann (+)-Valencen (**Tab. 3-2**) gewonnen werden (Ohloff, 1994). Mandarinenöl wird in Mengen um bis zu 120 t pro Jahr produziert und dient als Lieferant für Farnesenisomere. Die Synthese aus diesen eher schwer zugänglichen, natürlichen Precursoren lohnt sich jedoch allein durch die zu erzielende Wertschöpfung bei der Genese hochwertiger Aromastoffe.

Einfache Terpenkohlenwasserstoffe wie *R*-(+)-Limonen sind für \$ 1-2 kg⁻¹ auf dem Weltmarkt zu erhalten (Duetz *et al.*, 2003). Die Preise für aromaaktive Limonenoxidationsprodukte wie z.B. Carvon liegen bei \$ 30-60 kg⁻¹, für Perillaalkohol mindestens um das zehnfache und für sensorisch aktive Sesquiterpenoide um den Faktor 100-1000 höher (Handelspreise).

Tabelle 3-2: Terpenkohlenwasserstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen (Ohloff, 1994).

Terpen	Ursprung	Bestandteil
R-(+)-Limonen	Orangenöl (<i>Citrus sinensis</i> L.)	bis 97%
S-(-)-Limonen	Weißtannenöl (<i>Abies alba</i> Mill.)	bis 90%
(+)-Valencen	Orangenöl (<i>Citrus sinensis</i> L.) und Pampelmusenöl (<i>Citrus paradisi</i> L.)	0,4%
Farnesen	Mandarinenöl (<i>Citrus reticulata</i> Blanco L.)	0,1%

3.2.3 Auswahl von Biokatalysatoren

Bei der Auswahl von Katalysesystemen stehen neben rein enzymatischen Umsetzungen vitale oder avitale Zellsysteme zur Verfügung. Vitale Zellen besitzen dabei den Vorteil, dass sie mit einfachen Nährmedien versorgt werden können, während Enzyme und avitale Zellen bestimmte (Co-)Substrate benötigen. Ein großer Nachteil der vitalen Zellen bildet jedoch die Komplexität des Systems und die weitergehende Metabolisierung der erwünschten Produkte durch viele Enzymaktivitäten (3.2.4). So werden je nach Kultivierungsmethode und Stamm verschiedene Metabolite im Laufe der Kultivierungszeiten gebildet und wieder abgebaut (Zeitprofile).

Eukaryontische Zellen wie Pilze (z.B. Basidiomyceten) zeigen komplexe Generationszyklen und einen wesentlich weiter entwickelten Metabolismus (Sitte *et al.*, 2002). Durch ihr natürliches Habitat, dem Wachstum auf Bäumen oder Unterholz, und ihre biologische Funktion als Destruenten ist ihre Enzymausstattung stark auf den oxidativen Abbau von komplexen polymeren Naturstoffen wie Cellulose und Lignin ausgerichtet. Die Redoxpotentiale von Cytochrom-P450 Monooxygenasen aus *Pleurotes ostreatus* reichen sogar für die Epoxidierung des persistenten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Phenanthren aus (Bezalel *et al.*, 1997).

Ein Nachteil von Pilzen im Gegensatz zu Bakterien ist die lange Kultivierungszeit im Bioprozess. Während bakterielle Transformationen in Stunden durchgeführt werden, betragen die Kultivierungszeiten für Basidiomyceten bis zu einer Woche. Eine Kultivierung von Pilzen in Bioreaktoren stößt aufgrund der Morphologie auf Schwierigkeiten, da verschiedene Arten wie *Chaetomium* oder *Pleurotus spec.* ein stark adhäsives Wachstumsverhalten aufweisen. Dennoch eignen sie sich aufgrund ihres unerschöpflichen oxidativen Potentials für die Herstellung von Terpenoiden.

Eine Kombination der Enzymaktivitäten aus Pilzen mit der leichten Kultivierbarkeit von Bakterien stellt eine Möglichkeit dar, zu anwendbaren Biokatalysatoren zu gelangen (Oriol *et al.*, 1997). Hierfür müssen zunächst die geeigneten Enzymsysteme gefunden werden.

Eine Strategie, Enzyme für die regio- und enantiospezifische Oxidation von Terpenkohlenwasserstoffen zu erhalten, ist die Aufklärung des Terpenmetabolismus nach einer selektiven Anreicherung in einem Medium mit dem gewählten Terpen als C-Quelle (Duetz *et al.*, 2003).

In den meisten Studien wurde der Abbauweg des Edukts durch akkumulierende Intermediate postuliert und durch Induktionsexperimente mit entsprechenden Terpenoiden belegt. Bei der Interpretation der Metabolisierung über entstehende Abbauprodukte müssen aber folgende Fehlerquellen berücksichtigt werden (Duetz *et al.*, 2003):

(1) Die Akkumulation eines Oxidationsproduktes kann ein durch eine unvollständige Regiospezifität des Transformationsenzym resultierendes Endprodukt oder ein transient akkumulierendes Produkt aufgrund einer hohen Reaktionsenthalpie des nachfolgenden Abbauschrittes sein.

(2) Die Entstehung einer Vielzahl von Hydroxylierungsprodukten kann von einem Enzym mit einer geringen Regiospezifität oder von vielen Oxygenasen mit unterschiedlichen Regiospezifitäten katalysiert werden.

(3) Die Metabolisierung eines möglichen Intermediats durch Precursor-induzierte Zellen ist kein Beweis für die Existenz des Intermediats im Katabolismus, denn es kann sich ebenfalls um eine Nebenaktivität eines Enzyms handeln.

Durch überwiegend empirische Untersuchungen in aufwendigen Screeningverfahren wurden in der Vergangenheit viele transformationsaktive Stämme gefunden, die die Grundlage weiterer Reaktionsoptimierungen bilden können (Krasnobajew, 1984; Schrader und Berger, 2001).

3.2.4 Mechanismus der Terpenmetabolisierung

Lipophile Verbindungen reichern sich in den lipophilen Membranen einer Zelle an. Dabei findet eine Akkumulation gemäß dem Verteilungskoeffizienten $\text{LogP}_{\text{Membran/Wasser}}$ der jeweiligen Verbindung statt. Terpenkohlenwasserstoffe wie Limonen und (+)-Valencen besitzen einen hohen logP-Wert ($\text{logP} > 4$) und lagern sich somit in die Zellmembranen ein. Um ein Eindringen der Verbindungen und damit die Schädigung von Zellstrukturen und -funktionen abzuwehren, können Zellen verschieden reagieren. Zum einen kann die Fluidität von Membranen durch zusätzliche oder verminderte Einlagerung von Cholesterol und Proteinen oder durch Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden herabgesetzt werden (Heipieper *et al.*, 1994). Zum anderen sind aktive Carriersysteme für

das xenobiotische Lösungsmittel Toluol bei lösungsmitteltoleranten Organismen entdeckt worden (Isken *et al.*, 1997; Teunissen und de Bont, 1995). Eine weitere Möglichkeit ist die Oxyfunktionalisierung der xenobiotischen Substanzen und eventueller Glycolisierung (bei Tieren), um sie als hydrophilere Verbindungen auszuscheiden oder als C-Quelle verfügbar zu machen und z.B. über die β -Oxidation zu metabolisieren (Detoxifikation; van den Werf *et al.*, 1999). Deshalb werden wahrscheinlich viele Oxidationsreaktionen von Enzymen durchgeführt, die eine generelle Akzeptanz für lipophile Substrate haben und daher unselektiv hydroxylieren. So ist die überwiegende Anzahl von in der Literatur beschriebenen Oxyfunktionalisierungen unselektiv. Das Auffinden von mikrobiellen Reaktionsmechanismen, die stereoselektiv Sauerstoff in ein nicht im Habitat vorkommendes Substrat einführen können, stellt somit eine Besonderheit dar.

An der Oxidation der untersuchten Terpenkohlenwasserstoffe *R*-(+)-Limonen, (+)-Valencen und Farnesen können zum einen Exoenzyme, zum anderen zelluläre Enzyme beteiligt sein. Während Exoenzyme bei Organismen der Bakterien und niederen Eukaryonten sehr verbreitet sind, spielen ausschließlich zelluläre Enzyme im pflanzlichen Sekundärmetabolismus eine Rolle. Im Wesentlichen sind die nachfolgend erläuterten Enzymgruppen für die Oxidation von Kohlenwasserstoffen verantwortlich.

3.2.4.1 Extrazelluläre Oxidasen

Exoenzyme werden von Mikroorganismen produziert und abgegeben, um exogene Nährstoffe wie das Biopolymer Lignin zu zersetzen. Hierdurch gelingt es z.B. Pilzen, diverse Substrate als C- oder N-Quelle für ihren Metabolismus verfügbar zu machen. Eine besondere Rolle spielen oxidative Enzyme wie Monooxygenasen, Laccasen und manganabhängige Peroxidasen, die auch persistente Substrate wie Pyrene detoxifizieren können (van den Brinck *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 2002; Abdel-Raheem *et al.*, 2002). Ebenfalls werden Exoenzyme wie Peroxidasen zur Oxidation von Terpensubstraten verwendet (Langhoff, 2002). Hierbei werden Tetraterpene wie z.B. Carotinoide durch Oxidasen zu aromaaktiven Sesquiterpenen wie β -Ionon abgebaut (Zorn *et al.*, 2003). Die Transformation von (+)-Valencen wird von extrazellulären Ligninperoxidasen aus *Phanerochaete chrysosporium* katalysiert (Willershausen, 1996).

3.2.4.2 Zelluläre Oxidasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen: Monooxygenasen führen ein Sauerstoffatom in das Substratmolekül ein. Sie katalysieren die Entgiftung von xenobiotischen Verbindungen. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich ein Häm, dessen zentrales Fe(II) eine stark

elektrophile Bindungsstelle darstellt. Monooxygenasen benötigen das Reduktionsäquivalent NAD(P)H als Cofaktor zur Regeneration des Fe-Oxidationszustandes. Deshalb kommen sie meist in Verbindung mit Cytochrom-P450-Reduktasen vor. Verschiedene Monooxygenasen sind bekannt, die unselektiv eine Vielzahl von Substraten akzeptieren (Polysubstrat-Monooxygenasen, van den Brinck *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Bedeutung werden sie näher in 3.2.4.3 behandelt.

Cytochromunabhängige Monooxygenasen: Verschiedene Monooxygenasen wie z.B. flavinabhängige Oxygenasen können Sauerstoff in Substrate einführen. Insbesondere katalysieren sie die Hydroxylierung von Phenolen, Heteroatomen oder auch Baeyer-Villiger-Oxidationen von Ketonen. Hierzu zählen Monooxygenasen, die kein Häm im aktiven Zentrum besitzen (Holland, 1992).

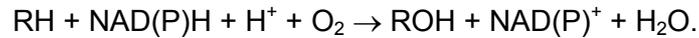
Laccasen: Laccasen sind Oxidoreduktasen, die aus Pilzen oder auch Bäumen isolierbar sind und eine entscheidende Bedeutung beim oxidativen Abbau von Lignin haben. Sie besitzen im Gegensatz zu Monooxygenasen Kupferionen als Zentralatom im aktiven Zentrum und können zahlreiche Polyphenole wie z.B. Catechin oder Guajakol aufgrund ihres hohen Oxidationspotentials oxidieren. Dabei werden die Substrate zunächst in Radikale überführt, die dann nichtenzymatisch weiterreagieren (Malmstroem *et al.*, 1991). In Pilzen können sie als Exoenzyme ausgeschüttet werden oder zellulär vorkommen.

Peroxidasen: Peroxidasen gehören zu den Oxidoreduktasen, die mit Hilfe von Wasserstoffperoxid oder anderer Peroxide verschiedene Elektronendonatoren oxidieren. Eisenhaltige Peroxidasen und Manganperoxidasen sind in Pilzen weit verbreitet und oxidieren Substrate wie Phenole, andere Aromaten und Lipide über ein intermediäres Radikalkation (Jensen *et al.*, 1996; Johnson und Croteau, 1984). Insbesondere spielen sie eine wichtige Rolle beim Abbau von Lignin. Sie benötigen als Cofaktoren Eisen bzw. Mangan und treten zumeist bei Stickstoffmangel auf (Iodophase).

3.2.4.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen (Cy-P450)

Cy-P450-Monooxygenasen aus Pilzen spielen in vielen natürlichen Biokonversionen eine Rolle. Es wird davon ausgegangen, dass in Pilzen bis zu siebzig Cy-P450-Gene vorliegen, die je nach Substratumgebung aktiviert werden (van den Brink *et al.*, 1998). Über sie werden intra- und extrazelluläre Monooxygenasen exprimiert, die den Abbau von Biopolymeren katalysieren und damit eine ständige Verfügbarkeit von C-Quellen gewährleisten. Die Monooxygenasen hydroxylieren jede Art von Substraten wie Xenobiotika (z.B. polycyclische

aromatische Kohlenwasserstoffe), Steroide oder Fettsäuren (Singer *et al.*, 2000; Hou, 2000). Die Grundreaktion zur Hydroxylierung des Substrates (R) ist stets dieselbe:



Das Substrat wird zunächst an das Eisen(III)-Zentralatom des Hämsystems gebunden, welches zum aktiven Eisen(II) reduziert wird. Das Eisen(II) begünstigt die Bindung von Sauerstoff, der heterolytisch gespalten und nach erneuter Reduktion auf das Substrat übertragen wird. Als Reaktionsprodukte werden zuerst Wasser, dann das hydroxylierte Substrat abgespalten (**Abb. 3-6**; Meier und Ulrich, 1995).

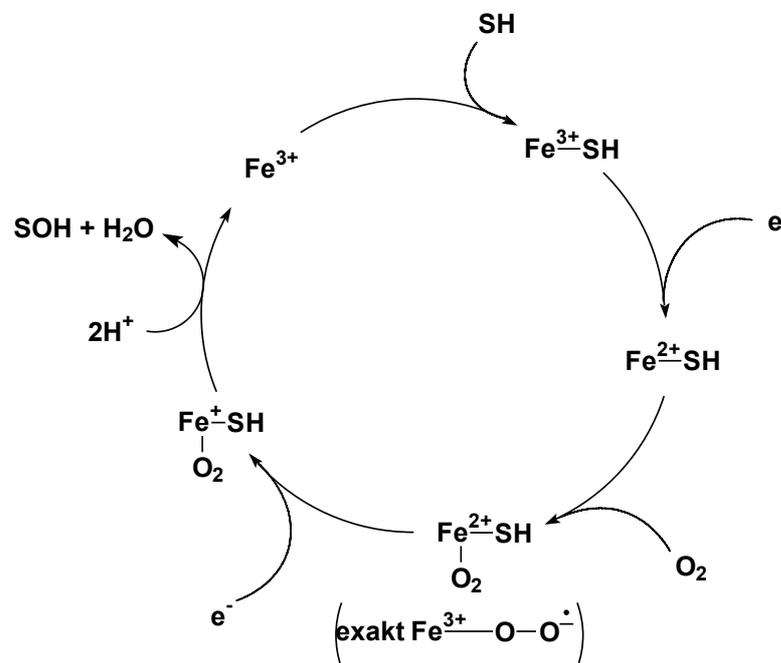


Abbildung 3-6: Katalytischer Zyklus einer Cy-P-450-Monooxygenase (nach Lewis, 1996).

Zur NAD(P)H-Regeneration wird eine Reduktase benötigt. Diese liegt in prokaryontischen und mitochondrialen Cy-P450-Monooxygenasen als gemeinsamer Proteinkomplex vor, während die Cy-P450-Monooxygenasen im endoplasmatischen Retikulum nur als ein Protein (CPR², Cy-P450-Reduktase) vorliegen. Die meisten Cy-P450-Enzyme in Pilzen werden am endoplasmatischen Retikulum vermutet. Die codierenden Gene besitzen typische konservierte Sequenzen für eine Häm-Bindungsregion am C-Terminus des Proteins und eine mutmaßliche Substratbindungsregion. Hinzu kommt eine aminoterminaler Region mit Sequenzen lipophiler Aminosäuren zur Verankerung des Enzyms in der Zellmembran (**Abb. 3-7**; Nelson und Strobel, 1988; Lupien *et al.*, 1999; van den Brinck *et al.*, 1998). Die Klonierung und Expression eines Cy-P450-Genes wurde mit dem Basidiomyceten *Lentinula*

edodes durchgeführt und zeigt eine hohe Homologie innerhalb einer Familie, nicht jedoch zwischen Familien (Akyjama, 2002).

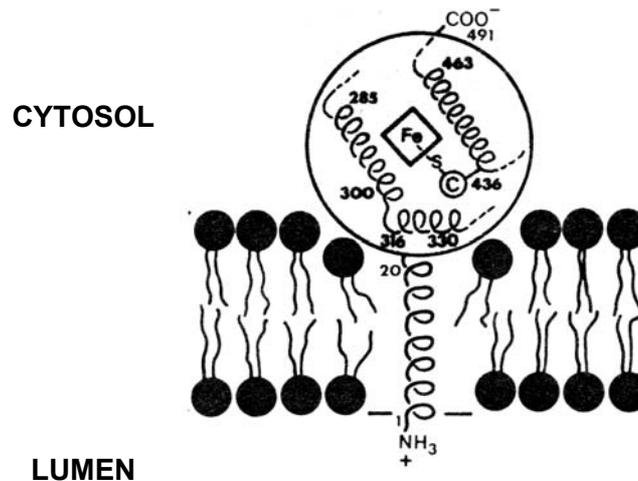


Abbildung 3-7: Modell einer Cy-P450-Monooxygenase aus dem endoplasmatischen Reticulum (Brown, 1989).

Die Isolierung von transmembranen Cy-P450-Monooxygenasen ist nur schwer möglich (van den Brink *et al.*, 1998). Monooxygenasen sind äußerst instabil und müssen, sofern sie mitochondrial vorliegen und somit eine Reduktase zur NAD(P)H-Regeneration benötigen, nach Aufreinigung wieder rekonstituiert werden.

Die Isolierung von intrazellulären Monooxygenasen mit der Methode von Bouwmeester *et al.* (1999) und Mihaliak *et al.* (1993) konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden (2.2.7.2 und 2.2.7.3). Die gefundene, sehr geringe Enzymaktivität kann an einer ungenügenden Rekonstitution des Oxidase/Reduktase-Systems oder an der Zerstörung der Membranintegrität liegen. Geringe Terpenspuren, die durch den Aufschluss freigesetzt wurden und denaturierend wirken, können ferner zu einer Aktivitätsminderung beitragen. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Verwendung von Ganzzellsystemen lag, wurde eine Enzymbaufreinigung nicht eingehender untersucht.

Eine Umgehung der Monooxygenasen-Isolierung durch Screening von cDNA-Banken, Klonierung und Expression in einem geeigneten Vektorsystem wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* scheint der elegantere Weg einer Gewinnung von Monooxygenasen zu sein, jedoch kann eine erhebliche Fehlerquote aufgrund der hohen Anzahl von Monooxygenasen-Genen in Pilzen auftreten. Die heterologe Expression von Cy-P450-Monooxygenasen über cDNA Banken von Basidiomyceten ist prinzipiell möglich (Ichinose, 2002).

3.2.4.4 Mikrobielle Terpententransformationen

Oxidationen, Reduktionen und Isomerisierungen von Terpenkohlenwasserstoffen werden bei Bakterien und Pilzen von den genannten enzymatische Aktivitäten (3.2.4.2 und 3.2.4.3), die nicht zu der Terpensynthesekaskade gehören, katalysiert (Wise and Croteau, 1999). Oxidationen wie Hydroxylierungen werden von Cy-P450-Oxidasen oder -Laccasen durchgeführt (Eltis *et al.*, 1993; Mihaliak *et al.*, 1993; van den Brink, 1998). Eine Vielzahl von Dehydrogenasen, Reduktasen und Hydrolasen, die zum Teil eine hohe Substratspezifität aufweisen, sind beschrieben (van der Werf, 1999; van der Werf *et al.*, 1998). Viele von den zuerst in Pflanzen beschriebenen Enzymen wurden mittlerweile auch in Mikroorganismen entdeckt (**Tab. 3-3**).

Tabelle 3-3: Auswahl von Biokatalysatoren zur Modifikation von Monoterpenoiden (van der Werf *et al.*, 1997; van der Werf, 1999).

Enzym	Reaktion	Substrat	Organismus
Monooxygenase	Hydroxylierung	Camphor	<i>Pseudomonas putida</i>
		Cymene	<i>P. aeruginosa</i>
		Linalool	<i>Pseudomonas putida</i>
	Epoxidierung	α -Pinen	<i>P. fluorescens</i>
	Allylische Umlagerung	Isopiperitol	<i>Pseudomonas spec.</i>
Dehydrogenasen	Dehydrogenierung	Carveol	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		Hydroxycamphor	<i>P. putida</i>
Reduktasen	Reduktion	Carvon	<i>Aspergillus niger</i>
Lactonase	Baeyer-Villiger-Oxidation	Diketocamphane	<i>P. putida</i>
Reverse Hydrolasen	Veresterung	Menthol	<i>Penicillium digitatum</i>
Hydratasen	Hydratisierung	Limonen	<i>Penicillium digitatum</i>
Racemasen	Racemisierung	Isodihydrocarvon	<i>Pseudomonas fragi</i>

3.2.5 Blindwertproblematik

Die Autoxidation von Mono- und Sesquiterpenoiden spielt in Biotransformationen eine wichtige Rolle, wenn der verwendete Precursor strukturell bedingt zur Zersetzung tendiert. Die chemische Oxidation kann eine Konversion vortäuschen oder beeinflussen.

Bei der Ermittlung eines chemischen Blindwertes, der Inkubation von Substrat in mycelfreiem Medium unter Kultivierungsbedingungen, findet eine Autoxidation unter konstanten Bedingungen statt, da keine mikrobielle Sauerstoffzehrung vorliegt (2.2.1). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Autoxidation von Limonen bei pH 6 im

Kulturmedium vernachlässigbar gering ausfällt ($<0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 2.2.1). Eine säurekatalysierte Hydratisierung von Limonen zu α -Terpineol bei pH 4 unter Transformationsbedingungen findet ebenfalls nur marginal statt (2.2.3; Halveda-Toledo *et al.*, 1999).

Ebenso ist die Autoxidation von (+)-Valencen gemessen worden. Nootkaton ist bekanntermaßen ein Autoxidationsprodukt des (+)-Valencen. Die metallkatalysierte Oxidation oder auch Fotooxidation von Valencen führt zu einem als Grapefruitnote bezeichneten *Off-Flavour* von Orangensaft (Belitz *et al.*, 2002). Autoxidationsprodukte von Valencen in Schüttelkolben bilden sich wesentlich langsamer (Produktgehalte von maximal $1,5 \text{ mg L}^{-1}$; 2.3.1) als in einer oxidativen Biotransformation. Versuche zum Einfang eines gebildeten Valencylradikals, das z.B. aus einem Hydroperoxid entstehen kann, mit dem Radikalfänger DABCO zeigten keine nennenswerte Beeinflussung der Produktbildungskinetik während der Biotransformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* (2.3.8.3). In enzymatischen Transformationen wurde die Valencenoxidation durch einen Zusatz von DABCO zu mehr als 90% gehemmt (Willershausen *et al.*, 1996).

Eine Unterscheidung zwischen einer chemischen Oxidation oder einer Biogenese lässt sich oft durch die Reaktionskinetik wie durch die Stereochemie der gebildeten, intermediären Terpenalkohole treffen. Während eine Autoxidation eine Kinetik zeigt, wie sie z.B. bei einer Oxidation von Fettsäuren auftritt (Induktionsphase und linearer Geneseanstieg), besitzen Kinetiken von Biotransformationen oft ein schmales Produktmaximum mit einem weiterführenden Produktabbau. Weiterhin zeigte sich bei der Valencen- und Limonentransformation in Submerskulturen (2.2.5.2 und 2.3.8.1) die bevorzugte Bildung eines Stereoisomers im Gegensatz zu einer autoxidativen Racematbildung. Es wurden aber auch nichtselektive Substratoxidationen, wie z.B. die Oxidation von Limonen zu annähernd racemischem Carveol, untersucht (2.2.5.1).

Anaerobe Transformationen, die die erhöhte Autoxidation von Terpensubstraten umgehen könnten, wären in diesem Zusammenhang eine mögliche Alternative. Die Oxidation von Myrcen zu Geranolsäure kann von Denitrifikanten wie *Alcaligenes defragrans* katalysiert werden (Heyen und Harder, 2000).

3.2.6 Identifizierung von Terpenoxidationsprodukten mittels Massenspektroskopie

Die Valencenoxidationsprodukte Nootkatol und Nootkaton stellten keine Endprodukte der Oxidation dar. Weitere Produkte wurden mittels Massenspektroskopie untersucht und wiesen auf Epoxynootkaton, Valencendiol und Triole hin. Da die Interpretation der Massenspektren zu der Identifikation der Valencendiol führte (2.3.4.5), werden sie nachfolgend ausführlicher

dargestellt. Ebenfalls basiert die Annahme einer Metabolisierung von Farnesen über Farnesenalkohole zu Di- und Triolen auf massenspektroskopische Untersuchungen (2.4.5.2).

Die Fragmentierungen von höheren Terpenen wie z.B. Sesquiterpenen sind äußerst komplex. Sie werden insbesondere in niedrigen Fragmentmassen von den Ionenserien $C_nH_{2n-1}^+$ und $C_nH_{2n}^+$ geprägt (Mc Lafferty und Turecek, 1995). Für eine eindeutige Identifizierung ist deshalb die Isolierung mit anschließender kernresonanzspektroskopischer Untersuchung unerlässlich, solange keine authentischen Standards zur Verfügung stehen. Anhand charakteristischer Fragmentierungsmechanismen können Molekülstrukturen nur postuliert werden.

Aufgrund des charakteristischen Fragmentierungsmusters des Valencenoxidationsproduktes **33** (2.3.4.4) wurde zunächst ein 11,12-Nootkatonepoxid postuliert. Dieses wurde nachfolgend kernresonanzspektroskopisch identifiziert. Typisch für die Fragmentierung der Molekülstruktur ist hierbei die Abspaltung des epoxidierten Isopropylrestes. Es kann durch eine α -Spaltung nach radikalischer H-Umlagerung abgetrennt werden, wobei das entstehende Neutralion nach erneuter Ionisierung ein intensives Ion mit der markanten Masse m/z 176 zeigt.

Valencendiole (**35/36**) wurden aus den Massenspektren aus Kapitel 2.3.4.5 (**Abb. 2-39**) abgeleitet. Eine Strukturbestimmung bezüglich der Konfiguration der Alkoholgruppen konnte jedoch massenspektroskopisch nicht durchgeführt werden. Die Fragmentierungsmechanismen der Sesquiterpenoide sind hierbei wenig charakteristisch und führen zu einer Vielzahl von möglichen Stellungsisomeren. Geht man jedoch davon aus, dass eine allylische Hydroxylierung mit einem allylischen Carbokation im Übergangszustand als kinetisch günstigste Variante vorliegt, so können die entstandenen Fragmente aus überwiegend heterolytischen induktiven α -Spaltungen abgeleitet werden (**Abb. 3-8**). Hierbei finden die α -Spaltungen immer dort mit höherer Wahrscheinlichkeit statt, wo eine doppelt allylische und nicht eine vinyllische Ladungs-/Radikalposition auftritt (Mc Lafferty und Turecek, 1995).

Das Fragment m/z 161 stellt für bicyclische Sesquiterpene wie z.B. auch Germacren A ein äußerst typisches Fragment (Bicyclus) dar, das nach der Abspaltung des Isopropenylrestes entsteht (Steliopoulos und Mosandl, 2001). Die Fragmentierung beginnt jeweils mit der Abspaltung eines Trimethylsilanol-Radikals zur signalintensiven Masse m/z 291 und führt nach Ladungswanderung zur Abspaltung der zweiten Alkoholfunktion (Fragment m/z 201; **Abb.3-8, [1]**).

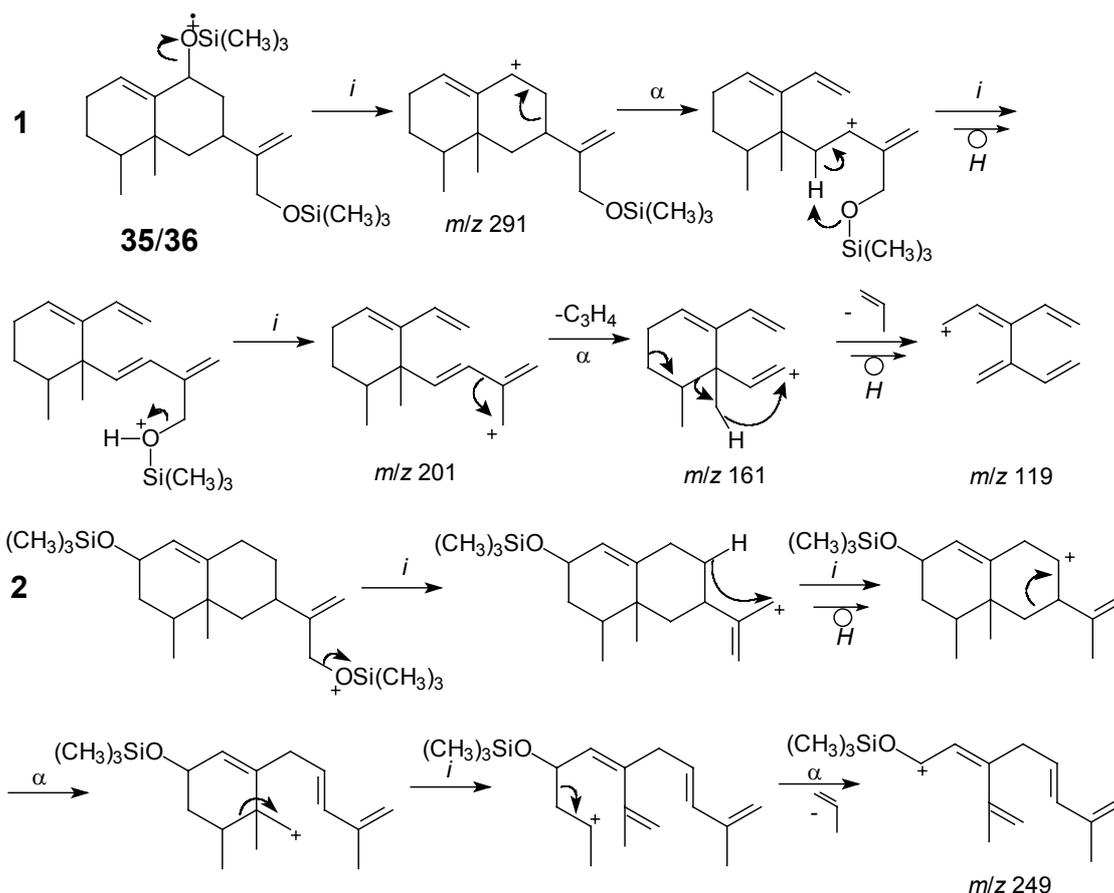


Abbildung 3-8: Fragmentierungsmechanismen der Valencendirole.

Das Fragment mit der Masse m/z 161 wird durch α -Abspaltung eines neutralen Dien- und Isopropenylfragments um 40 bzw. 42 auf m/z 119 vermindert. Erfolgt diese Fragmentierung vor der Abspaltung der zweiten Alkoholfunktion, so ergibt sich das signalintensive Fragment m/z 249 (**Abb. 3-8** [2]).

Die auftretenden Valencenketodiole, Valencetriole oder Epoxydole wurden nur aufgrund ihrer Molekülmasse identifiziert und strukturell nicht weiter aufgeklärt.

9-Hydroxyfarnesen (**46**) konnte ebenfalls durch massenspektroskopische Untersuchungen postuliert werden. Es besaß im silylierten Zustand ein Molekülion der Masse m/z 292. Das Fragment m/z 277 kann durch den leichten Verlust einer Methylgruppe erklärt werden. Ebenfalls entstand das für eine silylierte Verbindung typische Fragment 73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$, das bei chemischen Ionisation weniger deutlich auftritt. Der Verlust von Silanol aus dem Molekülion während der chemischen Ionisation führt zu einem Kation mit m/z 203 (Halket and Zaikin, 2003; **Abb. 3-9**).

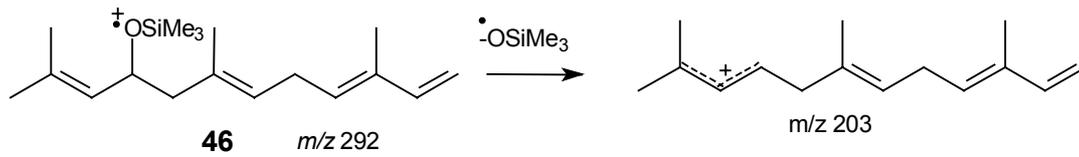


Abbildung 3-9: Abspaltung des Trimethylsilanols aus **46**.

Die entstehenden Fragmente m/z 55, 157 und 237 könnten durch eine homolytisch radikalinduzierte bzw. heterolytisch induktive α -Spaltung von **46** erklärt werden (**Abb. 3-10**).

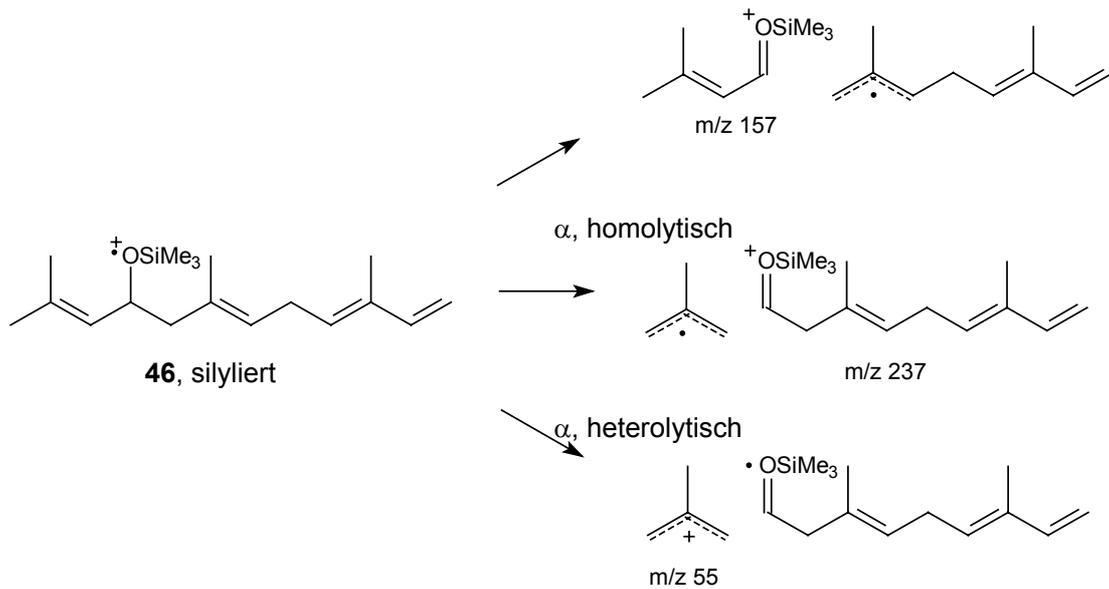


Abbildung 3-10: Homolytische und heterolytische α -Spaltung von **46**.

Das Fragment m/z 237 hatte nur eine schwache Intensität. Das signalintensive Fragment m/z 134 stellt ein charakteristisches Fragment für Oxidationsprodukte des Farnesens dar. Es wurde für Sinensal beschrieben (Thomas *et al.*, 1969) und durch die Entstehung eines stabilen Cycloheptanradikalkation erklärt. Eine postulierte Fragmentierung zeigt **Abb. 3-11**.

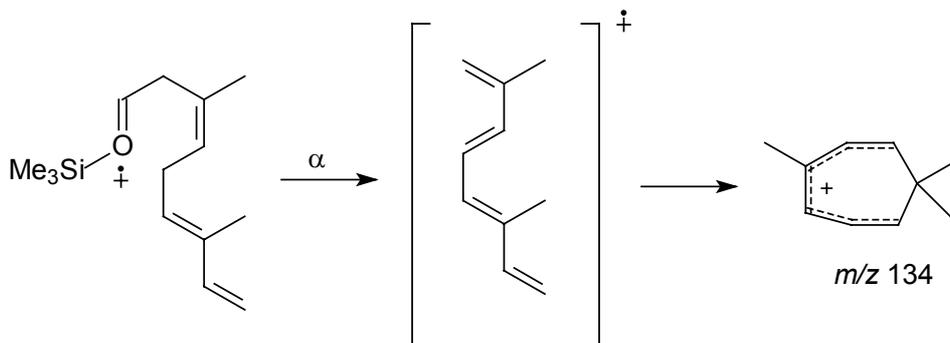


Abbildung 3-11: α -Spaltung von **46** und Entstehung des Fragmentions m/z 134 (Thomas *et al.*, 1969).

Die Fragmente 93 und 41 entstehen wahrscheinlich aus dem nach einer α -Spaltung sehr instabilen Fragment 135 durch Umlagerungen der Doppelbindungen und weiterer homolytischer α -Spaltungen (**Abb. 2-80**). Die Fragmentierung des Farnesentriols **47** konnte nicht genauer aufgeklärt werden, da wenig spezifische Massen abweichend von den Molekülzerfallsreihen entstanden (**Abb. 2-81**).

3.3 Transformationsreaktionen

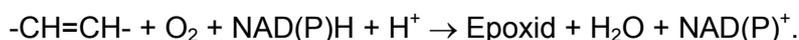
3.3.1 Nicht-selektive Terpenttransformationen

3.3.1.1 Transformation von Limonen

Im Screening zur Limonenbiotransformation wurden zum überwiegenden Teil regionspezifische Hydroxylierungen von *R*-(+)-Limonen an den C-Atomen 3, 4, 6, 7, 8 und 9 nachgewiesen. Ebenso traten Reduktionen und Hydratisierungen von Doppelbindungen auf. Zusammenfassend wurden mit wenigen Abweichungen (z.B. Linaloolbildung) Oxidationsprodukte aus den fünf bekannten mikrobiellen Abbauwegen gefunden (van der Werf *et al.*, 1999; **Abb. 3-12**). Somit können offensichtlich die im Screening verwendeten Pilze das Monoterpen Limonen (**3**) über die β -Oxidation metabolisieren.

Die im Einzelnen auftretenden Oxidationen, Reduktionen, Umlagerungen und Hydratisierungen werden nachfolgend näher erläutert.

Hydroxylierungen und *Epoxidierungen* von Terpenen werden typischerweise von Oxidoreduktasen der Cytochrom-P450-Monooxygenasen oder Laccasen katalysiert (van der Werf, 1999). Insbesondere Monooxygenasen oxidieren Terpene neben Terpenalkoholen (3.2.4.3) auch zu Epoxiden. Folgende Grundreaktion liegt der Epoxidierung zugrunde:



Die allylische Hydroxylierung von **3** am C-6 zu Carveol überwog bei Organismen der Gattung *Pleurotus*, während Pilze wie *Gongronella butleri* dagegen eher eine Oxidation an C-3 zum Isopiperitenol bevorzugten. Terminale Oxidationen über Perillaalkohol zum Perillaaldehyd wurden von *Aspergillus niger* katalysiert (2.2.2.2). Ebenfalls wurden Epoxide wie das Limonen-1,2-epoxid von *Cunninghamella echinulata* oder *Pleurotus sapidus* gebildet (2.2.2.5). Die Oxyfunktionalisierung von *R*-(+)-Limonen mit Lyophilisaten von *P. sapidus* und *P. ostreatus* verlief ebenfalls unselektiv und zeigte auch eine Genese von Epoxiden (2.2.8.1).

Für die allylische Hydroxylierung von **3** in C3- und C6-Position wie auch für die Epoxidierung sind Monooxygenasen aus *Mentha spec.* (Wise und Croteau, 1999) und aus *Rhodococcus* isoliert worden (van der Werf und de Bont, 1998).

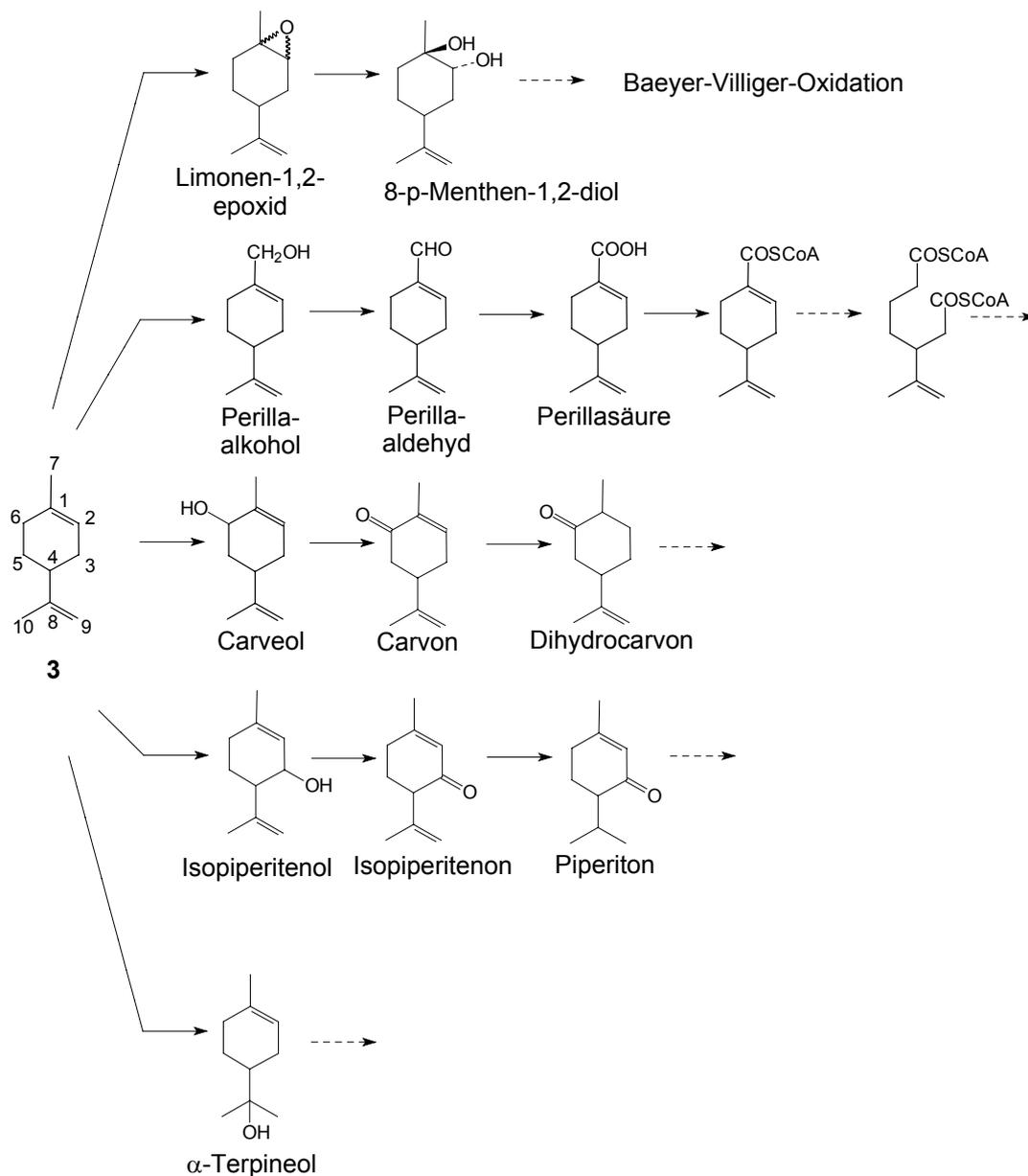


Abbildung 3-12: Mikrobielle Abbauewege von Limonen (3; nach van der Werf *et al.*, 1999).

Allylische Umlagerungen wurden bei der Limonentransformation mit *Pleurotus sapidus*, *Fusarium proliferatum* und *Chaetomium cochloides* beobachtet. Sie lassen sich durch die Abstraktion eines Hydrids bzw. H-Atoms am C-3 und einer Umlagerung der 1,2-Doppelbindung zum stabilen tertiären Radikal/Kation erklären (**Abb. 3-13**; 2.2.2.2) und wurden auch bei anderen Monoterpenoxidationen beschrieben (Miyazawa *et al.*, 1991). Die Umlagerung der Doppelbindung von 1,2 auf 2,3-Position erklärt die Bildung von 2,8-Menthen-1-ol aus Isopiperitenol (van den Werf *et al.*, 1997).

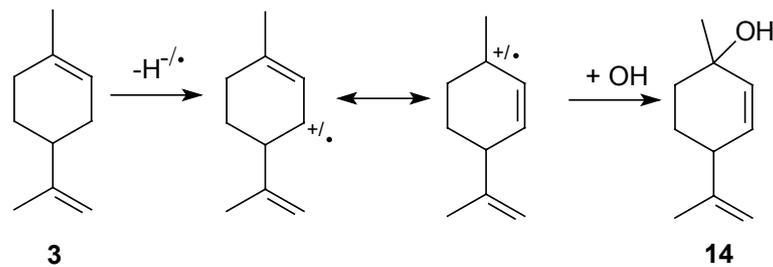
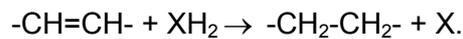


Abbildung 3-13: Mögliche allylische Umlagerung der 1,2-Doppelbindung zum 2,8-Menthen-1-ol (**14**, nach van der Werf *et al.*, 1997).

Reduktionen der 1,2- bzw. 8,9-Doppelbindung von **3** wurden als Transformationsreaktion bei verschiedenen Pilzarten gefunden. Hierbei katalysieren *Reduktasen* die Hydrierung von Doppelbindungen:



Die Terpenoide Dihydrocarveol, Dihydrocarvon und Piperiton, die überwiegend von Pilzen der Gattung *Pleurotus* gebildet wurden (2.2.2.5), entstehen aus einer Reduktion der 1,2- wie auch der 8,9-Doppelbindung des Carveols, Carvons bzw. Piperitenons. Die Reduktion von Isopiperitenon wurde auch bei Hefen beobachtet (van Dyk *et al.*, 1998; King und Dickenson, 2000). Die Reduktion von Carvonenantiomeren zu Dihydrocarvon ist ebenfalls bekannt (Noma und Nonomura, 1974).

Hydratisierungen von Doppelbindungen wurden beobachtet. *Penicillium citrinum* katalysierte die Addition von Wasser an die 8,9-Doppelbindung von **3** und lieferte den Terpenalkohol α -Terpineol (80 mg L^{-1} , 2.2.3). Die Genese von α -Terpineol aus Limonen mittels *Pseudomonaden* verläuft über Hydratasen, die hier als Transmembranprotein vorliegt und erfolgreich isoliert wurde (Cadwallader *et al.*, 1992). Hydratisierungen stellen einen Weg dar, Terpensubstrate unter anaeroben Bedingungen zu metabolisieren. Jedoch wurden auch Cytochrom-P450-Monooxygenasen, involviert in einem Multienzymkomplex, für die Hydratisierung von racemischem Limonen zu α -Terpineol postuliert (van der Werf *et al.*, 1998).

Linalool (**17**) wird von der Mehrzahl der untersuchten Pilze gebildet (2.2.2.4; **Tab. 7-4**). Ein möglicher Bildungsweg von **17** könnte durch Dehydratisierung von α -Terpineol (**9**) erklärt werden (Haleva-Toledo *et al.*, 1999; **Abb. 3-14**). Hierbei kommt es zu einer Ringöffnung zwischen C3 und C4 im α -Terpineolmolekül und nach Umlagerung der Doppelbindung an C1 zu einer Anlagerung von Wasser. Dieser Bildungsweg scheint aber bei den untersuchten

Organismen unwahrscheinlich, da die Gehalte des Intermediats **9** nicht in Zusammenhang mit **17** gebracht werden konnten.

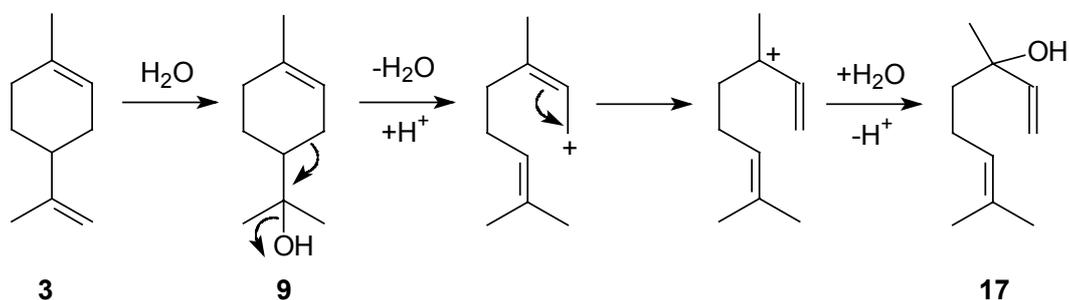


Abbildung 3-14: Mögliche Entstehung von Linalool aus α -Terpineol (Haleva-Toledo *et al.*, 1999).

Exoenzymaktivitäten wurden bei einer Auswahl von bioaktiven Basidiomyceten untersucht und zeigte bezüglich Limonen nur geringe Produktbildungen (2.2.7.1 und 2.2.7.4). Somit kann nicht von exoenzymatischen Oxidaseaktivitäten unter den genannten Versuchsbedingungen ausgegangen werden, da eventuell die Katalysatorkonzentrationen zu gering oder nicht mehr aktiv sind oder entsprechende Cofaktoren fehlen.

3.3.1.2 Transformation von (+)-Valencen

Die Transformation des Sesquiterpens (+)-Valencen (**29**) zu oxyfunktionalisierten Produkten mit *Chaetomium globosum* wird mit β -Nootkatol und Valencen-11,12-epoxid begonnen. Die Einführung des ersten Sauerstoffatoms verläuft daher regio- und enantioselektiv. Daher wird die Nootkatolgenese eingehender in 3.3.2.5 behandelt. Nachfolgend wird das Nootkatol (**30**) zu Nootkaton (**31**) dehydrogeniert. Es erfolgt dann eine weitergehende nichtselektive Oxidation von **31** zu Epoxiden, Diolen, Hydroxyketonen, Ketodiolen und Triolen. Somit bildet **31** nur ein Intermediat der Metabolisierung von **29** (2.3.3 und 2.3.4).

Die Entstehung des Nootkatols verläuft kinetisch simultan zur Entstehung des Nootkatons. Abgeleitet von dieser gleichen Bildungskinetik, aber einer entschieden geringer gebildeten Menge des Alkohols kann eine langsame Einführung der Hydroxyfunktion angenommen werden, während eine wesentlich schnellere Dehydrogenierung zum Keton stattfindet. Dies entspricht dem Nootkatongeneseweg, der auch bei Pflanzen in Microsomen gefunden wurde (siehe 3.3.2.5; de Kraker *et al.*, 2003). Die Hydroxylierung des Sesquiterpens am C-Atom 2 könnte somit der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt sein (**Abb. 3-15**).

Die Weiteroxidation zum Epoxynootkaton (**32**) erfolgte wesentlich schneller. Das Valencen-11,12-epoxid (**33**) könnte durch Hydratisierung in ein Diol überführt werden, eine entsprechende Molekülmasse konnte massenspektrometrisch aber nicht nachgewiesen

werden (2.3.4). Aus dem Nootkatol entstehen Diole (**35** und **36**) und **32** über Nootkaton und Triole unbekannter Regiochemie. Die nur gering auftretenden Gehalte von Nootkatol als Oxidationsprodukt am Beginn des Metabolisierungsweges könnten auf eine Produkthemmung der Monooxygenase durch das entstehende Nootkaton und der damit verbundenen Produkttoxizität zurückzuführen sein (Sime *et al.*, 2000). Eine genaue Untersuchung durch Supplementierung der Transformationskulturen mit entsprechenden Intermediaten wäre für die Unterstützung der Oxidationsabfolge hilfreich.

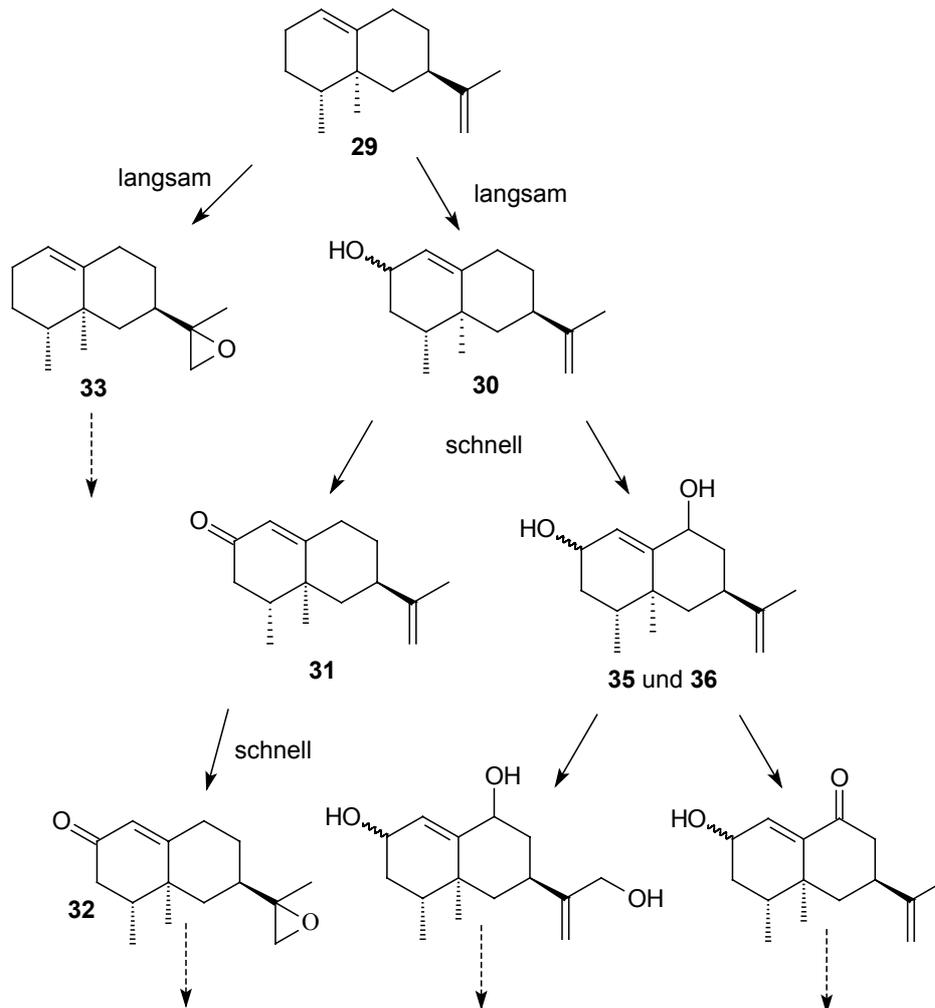


Abbildung 3-15: Metabolisierung von (+)-Valencen (**29**) durch *Chaetomium globosum*.

Eine ähnliche Transformation wie *Chaetomium globosum* zeigte ein Stamm von *Aspergillus niger* (Noma *et al.*, 2001). (+)-Valencen (**29**) wurde über β -Nootkatol (**30b**), dessen Dehydratisierungsprodukt Nootkatene (**48**) und 3-Oxonootkatene zu 3-Oxonootkaten-11,12-diol (**51**) und über Nootkaton (**31**) zu Nootkaton-11,12-diol (**49**) oxidiert (**Abb. 3-16**). **31** wiederum wurde über das Nootkaton-11,12-epoxid zu **49** mit kleinen Mengen des Nootkaton-

12-ols (**50**) biotransformiert. Aus β -Nootkatol (**30b**) wurde **31**, **48** und **51** erhalten, während aus α -Nootkatol (**30a**) **31** und **48** gebildet wurde.

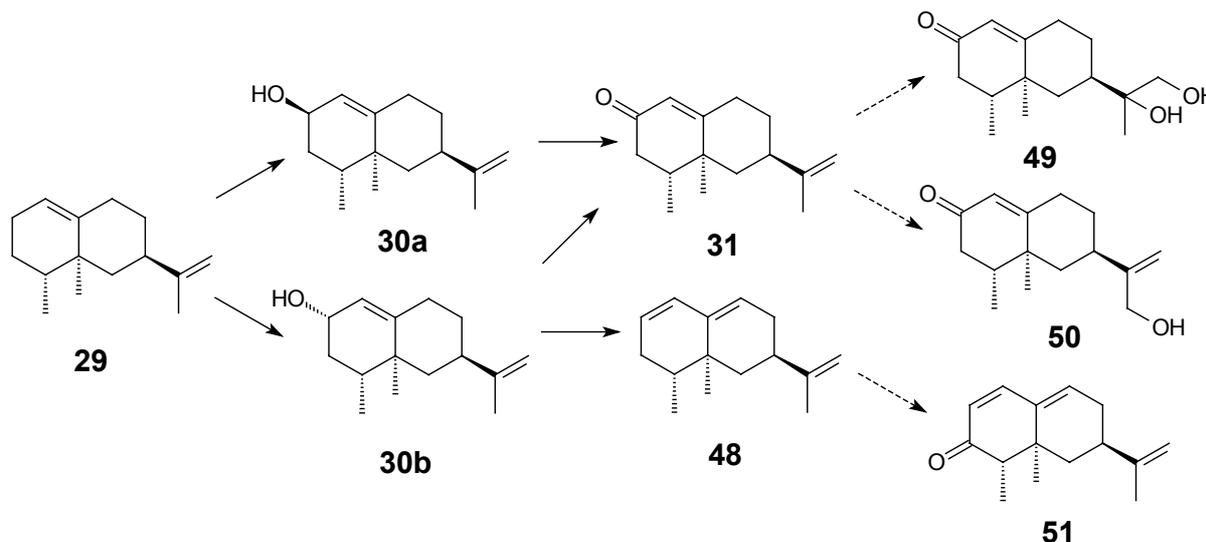


Abbildung 3-16: Biokatalytische Oxidation von (+)-Valencen (**29**) über α -/ β -Nootkatol (**30a/b**) zu Nootkaton (**31**) und weiteren Produkten mit *Aspergillus niger* (Noma *et al.*, 2001).

Interessant ist hierbei die Diolbildung am C-Atom 11 und 12 (**49**), die aus einer Epoxidierung des Nootkatons mit einer anschließenden Hydrolyse erklärbar ist.

Nootkaton wurde mit *Mucor plumbeus* zu den Stereoisomeren des 9-Hydroxynootkaton und mit *Cephalosporium aphidicola* zum 11,12-Dihydroxynootkaton biotransformiert (Arantes *et al.*, 1999). In diesem Fall zeigte das Edukt Nootkaton offensichtlich keine hemmende Wirkung auf die oxidativen Enzyme (Produkthemmung), wie es z.B. bei Cytochrom-P450-Monooxygenasen bekannt ist (Sime *et al.*, 2000).

Empirische Untersuchungen zur Oxidation von Sesquiterpenen wie Humulen, Selinen oder Patchoulol durch Mikroorganismen oder Pflanzenzellen zeigten übereinstimmend, dass eine stereoselektive Hydroxylierung von Sesquiterpenen nur schwer möglich erscheint (Miyazawa *et al.*, 1997; Aleu *et al.*, 1999; Abraham und Stumpf, 1986). Durchgeführte mikrobielle und von Pflanzenzellen katalysierte Transformationen von (+)-Valencen zeigt **Tab. 3-4**. Einzige selektive Valencenoxidation zu Nootkaton ohne Nennung näherer Details ist die Katalyse mit *Rhodococcus spec.* (Sime, 1998).

Tabelle 3-4: Transformationen von (+)-Valencen in Zellsystemen.

Organismus	Produkte (mit prozentualer Ausbeute bzgl. Valencen)	Referenz
<i>Enterobacter</i>	12% Nootkatol und 14 Produkte: Valencen-7,11-epoxid 4 β H,5 α -Eremophil-1(10)en,11-on	Dhavlikar und Albrotscheit, 1973.
<i>Rhodococcus</i>	Nootkatol	Okuda, 1994; Sime, 1998.
<i>Chlorella</i> und <i>Euglena</i> (Algen), <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium spec.</i>	Nootkatol, Nootkaton, Nootkatene, Hydroxy-, Dihydroxynootkatol (siehe Abb. 3-17)	Noma <i>et al.</i> , 2001.
<i>Citrus paradisi</i>	Nootkatol, 66% Nootkaton (0,5 mg L ⁻¹), Konstanter Nootkatongehalt über 72 h, Abbau nach Verarmung der C-Quelle	Drawert <i>et al.</i> , 1984; Reil, 1993.
<i>Cichorium intybus</i> (Microsomen)	5,1% β -Nootkatol 2,6% Valencen-12-ol 24,4% Nootkatol	de Kraker <i>et al.</i> , 2003.

Enzymatische Oxidationen mit Laccasen aus *Trametes spec.* zeigen eine leicht bevorzugte Bildung des β -Nootkatols, jedoch beträgt die Selektivität bezüglich des β -Nootkatols nur 53,5%. Hier scheint ein radikalischer Mechanismus vorzuliegen, da ein Zusatz von ABTS die Oxidation hemmt. ABTS fungiert in diesem Fall also nicht als Radikalstarter, sondern als Radikalfänger durch Generierung eines stabilen ABTS-Radikals (2.3.8.2). Nach allylischer Radikalbildung entsteht das allylische Oxidationsprodukt Valencen-2-hydroperoxid (**Abb. 3-17**; Huang *et al.*, 2001). Aufgrund der thermisch-chemischen Degradation des Hydroperoxids zum Nootkatol bei 55°C unter alkalischen Bedingungen (Huang *et al.*, 2001) stellt sich jedoch die Frage der Deklaration des gewonnenen Nootkatons als „natürlicher Aromastoff“. Eine thermische Behandlung zur Herstellung natürlicher Aromastoffe wird in der Aromenverordnung (2001) nicht erwähnt.

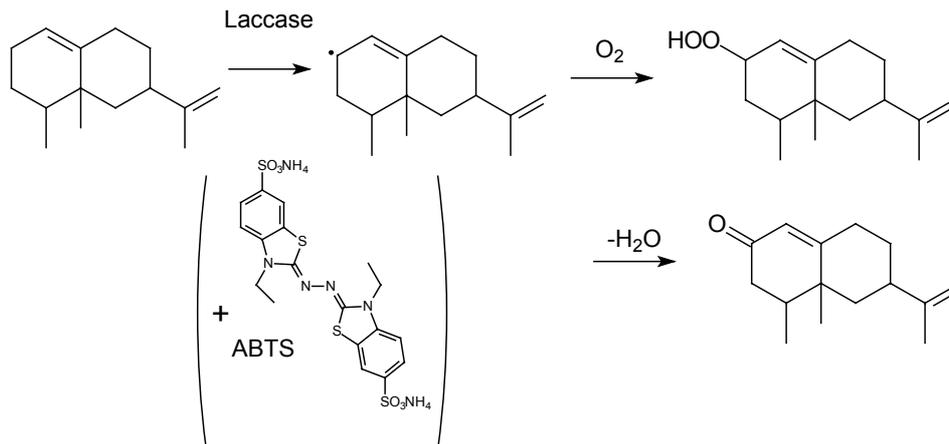


Abbildung 3-17: Bildung des Valencen-2-hydroperoxid über eine Laccase-katalysierte Oxidation (nach Huang *et al.*, 2001).

Eine Oxidation von (+)-Valencen zu Nootkaton kann auch indirekt mit Peroxidasen erzielt werden. Singulett-sauerstoff, welcher als eigentliches reaktives Oxidationsagens fungieren soll, wird von Peroxidasen aus *Phanerochaete chrysosporium* generiert (Willershausen, 1996). Durch Verwendung von Radikalfängern wie Diazabicyclooctan (DABCO) erfolgte dabei eine 98%ige Hemmung der Valencenoxidation (Willershausen, 1996). Wahrscheinlicher ist hierbei der Abfang eines Valencylradikals, das bei der radikalisch initiierten Oxidation entstehen kann (siehe auch **Abb. 3-17**). Die Transformation führte ebenfalls zu Nebenprodukten (Valencenalkohole). Die verwendeten Peroxidasen aus *P. chrysosporium* stellten Exoenzyme dar. Eine Oxidation von Valencen über Exoenzyme aus *Chaetomium globosum* ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungen unwahrscheinlich (2.2.7.4). Untersuchungen der Valencenbiotransformation im Ganzzellsystem mit *Chaetomium globosum* mit einer Zugabe des Radikalfängers Diazabicyclooctan führten ebenfalls nicht zu einer Inhibierung der Valencenoxidation (2.3.8.3), deshalb ist die Oxidation von Valencen über einen radikalischen Mechanismus wahrscheinlich nicht gegeben. Da die Transformation von Limonen wie auch Valencen im noch nährstoffreichen Medium unmittelbar einsetzt, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Valencentransformation mit *C. globosum* keine Induktion von Peroxidasen stattfand (2.2.3; 2.2.5.2; 2.3.3). Peroxidasen werden erst durch Stickstoffmangel im Nährmedium induziert (3.2.4.2).

Die Bildung von Nootkaton über die Katalyse von Lipoxygenasen stellt ebenfalls eine radikalisch initiierte Transformationsreaktion dar, wobei zunächst ein Fettsäureperoxid als aktives Agens gebildet wird (Muller *et al.*, 1998). Zu einem Reaktionsansatz wurde einer Mischung von (+)-Valencen und einer mehrfach ungesättigten Fettsäure mit 1-*cis*,4-*cis*-Pentadiensystem (z.B. Linolensäure) in einem wässrigen System (pH 8,5) unter leichtem

Sauerstoff-Überdruck eine Lösung von Lipoxygenase hinzugegeben (z.B. aus Soja). Insbesondere bei Erhöhung der Temperatur auf 70 °C wurde ein Umsatz von 40% (57 g kg⁻¹) Nootkaton und 9,5% (14 g kg⁻¹) Nootkatol erhalten. Das entstandene Lipidperoxid wird als Katalysator beschrieben und initiiert wahrscheinlich die radikalische Addition von Sauerstoff an Valencen zum Valencenhydroperoxid, das darauffolgend zu Nootkaton zerfällt.

3.3.1.3 Transformation von Farnesen

Das acyclische Sesquiterpen Farnesen stellt ein Isomerengemisch von drei verschiedenen Konfigurationsisomeren aus *trans*- α -Farnesen (**39**), *cis*- α -Farnesen (**40**) und β -Farnesen (**41**) dar (**Abb. 3-18**). Die Gewinnung von aromaaktiven Farnesenoxidationsprodukten, wie z.B. Sinensal (3.1.4) ist für die Aromaindustrie besonders interessant. Durch eine terminale Oxidation von **39** kann der Schlüsselaromastoff für Orangenaroma, α -Sinensal (**42a**) über das Intermediat Farnesen-12-ol (**43**) entstehen.

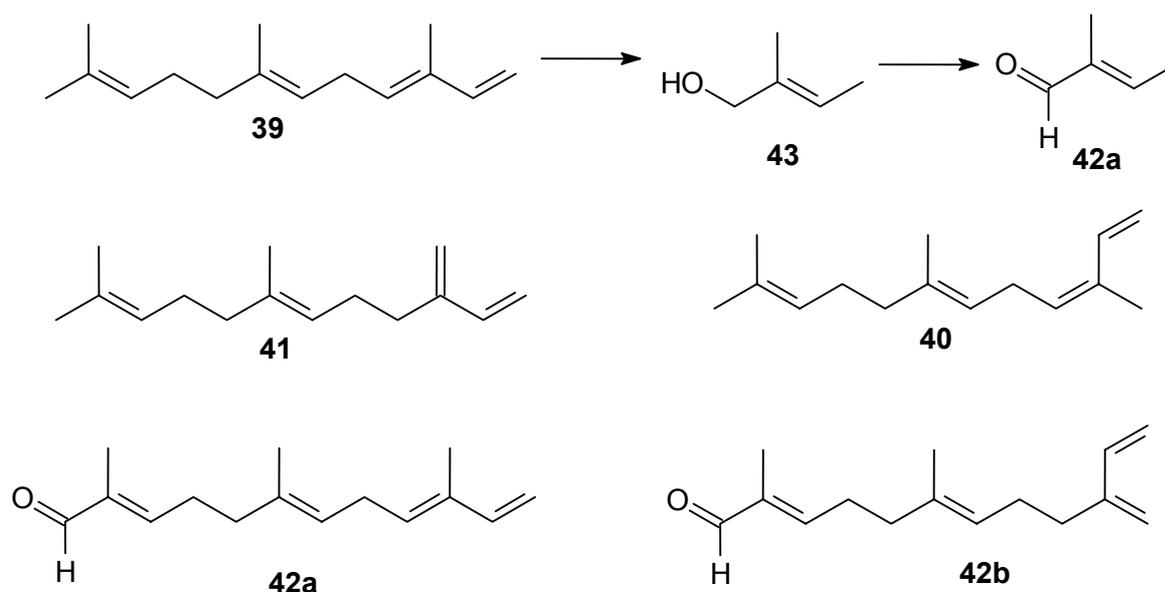


Abbildung 3-18: Isomere des Farnesen (**39-41**) und deren terminale Oxidation zum (all-E)- α -Sinensal (**42a**) und β -Sinensal (**42b**).

Mit *Chaetomium globosum* ist erstmals eine direkte biokatalysierte Oxidation von Farnesen mit bedeutender Produktakkumulation gelungen. Neben geruchsaktiven Farnesenalkoholen bildeten sich Dirole und Triole (2.4.5.2). Somit werden einfach hydroxylierte Produkte wahrscheinlich weitermetabolisiert (**Abb. 3-19**). Die Bildung des Hauptproduktes 7-Hydroxyfarnesen verläuft stereoselektiv und wird deshalb in 3.3.2.1 behandelt.

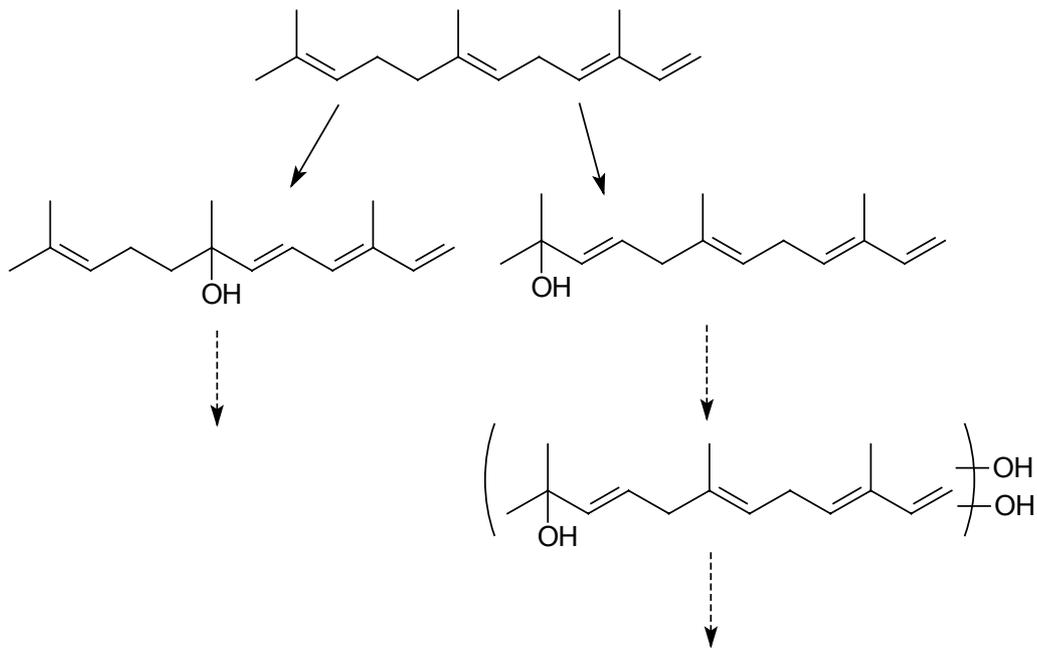


Abbildung 3-19: Metabolisierung von Farnesen mit *C. globosum*.

Untersuchungen zur mikrobiellen Farnesenoxidation mit Bakterien wie *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* und *Pseudomonas* führten nur zu geringer Produktbildung (Abraham *et al.*, 1992). Ein Verbrauch von Farnesen wurde angenommen, da konjugierte Doppelbindungen sensitiv für den Angriff von Singulett-Sauerstoff (Photooxygenierung Typ II) sind. Zum Schutz des konjugierten Diens vor dem Angriff wurden die Farnesenisomere mit Schwefeldioxid zum Sulfolen derivatisiert. Das Farnesenderivat wurde nachfolgend in ω -1-Position (C-Atom 12) mit einer Ausbeute von 27% zum 12-Hydroxysulfolen **52** hydroxyliert (**Abb. 3-20**).

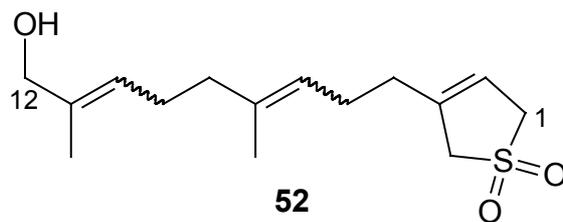


Abbildung 3-20: Oxidationsprodukt **52** aus sulfoniertem Farnesen (Abraham *et al.*, 1982).

Verschiedene Stämme transformierten ausschließlich die *E*- oder *Z*-Isomere zu verschiedenen Hydroxylierungsprodukten. Es wurde argumentiert, dass die Einführung einer polaren Gruppe als „Anker“ die selektive Farnesenoxidation um ein Vielfaches beschleunigte. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der Metabolisierung von (+)-Valencen beobachtet. Es wurden mehrfach oxidierte Transformationsprodukte wie Diole und Triole in der Transformation mit *Chaetomium globosum* gefunden (2.4.5.2), die sich wahrscheinlich

von gebildeten Monoalkoholen ableiten. Somit scheint eine beschleunigte Metabolisierung erst stattzufinden, wenn eine erste polare Alkoholfunktion in das stark unpolare Farnesenmolekül eingebaut ist. Die Wasserlöslichkeit erhöht sich hierbei von 0,98 auf 19 mg L⁻¹ (Meylan, 1995).

Außerdem sind Dehydratisierungen von Farnesol zu Farnesen bekannt, die von Zellsuspensionskulturen der Pflanze *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* katalysiert werden. Hierbei wurden Glycosilierungen beobachtet (Figuerdo *et al.*, 1996; Miyazawa *et al.*, 1996).

3.3.2 Regio- und enantioselektive Terpententransformationen

Die Selektivität einer Biotransformation kann in zwei Reaktionsarten eingeteilt werden:

Substratselektive Biokatalysatoren akzeptieren bevorzugt oder ausschließlich (spezifisch) Edukte mit einer bestimmten funktionellen Gruppe, einer bestimmten regiochemische Konfiguration oder nur ein bestimmtes Diastereomer oder Enantiomer.

Produktselektive Biotransformationen bilden dagegen Produkte mit bestimmter Regio- oder Stereochemie aus einer definierten Ausgangsverbindung. So kann ein Katalysator z.B. zwischen verschiedenen Enantiomeren eines Moleküls differenzieren und nur eines mit hoher Selektivität (Spezifität) bilden (Poppe und Novák, 1992).

Die regioselektive Einführung von Hydroxy- oder Carbonylfunktionen durch Chemosynthesen in chemisch ähnlichen C-Atomen in allylischer Stellung (sekundäre C-Atome 3 und 6 bzw. primäre 7 und 10 im Limonenmolekül) bildet eine große Herausforderung. Eine Sharpless-Oxidation von Limonen mit Selendioxid ist unselektiv und zeigt eine Mischung von Carveolen, Perillaalkohol, 10-Hydroxy-Limonen und 4-Hydroxy-Limonen (Jensen und Sharpless, 1975). Die Oxidation von Limonen mit Nitrosylchlorid mit anschließender allylischer Umlagerung ist eine der wenigen regio- und enantioselektiven Synthesen zur Herstellung von enantiomerenreinem (-)-Carvon mit *R*(+)-Limonen als Ausgangsverbindung (Royals und Horn, 1951). Nootkaton wird über die Oxidation von (+)-Valencen mit tertiär-Butylchromat (VI) hergestellt (Dauben *et al.*, 1969).

Dagegen können durch Biotransformationen enantiospezifische Hydroxylierungen durchgeführt werden, wie die Biogenese von (+)-*trans*-Carveol aus *R*(+)-Limonen (Duetz *et al.*, 2001) und eigene Arbeiten zeigen.

3.3.2.1 Regioselektive Limonentransformationen

Im Screening zur Biotransformation von Limonen zeigten drei Organismen besonders regioselektive Einführungen von Hydroxyfunktionen (2.2.2.2). Mit der Oxidation von Limonen zu α -Terpineol mit *Penicillium citrinum* wurde eine regiochemische Bevorzugung des C-Atoms 8 von 82,4% erzielt. α -Terpineol kann ebenfalls mit *Penicillium digitatum*, also einem Mikroorganismus aus derselben Familie, hergestellt werden (Tan *et al.*, 1998). Weitere selektive Transformationsreaktionen zur α -Terpineolgenese sind bekannt (Duetz *et al.*, 2003).

Die regioselektive Limonentransformation mit *Gongronella butleri* lieferte Perillaalkohol (Regioselektivität 59,8%; 2.2.2.2). Nebenbei hatte diese Transformationsreaktion den Vorteil,

dass eine Weiteroxidation zu Perillaaldehyd und Perillasäure nicht stattfand. Möglicherweise fehlt dem Organismus eine Alkoholdehydrogenase mit entsprechender Substratakzeptanz. Perillaalkohol wurde von anderen Organismen zumeist bis zur Perillasäure oxidiert (Dhavalikar *et al.*, 1966; Bowen, 1975; Chang und Oriel, 1994; Duetz *et al.*, 2001). Daher bietet sich die Limonentransformation mit *G. butleri* zur Herstellung von Perillaalkohol an.

Fusarium proliferatum oxidierte Limonen regioselektiv am C-Atom 6 zu Carveol (Bevorzugung 47,8%). Die regioselektive und auch enantioselektive Hydroxylierung von Limonen zu (+)-*trans*-Carveol gelingt mit *Rhodococcus opacus* (Duetz *et al.*, 2001). Bezüglich der Limonenhydroxylierung wurden auf dem Gebiet der Pflanzenzellkultivierung regioselektive Hydroxylierungen am C3 und C6 auf Enzymebene untersucht. Monooxygenasen aus *Mentha spec.* (Minze) bilden dabei Isopiperitenol, aus *Carum carvi* (Kümmel) Carveol (Bouwmeester *et al.*, 1999; Lupien *et al.*, 1999). Im Vergleich auf cDNA-Ebene zeigten die Sequenzen einer Limonen-3-hydroxylase und -6-hydroxylase eine hohe Übereinstimmung von 75% (siehe auch 3.3.2.3).

3.3.2.2 Regioselektive Farnesentransformation

Die regioselektive Oxidation von Farnesen (**39**) zum 7-Hydroxyfarnesen (**45**) wurde von *Chaetomium globosum* katalysiert (2.4.4). Seine Bildung lässt sich als ein Hydroxylierungsprodukt aus einem biochemisch generierten Carbokation- oder Radikalintermediat mit anschließender Isomerisierung der 6,7-Doppelbindung erklären (**Abb. 3-21**). Das intermediäre 7-Farnesenkation oder -radikal (**53**) besitzt durch die Ladungs- bzw. Elektrondelokalisierung über 7 C-Atome eine besondere Stabilität. Somit scheint eine mikrobielle Genese des kationischen/radikalischen Übergangszustandes initiiert zu werden, wonach sich der Alkohol aus rein thermodynamischen Gründen als stabilstes Produkt bildet (Anet, 1969).

Mit 0,26 mg h⁻¹ g⁻¹ Biotrockenmasse zeigte die Transformation eine beschleunigtere Bildungskinetik als sie bisher in dieser Arbeit bei der Limonen- oder Valencenbiotransformation beobachtet wurde. Ebenfalls zeigte die Transformationsreaktion zu **45** eine sehr hohe Regioselektivität bezüglich der Hydroxylierung in Position 7 von mehr als 99% für einzelne Stämme (z.B. Isolat aus Grapefruit).

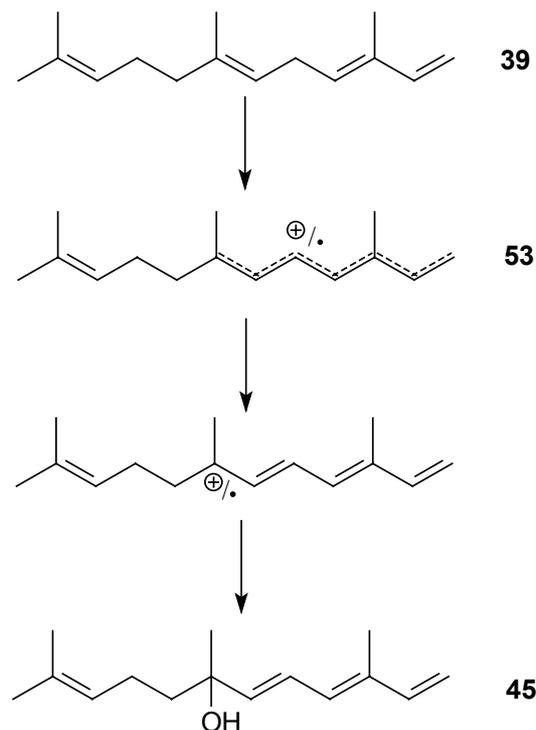


Abbildung 3-21: Bildung von 7-Hydroxyfarnesen (**45**) über die Umlagerung eines radikalischen/carbokationischen Übergangszustandes (nach Anet, 1969).

3.3.2.3 Enantioselektive Limonentransformation

Enantiomerenreines Carveol ist eine unverzichtbare Vorstufe zur Darstellung von enantiomerenreinem Carvon. Wird Carveol chemisch zu Carvon oxidiert, so ist vorher die Festlegung der Stereochemie am C-Atom 4 nötig. Eine enantioselektive Biotransformation eines Carveolisomerengemisches zu einem Carvon ist über die selektive Akzeptanz nur eines der vier Isomere als Substrat denkbar.

Die Transformation von *R*-(+)-Limonen mit dem Ziel der Herstellung eines enantiomerenreinen Carveols zeigte zunächst bei vielen Basidiomyceten wie auch Lyophilisaten die Bildung eines Gemisches von *cis*- und *trans*-Carveol mit in etwa gleichem Diastereomerenverhältnis (2.2.5.1; 2.2.8.1). So bildete auch *P. sapidus* ca. 40% des *trans*- und 60% des *cis*-Diastereomers (Onken und Berger, 1999). Ebenfalls wurden Carveolisomere neben weiteren Produkten mit *Penicillium digitatum* aus Limonen gebildet (Bowen, 1975). Die Genese des Racemats lässt sich durch Abstraktion eines Hydrids oder Wasserstoffatoms am C-Atom 6 und der Entstehung eines Carbokations oder Radikals erklären (Onken und Berger, 1999). Durch Isomerisierung der Position des stabilisierten Radikals/Kations gelingt durch Drehung der Symmetrieebene die Hydroxylierung in allen stereochemischen Orientierungen, so dass aufgrund von zwei Stereozentren vier

Konfigurationsisomere entstehen können (**Abb. 3-22**). Daher ist die festgelegte stereochemische *R*-Konfiguration des Limonens an C4 aufgehoben.

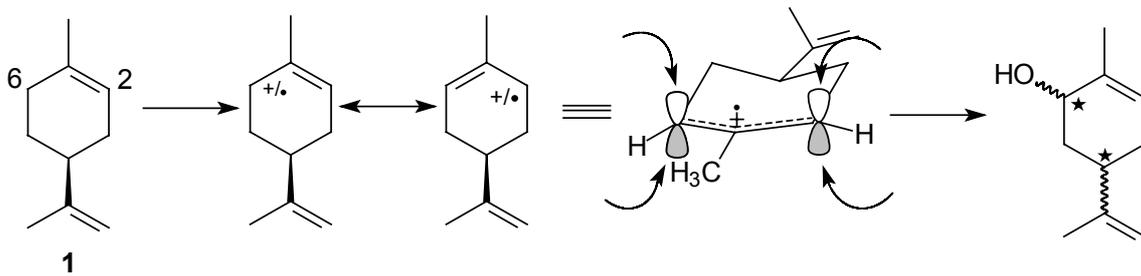


Abbildung 3-22: Überführung von Limonen (**3**) in alle vier möglichen Carveolkonfigurationsisomere über ein intermediäres Carbokation/Radikal.

Von den Basidiomyceten hob sich *Armillariella melea* ab, der *R*-(+)-Limonen überwiegend zu *trans*-Carveol transformierte (2.2.5.1).

Die Ascomyceten unterschieden sich von den Basidiomyceten durch eine wesentlich höhere Stereoselektivität der Carveolgenese. *Chaetomium globosum* und *Chaetomium cochloides* transformierten Limonen zum *cis*-Carveol mit über 90% ee. *Fusarium proliferatum* bildete das *cis*-(+)-Carveol sogar spezifisch mit einer Enantiomerenreinheit von 98,6% ee. Aus dem *S*-(-)-Limonen entstand zu 75% *trans*-(-)- und zu 21% *cis*-(+)-Carveol, der restliche Anteil entfällt auf die anderen zwei Stereoisomere (2.2.5.2). Das *cis*-(+)-Carveol ist bedingt durch seine stereochemisch annähernd planare Orientierung womöglich das stabilste Isomer (**Abb. 3-23**).

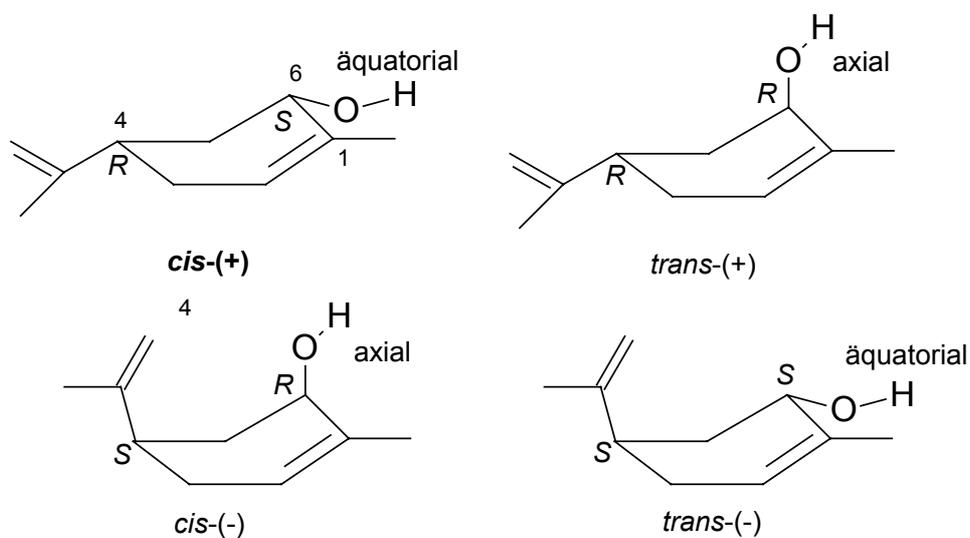


Abbildung 3-23: Dreidimensionale, planare Strukturen der Carveolisomere.

Die Herstellung von *cis*-(+)-Carveol mit *F. proliferatum* (Ausbeute 35 mg L⁻¹; 5,1 mol%) hob sich im Vergleich zu den weiteren untersuchten Mikroorganismen deutlich in ihrer hohen Stereo- und Regioselektivität der Biotransformation als Besonderheit ab.

Während *trans*-(+)-Carveol aus *R*-(+)-Limonen mit einem Umsatz von 15 U g⁻¹ Trockenmasse mit *Rhodococcus opacus* PWD4 enantiomerenrein und regioselektiv gebildet wurde (Duetz *et al.*, 2001), ist die Bildung von *cis*-(+)-Carveol bisher von vielen Nebenprodukten begleitet. So bildet *Aspergillus cellulosa* M-77 neben *cis*-Carveol Perillaalkohol, α -Terpineol und Limonen-1,2-diol (Noma *et al.*, 1992). *A. cellulosa* (synonym *A. fumigatus*) gehört zu Mikroorganismen der Gefahrenklasse II des Infektionsschutzgesetzes (2000) und erschwert somit die biotechnologische Anwendbarkeit. Die Herstellung von racemischem Carveol aus *R*-(+)-Limonen gelang durch die Transformation mit *Penicillium digitatum* (Bowen, 1975) und *Pleurotus sapidus* (Onken und Berger, 1999) mit bis zu 100 mg L⁻¹ Produktausbeute.

Eine genaue Aufklärung der Carveolgenese über die Hydridabstraktion am Limonen ist mit Markierungsexperimenten möglich, wenn die Wasserstoffatome am C3 oder C6 konfigurationspezifisch durch Deuterium ersetzt werden. Äußerst interessante Untersuchungen hierzu fanden auf dem Gebiet der stereoselektiven Hydroxylierung von Limonen in *Mentha spec.* statt (Wüst und Croteau, 2002).

Die Hydroxylierung von Limonen mit der Limonen-6-hydroxylase aus *Mentha spec.* (Bezeichnung: Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP71D18) hat je nach *R/S*-Konfiguration des Limonenmoleküls eine zu *F. proliferatum* entgegengesetzte Stereoselektivität der Produktbildung. So ergibt die Hydroxylierung von *R*-(+)-Limonen mit der Limonen-6-hydroxylase neben *cis*-(+)-Carveol auch *trans*-Carveole und ebenfalls Isopiperitenol und *cis*-Limonen-1,2-epoxid als Nebenaktivitäten. Ausschließlich *trans*-(-)-Carveol wird durch die Hydroxylierung von *S*-(-)-Limonen erhalten (Wüst und Croteau, 2002). Kinetische Studien der Hydroxylierung von in C6- und C3-Position stereoselektiv deuterierten Limonenmolekülen zeigten, dass die Dissoziationsenergie eines entstandenen *R*-(+)-Limonen-Enzym-Komplexes kleiner ist als die eines *S*-(-)-Limonen-Enzym-Komplexes. Somit erfolgt bei der Hydroxylierung von *S*-(-)-Limonen eine direkte Abstraktion des Hydrids (bzw. Deuterids) und eine Übertragung der Hydroxylgruppe zum enantiomerenreinen *trans*-(-)-Carveol in einem starren *R*-(+)-Limonen-Enzymkomplex. Dagegen ist der *R*-(+)-Limonen-Enzymkomplex weniger starr, wodurch das Limonenkation/-radikal mehr Bewegungsfreiheit im aktiven Zentrum besitzt. Es kann zu einer allylischen Umlagerung und sogar zur Molekülrotation um 180° kommen, so dass ebenfalls die C3-Position angegriffen wird und sich Isopiperitenol bildet (Abb. 3-24). Dies ist möglich, ohne dass dabei die

Isopropenylgruppe aus einer eventuell vorhandenen lipophilen Bindungsregion entfernt werden muss. Gleiches war auch bei der Transformation von *R*-(+)-Limonen mit *Fusarium proliferatum* zu beobachten. Es wurde ausschließlich *cis*-(+)-Carveol gebildet. Das am C-Atom 3 hydroxylierte Limonen trat ebenfalls auf und lässt somit einen weniger stabilen Substrat-Enzymkomplex vermuten, als er zwischen der Limonen-6-hydroxylase aus *Mentha spec.* mit *S*-(-)-Limonen auftrat.

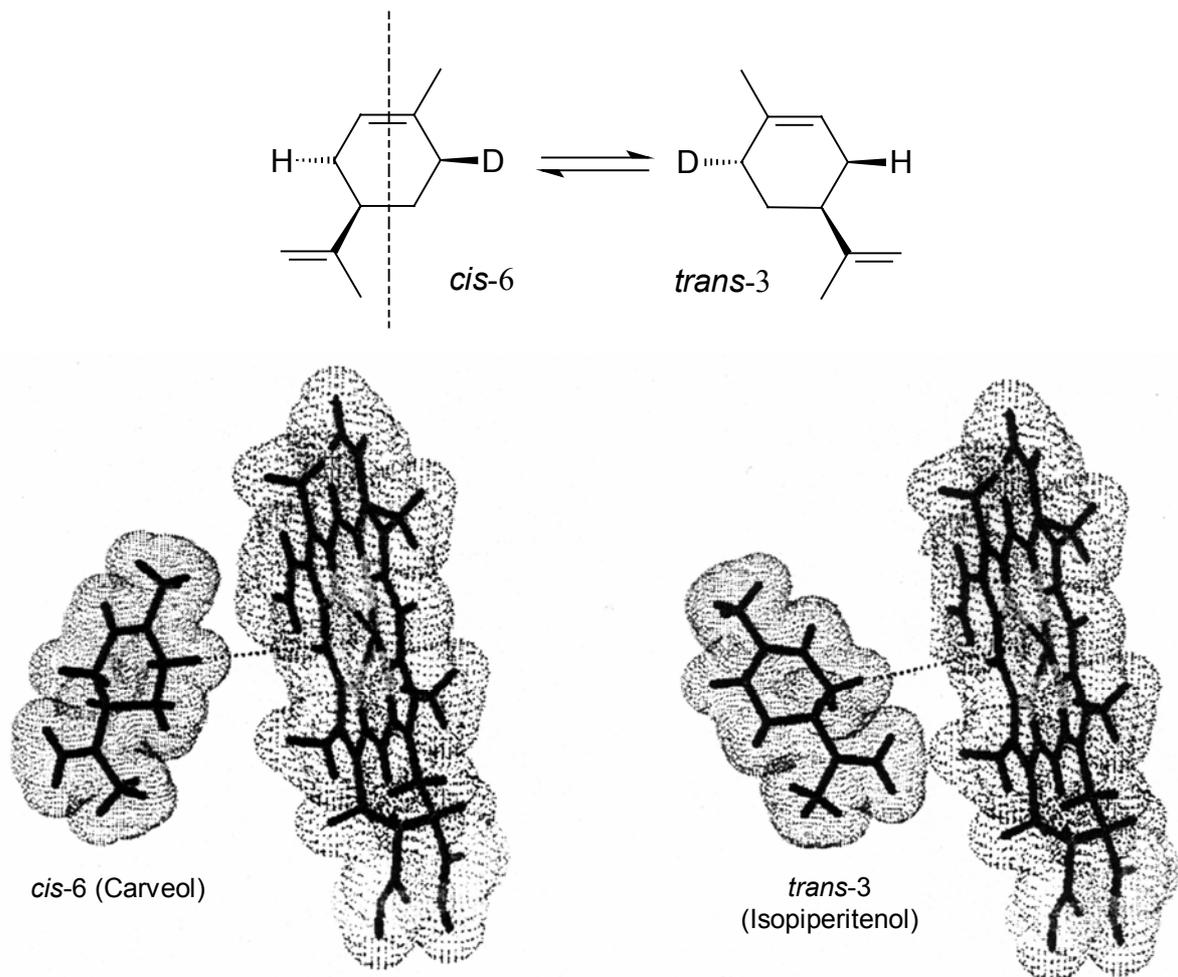


Abbildung 3-24: Mögliche Substratorientierung in einem Enzym-Substrat-Komplex mit deuteriertem *R*-(+)-Limonen als Substrat relativ zum zentralen Eisenatom im Häm nach einer Drehung um 180° (nach Wüst, 2002).

Es wurde ein nicht-dissoziativer Reaktionsmechanismus für die Limonen-6-hydroxylase angenommen, da das Substrat sich nicht, wie in einem dissoziativen Mechanismus, aus dem aktiven Zentrum herauslöst (**Abb. 3-25**), aber trotzdem eine Überführung der verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe ineinander möglich ist (Wüst und Croteau, 2002).

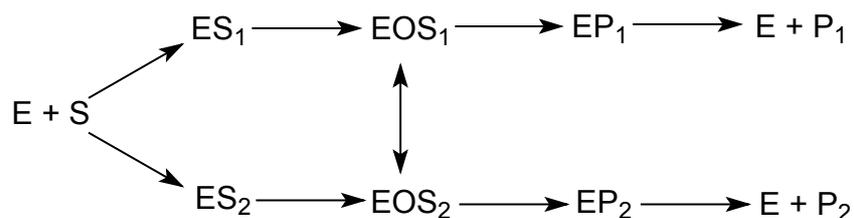


Abbildung 3-25: Nicht-dissoziative Enzymkinetik: E = Edukt, ES = Enzym-Substrat-Komplex, EOS = aktivierter Enzym-Substrat-Komplex nach der Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung (siehe 3.2.4.3) und der Freisetzung von Wasser, EP = Enzym-Produkt-Komplex, P = Produkt, die Indices 1 und 2 bezeichnen die jeweilige Orientierung der Substrate im aktiven Zentrum, die ineinander konvertierbar ist (Gilette *et al.*, 1994).

Da hier nur die Limonen-6-Hydroxylase aus *Mentha piperita* benutzt wurde, kann durch diesen Effekt die unterschiedliche Selektivität der Transformationsreaktion a) zu ausschließlich Carveol oder b) zu Isopiperitenol und Carveol mit demselben Enzym erklärt werden (Wüst und Croteau, 2002). In *Mentha spec.* ist die regioselektive Hydroxylierung in C3 oder C6 von der Substitution einer einzigen Aminosäure und somit einer veränderten Umgebung im aktiven Zentrum abhängig (Schalk und Croteau, 2000). Diese könnte durch zielgerichtete Mutagenese verändert werden. Ebenfalls wurden Hydroxylasen aus *Rhodococcus erythropolis*, die sowohl S- wie auch R-Limonen akzeptieren, bei chromatographischen Trennungen in denselben Fraktionen gefunden. Sie erwiesen sich beide als stereoselektiv gegenüber R- bzw. S-Limonen (van den Werf *et al.*, 1999).

Eine enantiospezifische Hydroxylierung von R-(+)-Limonen zu *trans*-(+)-Carveol ohne Bildung von Nebenprodukten gelang bisher nur mit *Rhodococcus opacus* (Duetz *et al.*, 2001), dessen Mechanismus im Detail bisher nicht publiziert wurde. Interessant ist hierbei ebenfalls die Co-Metabolisierung von Toluol und Limonen, wodurch die Involvierung von toluolinduzierten Monooxygenasen nahe liegt und eventuell eine Parallelität zwischen Toluol- und Limonenmetabolismus vorhanden sein kann (Tay *et al.*, 2001; Duetz *et al.*, 1994; Duetz *et al.*, 1996).

3.3.2.4 Substratselektive Dehydrogenierung von Carveol

Sowohl *cis*-(-)- als auch *trans*-(-)-Carveol besitzen zwar minzähnliches Aroma, jedoch haben sie eine erheblich höhere Geruchsschwelle als das Keton R-(-)-Carvon und sind deshalb für die Verwendung als Aromastoff weniger geeignet. Sie können mit Dehydrogenasen zu ihrem korrespondierenden Carvonen oxidiert werden (**Abb. 3-26**). Wie aus 2.2.5 ersichtlich, ist die enantiomerenreine Herstellung sowohl des *cis*-(+)-Carveol (mit *Fusarium proliferatum*,

Transformationsweg 4) wie auch des *trans*-(+)-Carveol (*Rhodococcus opacus*, Transformationsweg 3, Duetz *et al.*, 2001) durch Biotransformationen aus reinem *R*-(+)-Limonen möglich. Beide Isomere führen nach Oxidation mit Dehydrogenasen zu enantiomerem *S*-(-)-Carvon. *Fusarium proliferatum* bildete aus *S*-(-)-Limonen ebenfalls *trans*-(-)-Carveol, welches aber in geringerer Enantiomerenreinheit entstand. Somit ist eine Herstellung von enantiomerenreinem *S*-(+)-Carvon ebenfalls denkbar (2.2.5.1, Transformationsweg 2).

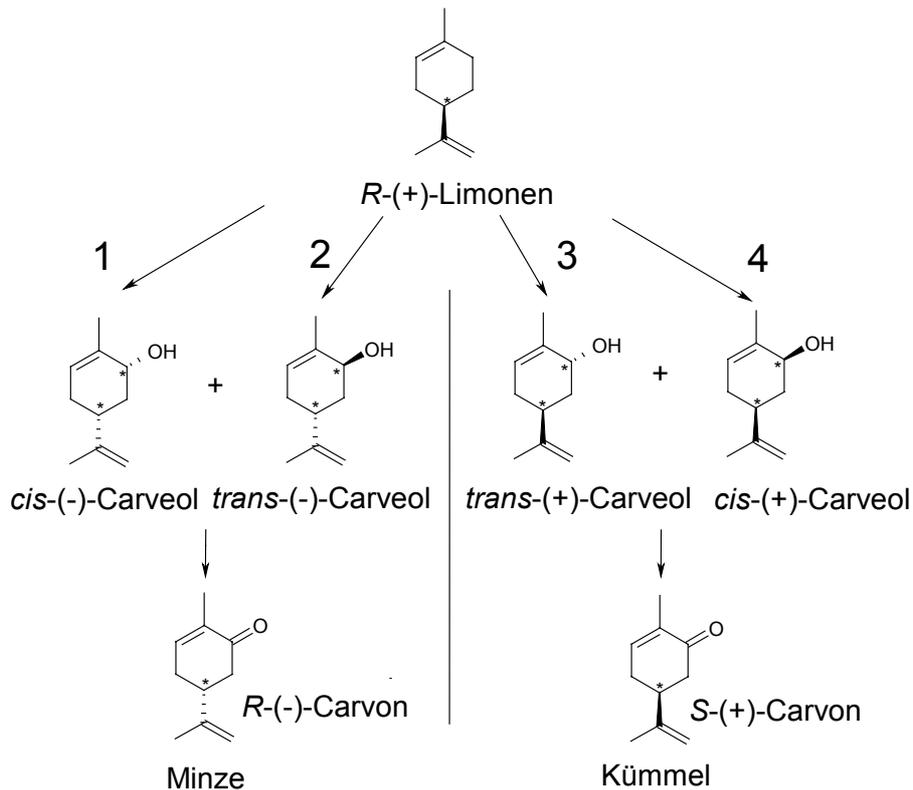


Abbildung 3-26: Herstellung von enantiomerenreinem Carvon durch enantioselektive Hydroxylierung des Substrates Limonen und nachfolgender Dehydrogenierung (Transformationswege *Pleurotus sapidus* 1,2,3,4, *Rhodococcus opacus* 3, *Fusarium proliferatum* 4).

Die Biooxidation eines Gemisches aus *cis*-(-)-Carveol und *trans*-(-)-Carveol wurde untersucht, um einen Katalysator für den zweiten Schritt einer zweistufigen Biosynthese, die Oxidation zum Carvon (Schritt 2; **Abb. 3-26**), zu erhalten. Mit *Pleurotus sapidus* bildeten sich bis zu 200 mg L⁻¹ enantiomerenreines *R*-(-)-Carvon (ee >99,5%; 2.2.6).

Die Dehydrogenaseaktivität von *P. sapidus* zeigte eine Substratbevorzugung bezüglich des *trans*-(-)-Carveol (6*S*). Es wurde wesentlich besser dehydriert als das *cis*-(-)-Carveol (6*R*, > 94% im Gegensatz zu 55% des 6*S*-Isomers, siehe **Abb. 3-23**). Dieselbe Substratspezifität zeigte ebenfalls eine Carveoldehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Sie metabolisierte von den beiden Stereoisomeren des (-)-Carveol selektiv nur das *trans*-(-)-

Carveol zu Carvon (van den Werf *et al.*, 1999). Bei der Carveoldehydrogenase handelt es sich um ein Homotetramer, das sich aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 29,5 kDa zusammensetzt. Jede Untereinheit besitzt eine NAD⁺-Bindungsstelle und einen flexiblen C-Terminus, welcher in die Substratbindung von Monoterpenen involviert ist. Die Gewinnung eines reinen Carveolisomers durch selektive Oxidation nur eines Diastereomeres ist somit möglich und für *R. erythropolis* beschrieben (Tecelao *et al.*, 2001).

Da jedoch Ganzzellsysteme in Submerskulturen und nicht isolierte Enzyme verwendet wurden, ließen sich Nebenaktivitäten durch Reduktasen anhand der Bildung der Reduktionsprodukte Dihydrocarvon und Dihydrocarveol beobachten (2.2.6). 1,6-Dihydrocarvon kann aus der Reduktion der 1,6-Doppelbindung über eine Carvon-1,6-Reduktase (Transformationsweg 3; **Abb. 3-27**) oder aber über ein intermediär gebildetes Dihydrocarveol aus einer Carveol-1,6-Reduktase und anschließender Oxidation mit einer Dehydrogenase gebildet werden (1 und 4; **Abb. 3-27**). Beide Transformationswege sind plausibel, da sowohl große Mengen an Dihydrocarveol (~300 mg L⁻¹) und Carvon (200 mg L⁻¹) gebildet wurden und das Dihydrocarvon ebenfalls mit 80 mg L⁻¹ auftrat. Zur genauen Aufklärung des Transformationsweges wäre eine Studie mit isotope markierten Intermediaten z.B. des 6-D-Dihydrocarveol notwendig.

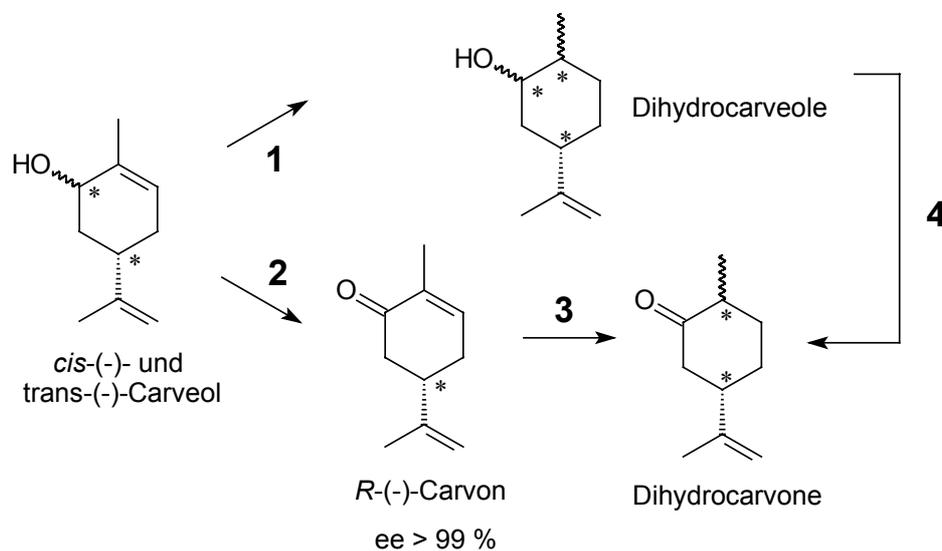


Abbildung 3-27: Postulierte Genese von Nebenprodukten der Carveoltransformation (mögliche involvierte Enzym[neben]aktivitäten: 1: Carveol-1,6-Reduktase, 2: Carveoldehydrogenase, 3: Carvon-1,6-Reduktase, 4: Dihydrocarveol-dehydrogenase).

Die Nebenaktivitäten von Carveoldehydrogenasen wurden schon für isolierte Enzyme beschrieben. So wurde mit einer Carveoldehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL

14 eine relative Substrataktivität für Dihydrocarveole von 20% bezüglich der Carveolspezifität gefunden (van der Werf *et al.*, 1999). Sowohl die Oxidation von Carveol wie auch die von Dihydrocarveol zu (Dihydro-)Carvon findet NAD⁺- und Dichlorphenolindophenol-abhängig statt (van der Werf und de Bont, 2000). Weitere Dehydrogenaseaktivitäten insbesondere für ringständige Hydroxygruppen wurden nachgewiesen, während terminale Alkohole wie Perillaalkohol kaum umgesetzt wurden.

3.3.2.5 Enantioselektive Valencentransformation

Die Biotransformationen der Sesquiterpene Selinen, β -Bisabolen und Patchoulol (Miyazawa *et al.*, 1997; Busmann, 1994; Aleu *et al.*, 1999) zeigten eine bevorzugte Bildung von Diolen, allylischen, sekundären und tertiären Alkoholen (Lamare und Furstoss, 1990). Jedoch sind enantioselektive Sesquiterpentransformationen bisher wenig untersucht.

Chaetomium globosum katalysiert die Oxidation von (+)-Valencen über Nootkatol zum Nootkaton mit stereochemischer Bevorzugung des axial hydroxylierten β -Nootkatols (78% ee; 2.3.8.1). Neben einem Valencen-11,12-epoxid ist das β -Nootkatol einziges allylisches Hydroxylierungsprodukt, obwohl ebenfalls eine Hydroxylierung der allylischen Positionen C7, C9 und C13 denkbar wäre (2.3.4). Somit liegt hier eine Regioselektivität und Enantioselektivität der Hydroxylierungsreaktion vor.

Mit der Hemmung der Bildung von Nootkaton und seines Abbauproduktes Epoxynootkaton durch den Cytochrom-P450-Monooxygenase-Inhibitor SKF (Proadifen) (2.3.8.3) liegt eine Involvierung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen nahe, die die Hydroxylierung von lipophilen Substraten katalysiert (van den Brinck, 1998). Ein weiteres Indiz hierfür ist die Entstehung des Intermediates Nootkatol sowie des Valencen-11,12-epoxid als weitere typische Aktivität einer Monooxygenase.

Eine stereochemisch analog zur Transformation mit *C. globosum* verlaufende Oxidation von (+)-Valencen über β -Nootkatol zu Nootkaton wurde von Mikrosomen, die aus Zichorien isoliert wurden, katalysiert (de Kraker *et al.*, 2003). Hierbei zeigte sich ebenfalls eine ausschließliche Bildung des β -Nootkatols. Die Genese von α -Nootkatol wurde nicht beobachtet (**Abb. 3-28**). Die Genese verlief NAD(P)H abhängig, eine Involvierung der microsomalen Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde angenommen.

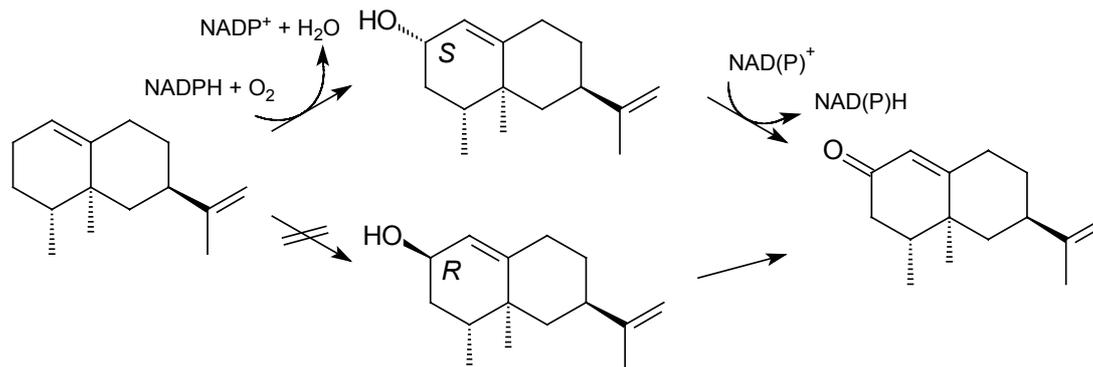


Abbildung 3-28: Transformation von (+)-Valencen über das β -Nootkatol mit Mikrosomen aus *Cichoriae sp.* (de Kraker, 2003).

Mit enzymatischen Umsetzungen oder vorbehandelten Zellen wurden dagegen höhere und selektivere Produktbildungen erreicht (2.3.12). Die Oxidation von Valencen mit Lyophilisaten aus *Pleurotus sapidus* führte ebenfalls zu einer selektiven Hydroxylierung von Valencen in axialer Position (ca. 80% ee; 2.3.8.1). Sie verläuft aber nicht über ein Valencen-2-hydroperoxid als Intermediat, wie es z.B. von Huang *et al.* (2001) bei der Transformation von Valencen mit Laccasen aus *Trametes spec.* beschrieben wurde (2.3.8.2).

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Transformation nicht von Cofaktoren abhängig ist (2.3.12.3). Eine Inhibierung der Transformation bei Zusatz von NADPH und NADH wurde beobachtet, wobei eventuell ein anderer für die Transformation essentieller Cofaktor reduziert wird. Insbesondere die fehlende Monooxygenasen-Inhibierung durch Proadifen lässt vermuten, dass die Transformation mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* mechanistisch womöglich über eine andere Enzymkatalyse verläuft als bei *C. globosum*. Die Involvierung einer flavinunabhängige Monooxygenase oder Laccase wäre möglich (3.2.4.2).

Die bevorzugte Bildung von β -Nootkatol ist aus stereochemischen Gründen eher ungünstig, da im Gegensatz zu einer äquatorialen α - die axiale β -Stellung der Hydroxygruppe mit der Methylgruppe eine sterische Hinderung darstellen könnte. Andererseits wäre ein sechsgliedriger, stabilisierender Ring über das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs und des partiell positiv geladenen Wasserstoffs der Methylgruppe möglich (**Abb. 3-29**). Die chemische Reduktion von Nootkaton liefert überwiegend α -Nootkatol. Hier kann die Methylgruppe an C-4 dirigierend auf die Orientierung des Reduktionsreagenzes wirken. So bildet sich ein Natriumbornootkatolat-Komplex als Übergangszustand eventuell in äquatorialer Orientierung aus.

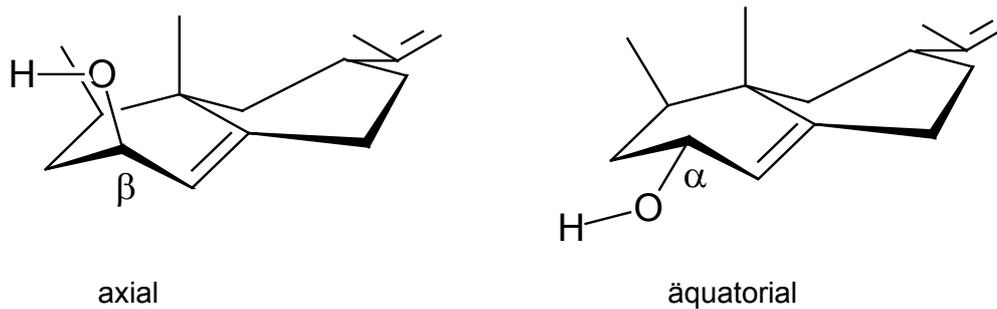


Abbildung 3-29: Dreidimensionale Struktur des β -Nootkatols (axiale Position der Hydroxygruppe) und α -Nootkatols (äquatoriale Position).

Eine bevorzugte Hydroxylierung von Valencen in axialer β -Position kann deshalb nicht allein durch stereochemische Dirigierung begründet werden, da ebenfalls eine racemische Nootkatolbildung durch Autoxidation beobachtet wurde (2.3.1). Die Orientierung des (+)-Valencen im aktiven Zentrum des Enzyms kann eine entscheidende Rolle in der regioselektiven Hydroxylierung spielen. Ein Erklärungsansatz wäre über die Substratdissoziation im aktiven Zentrum möglich (siehe 3.3.2.3). Ebenfalls könnte eine Molekülorientierung durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer hydrophoben Bindungsregion am aktiven Zentrum von Bedeutung sein, die eine Ausrichtung des Substratmoleküls anhand der Isopropenylgruppe ermöglicht. Die Hydroxylierung findet somit auf der dem Isopropenylrest entgegengesetzten Seite statt. Dies war auch bei der Limonhydroxylierung zu beobachten (Trudgill, 1994). Eine genau definierte Substratorientierung kann durch eine spezifische Bindungsregion aus den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Leucin und Valin auf der gegenüberliegenden Seite des katalytisch aktiven Häms mit Tyrosin als ausschlaggebende polare Aminosäure dirigiert werden. Sie ist z.B. bei der stereospezifischen Hydroxylierung von Campher durch die P450_{cam}-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* beschrieben worden (Poulos und Howard, 1987; Gotoh, 1992). Für dieses Enzym liegen detaillierte Röntgenstrukturanalysen vor.

Zusammenfassung für 3.3:

Nach der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse scheinen zwei unterschiedliche Wege für die hier gezeigten Limonen- und Valencentransformationen verantwortlich zu sein:

- Die stereoselektive Hydroxylierung von Limonen mit *Fusarium proliferatum* scheint mechanistisch ähnlich zu der Limonenhydroxylierung in *Mentha spec.* über Cytochrom-P450-Monooxygenasen zu verlaufen. Die cofaktorabhängige stereoselektive Katalyse der Valencenoxidation mit microsomalen Cytochrom-P450-Monooxygenasen und anschließender Oxidation durch Dehydrogenasen zum Nootkaton ist wahrscheinlich. Pilze wie *Chaetomium globosum* und auch Pflanzen scheinen diesen Reaktionsweg in Ganzzellkultivierungen zu besitzen.
- Die stereoselektive Nootkatolgenese mit Lyophilisaten aus *Pleurotus sapidus* verläuft offensichtlich nicht über eine Cytochrom-P450-Monooxygenase. Sie ist cofaktorunabhängig. Enzyme wie z.B. flavinhaltige Monooxygenasen könnten hierfür verantwortlich sein. Diese Oxidasen enthalten kein Häm im aktiven Zentrum, epoxidieren terminale Olefine und hydroxylieren Kohlenwasserstoffe (Holland, 1992).
- Zusätzlich liegt eine, von verschiedenen Basidiomyceten und von Lyophilisaten des *Pleurotus sapidus* katalysierte, eventuell radikalisch initiierte Oxidation von Limonen vor. Diese wird wahrscheinlich von unselektiven Cytochrom P450 Monooxygenasen (Onken, 1999), Laccasen oder Peroxidasen katalysiert. Sie besitzt einen ähnlichen Mechanismus wie die Autoxidation, findet aber beschleunigt statt. Die Oxidation von Valencen mit Laccasen aus *Trametes spec.* verläuft ebenfalls radikalisch, jedoch nicht über ein Valencen-2-hydroperoxid.

3.4 Bioprozessrelevante Untersuchungen zur Valencen- transformation

3.4.1 Probleme der Terpenbiotransformation

Die Transformation des Sesquiterpens (+)-Valencen wurde auf den Einfluss relevanter Prozessparameter mit dem Ziel der Produktmaximierung untersucht. Hierbei traten Parallelen zur Transformation von Monoterpenen auf, die vergleichend diskutiert werden. Während die Schwierigkeiten der Monoterpentransformation schon eingehender untersucht wurden (van der Werf, 1999; Onken, 1998; Schrader und Berger, 2001), sind in der Literatur nur wenige Transformationen von Sesquiterpenen auf ihre Schwierigkeiten hin detailliert beschrieben worden.

Die größten Schwierigkeiten, die bei Terpenbiotransformationen auftreten und die Produktbildung limitieren, sind in **Tab. 3-5** zusammen gefasst. Die aufgezeigten Lösungsmöglichkeiten werden bei den Untersuchungen zur Valencentransformation berücksichtigt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur Transformation von (+)-Valencen standen im Wesentlichen folgende Parameter:

- Untersuchungen zur Menge und Form der Substratzugabe,
- Charakterisierung der Produktverteilung und Transformation in binären Systemen,
- Untersuchungen zur Nährstoffzufuhr und Terpen-(co-)metabolisierung,
- Variation und Behandlung der Biomasse.

Tabelle 3-5: Probleme der Terpenbiotransformation und untersuchte Lösungsmöglichkeiten.

Problem	Gründe	Lösungsmöglichkeiten	Referenzen
chemische Instabilität	hoher Sauerstoffgehalt pH-Wert	Regulierung von Sauerstoffzehrung und pH-Wert, anaerobe Kulturführung, organische Phasen	Abraham <i>et al.</i> , 1985 Heyen und Harder, 2000 Tan und Day, 1998
geringe Löslichkeit	hoher logP-Wert	Emulsionen, binäre Systeme	Westgate <i>et al.</i> , 1998
Toxizität	Phasen- / Substrattoxizität	2-Phasenkultivierung, sensorgestützte Substratdosierung und on-line-Monitoring, Substratinduktion und -adaptation	Doig <i>et al.</i> , 1998; Carvalho <i>et al.</i> , 2002 Schäfer <i>et al.</i> , 2002 Onken und Berger, 1999
lediglich transiente Produktakkumulationen	Produktmetabolisierung, Nebenaktivitäten	<i>in situ</i> Adsorption, sequenzielle Dosierung, Klonierung und <i>knock-gut</i> unselektiver Oxidasen	Krings <i>et al.</i> , 1993; Berger <i>et al.</i> , 2000 Savithity und Oriel, 1998
Flüchtigkeit	hoher Dampfdruck	Membranbegasung, Substratdosierung über Gasphase	Onken, 1998 Onken und Berger, 1999
unselektive Katalyse und Nebenprodukte	unselektive Enzyme	Klonierung und Überexpremierung, Mutagenese des aktiven Zentrums	Oriel <i>et al.</i> , 1997 Savithity und Oriel, 1998
geringe Produktkonzentration und Ausbeute	Feedback-Hemmung, geringe Verfügbarkeit	Anreicherungskulturen, Biokatalysator aus Protoplastenfusion	van Rendsburg <i>et al.</i> , 1997 Vidya und Agrawal, 2003
lange Inkubationszeiten	lange Expressionszeiten	Klonierung, UV-Mutagenese	Agrawal <i>et al.</i> , 1999

3.4.2 Substratdosierungsstrategien

Terpene und Terpenoide sind als Inhaltsstoffe der etherischen Öle bekannt für ihre antimikrobielle Wirkung (Griffin *et al.*, 1999; siehe auch 3.1.3). Die toxische Wirkungsweise beruht darauf, dass sie sich als lipophile Substrate sehr gut in der Zellmembran von Mikroorganismen lösen und dabei die Membranintegrität und folglich die Membranfunktion stören. Ebenfalls nimmt die Membranfluidität zu. Die Zerstörung der Membranintegrität führt zu einer Hemmung und im extremen Fall zur Entkopplung der membranständig lokalisierten Elektronentransportketten, die wiederum den Zusammenbruch des Protonengradienten und Abbruch der Phosphorylierung von ADP zur Folge haben (Heipieper *et al.*, 1994; Stryer, 2003). So kommt nachfolgend der Energiestoffwechsel zum Erliegen. Ebenfalls werden membrangebundene Enzymsysteme wie Cytochrom-P450-Monooxygenasen durch die Erhöhung der Membranfluidität gestört. Hier sind schon leichte Fluiditätsänderungen wirksam, da für eine Elektronübertragung am Cytochrom ein langlebiger Enzym-Substrat-Komplex vorhanden sein muss (Osborne *et al.*, 1990).

Als ein Maß für die *molekulare* Toxizität, d.h. die Toxizität von gering konzentrierten Verbindungen, auf einen Mikroorganismus wird der Verteilungskoeffizient zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase bestimmt. Dieser wird durch den dekadischen Logarithmus des n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{OW}$) ausgedrückt. Es gilt, dass die Aktivität eines Biokatalysators ein Minimum durchläuft, das bei Enzymaktivitäten bei einem $\log P_{OW}$ von 0 bis 2, bei Ganzzellkatalyse zwischen 3 und 5 liegt (Laane *et al.*, 1987; Tan und Day, 1998b). Bei stark lipophilen oder stark hydrophilen Substraten steigt die Katalysatoraktivität wieder an.

Eine kritische Substratkonzentration in der Zellmembran wird überschritten, wenn ein Terpen wie Limonen in einem Gehalt von mehr als 16 g L^{-1} vorliegt (Griffin *et al.*, 1999). Die Ausbildung einer zweiten Phase kann die Lyse von Zellen bewirken, weshalb man diesen Effekt auch als *Phasentoxizität* bezeichnet. Die Wasserlöslichkeit der Substrate ist hierbei offensichtlich nicht entscheidend, da die Konzentration weit über der Terpenlöslichkeit liegt. Eher kann hier eine Art Substrattoleranz oder beschränkte Aufnahmekapazität der Zellen bezüglich des Terpensubstrates interpretiert werden (Griffin *et al.*, 1999).

Limonen gehört mit einem $\log P_{OW} < 5$ zu den toxischen Terpenen, während Sesquiterpene mit einem $\log P_{OW} > 5$ weniger toxisch wirken (**Tab. 3-6**).

Tabelle 3-6: LogP_{OW} und Wasserlöslichkeit der Terpensubstrate und verwendeter Lösungsmittel (berechnet nach Meylan und Howard, 1995).

Terpene	logP _{Terpen}	Löslichkeit [mg L ⁻¹]	Lösungsmittel	logP _{Lsm.}
R-(+)-Limonen	4,03	22,3	Decan	5,67
(+)-Valencen	6,16	0,5	Hexadecan	8,15
Farnesen	6,04	1,0	Isooctan	4,67

So wurde beobachtet, dass das Wachstum von *Chaetomium globosum* bei einer Zugabe von (+)-Valencen stagnierte (2.3.3), jedoch keine Abnahme der Biomasse durch Zellyse, wie bei der Limonentransformation mit *Pleurotus sapidus* eintrat (Onken, 1998), eintrat. Dies wurde auch durch Messungen der Sauerstoffzehrung von Pilzkulturen nach Terpenzugabe bestätigt (Schäfer *et al.*, 2002). *C. globosum* blieb nach Valencendosierung vital, während *P. sapidus* nach Limonendosierung keine Zehrung mehr zeigte. Somit wirkte Limonen toxisch auf Zellkulturen von z.B. *P. sapidus*.

Verschiedene Substratdosierungsmethoden wurden in der Valencentransformation mit *Chaetomium globosum* getestet:

Durch eine direkte Dosierung von (+)-Valencen oberhalb der Löslichkeit (**Tab. 3-6**) im Bereich von 2,5 bis 24 mM (0,5-5 g L⁻¹) wurde die Nootkatonausbeute von ca. 0,5 mol% nicht überschritten (2.3.9.6). Da die Terpene hauptsächlich im Mycel akkumulierten (3.4.3), scheint jedoch die Löslichkeit des Precursors nur von geringer Bedeutung zu sein. Jedoch stieg die absolute Produktmenge an, was auch bei der Transformation von Limonen zu Carvon im gleichen Substratkonzentrationsbereich beobachtet wurde (Busmann, 1994). Eine Substratdosierung über den Dampfraum war aufgrund des geringen Dampfdrucks des (+)-Valencen im Vergleich zum R-(+)-Limonen nicht möglich, da das Terpen ungenügend in das Kulturmedium eingetragen wurde (2.3.9.4). Bei der Limonentransformation zeigte die kontinuierliche Sättigung des Kopfraumes mit Precursor eine geringere Limonenkonzentration im Kulturmedium, da diese durch das Verteilungsgewicht zwischen Kopfraum und Medium limitiert wird. Daraus resultierte eine gesteigerte Produktbildung (Onken und Berger, 1999).

Eine Substratzugabe in Emulsionen wurde ebenfalls untersucht. Bei der Biotransformation von schwerlöslichen Substraten wie Terpenen werden Emulgatoren als Lösungsvermittler verwendet und erhöhen die Substratverfügbarkeit durch Emulsionsbildung. Durch Aufbrechen der Terpentropfen und Überführung in kleine Micellen kann die

Tröpfchenoberfläche für einen Enzymangriff oder für eine Substrataufnahme über Endocytose oder Absorption erhöht werden (Onken, 1998). Um eine effektive und stabile Substratemulgierung erreichen zu können, muss die Emulgatorkonzentration so gewählt werden, dass die kritische Micellenbildungskonzentration (*critical micellar concentration* = CMC) überschritten wird. Die CMC gibt die minimale Micellenkonzentration an, die für eine stabile Emulsion notwendig ist. Während niedrige Emulgatorkonzentrationen zu einer Schädigung der Zellmembran durch eine Permeabilisierung führen, sind hohe Konzentrationen für die Bildung stabiler Emulsionen geeignet. Ebenfalls kann Energie in Form von Wärme, Homogenisieren oder Ultraschall zugeführt werden, um durch Überwindung der stabilisierenden Grenzflächenenergie große Micellen in kleine zu überführen (hier $<0,2 \mu\text{m}$; McClements, 1999). Die Erwärmung einer Lösung erniedrigt deren Viskosität und ebenfalls die Grenzflächenenergie von Emulsionen. Durch Erhalt kleiner Substratmicellen nach Homogenisieren werden stabile Emulsionen gewonnen.

Zusätzlich muss der HLB-Wert (*hydrophile lipophile balance*) eines Emulgators, der die Hydrophilie eines Tensids beschreibt, berücksichtigt werden. Mit HLB-Werten von größer 8 wurden Emulgatoren verwendet, die Öl-in-Wasser-Emulsionen bilden. Sie wurden bereits in der Limonentransformation erprobt (Onken, 1999). Triton X-100 (Octylphenolpoly[oxyethylenglycolether]_n [n=9-10]; HLB 13,5; CMC $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) hat zusätzlich die Eigenschaft, membrangebundene Enzyme solubilisieren zu können, während Tween 40 (Polyoxyethylen-sorbitanmonopalmitat) als Emulgator (HLB 15,6; CMC $\sim 0,02 \text{ mol L}^{-1}$) dies nicht vermag.

Die Emulgatoren Tween 40 und Triton X-100 wurden in einer ca. dreifachen CMC-Konzentration eingesetzt, je nach Ansatz durch Erwärmung und Ultraschall behandelt und zudosiert (2.3.9.3). Eine stabilisierte Emulgierung der Substrate in Triton X-100 wie auch in Tween 40 zeigte eine Inhibierung der Nootkatongnese, die in der Solubilisierung von aktiven, membrangebundenen Enzymen begründet liegen kann. Ebenfalls ist auch denkbar, dass ein in einer stabilen Emulsion vorliegendes Substrat nur erschwert von membrangebundenen Enzymen angegriffen wird. Eine Emulgierung würde eine Abschirmung des Substrates bedeuten und eine Substratdiffusion in die lipophile Zellmembran zu z.B. membrangebundenen Monooxygenasen verhindern. Wurde die Emulsion/Suspension mit Tween 40 nicht durch Erwärmung homogenisiert, so steigerte sich die Nootkatonbildung um das Zweifache. Eine Entmischung der Emulsion scheint stattgefunden zu haben, wodurch die Steigerung der Nootkatongnese durch eine Erhöhung der Substratverfügbarkeit begründet werden kann. Somit wirken sich Substratdosierungen in stabilen Emulsionen eher negativ auf die Produktbildung in einer Terpenbiotransformation aus.

3.4.3 Verteilungsdynamik im Transformationssystem

3.4.3.1 Verteilungsdynamik in wässrigen Systemen

Als ein Vorteil der biotechnologischen Herstellung von terpenoiden Aromastoffen wird oft das Arbeiten in wässrigen Systemen genannt (van der Werf, 1997; Schrader und Berger, 2001), solange eine optimale Substrat/Produkt-Verteilung gegeben ist. Lipophile Substrate können so zu einer Kultur appliziert werden, dass eine Absorption und Katalyse im Zellinneren oder an der Zelloberfläche erfolgt und die hydrophilen Oxidationsprodukte in das wässrige Medium abgegeben werden. Eindrucksvoll wurde dies im Transformationssystem Limonen-Carvon gezeigt. Hier besitzt das Substrat Limonen eine um den Faktor 100 kleinere Wasserlöslichkeit als sein Hydroxylierungsprodukt Carveol (**Tab. 3-7**). Untersuchungen zeigten, dass Limonen überwiegend im Mycel akkumuliert, während seine Transformationsprodukte Carveol und Carvon in das Medium abgegeben werden (Onken, 1998).

Werden die einzelnen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von Sesquiterpenen mit Monoterpen verglichen, so zeichnen sich erhebliche Unterschiede ab, die sich auf die Biotransformation auswirken (**Tab. 3-7**).

Tabelle 3-7: Verteilungskoeffizienten der Oxidationsprodukte im Vergleich zum Precursor (berechnet nach Meylan und Howard, 1995).

Verbindung	logP _{OW}	Verbindung	logP _{OW}	Verbindung	logP _{OW}
Limonen	4,03	Valencen	6,16	Farnesen	6,04
Carveol	1,88	Valencenepoxid	5,32	7-Hydroxyfarnesen	5,90
Carvon	2,09	Nootkatol	4,05	12-Hydroxyfarnesen	4,27
Limonen-1,2-diol	1,45	Nootkaton	4,00	Sinensal	4,93
		Epoxyntookaton	3,66	Farnesendiol	3,74
		Valencendiol	2,55	Farnesentriol	2,54
		Valencentriol	1,20		
		Dihydroxyntookaton	1,54		

Die Verteilungskoeffizienten verschieben sich von Mono- zu Sesquiterpenoiden insgesamt um zwei Zehnerpotenzen in Richtung Lipophilie. Das einfach hydroxylierte Produkt einer Valencentransformation (Nootkatol) wird mit einem logP_{OW} von 4,05 erheblich weniger in das Medium abgegeben als ein hydroxyliertes Limonen (z.B. Carveol, logP_{OW} 1,88). Dies zeigten auch die Untersuchungen zur Verteilung von (+)-Valencen und seinen Oxidationsprodukten bei der Transformation mit *Chaetomium globosum* (2.3.6). Eine Messung der Terpen- und Terpenoidgehalte nach einer 96-stündigen Valencentransformation, getrennt nach

Transformationsmedium, Zellwand und Membranbestandteilen sowie Cytosol, ergab, dass neben dem Nootkatol auch die Oxidationsprodukte Nootkaton und Valencen-11,12-epoxid nur geringfügig in das Medium abgegeben wurden. Mit steigendem Grad der Oxyfunktionalisierung des Valencen sind die Produkte genügend hydrophil, um in das Medium freigesetzt werden zu können. Obwohl die Verteilungskoeffizienten von Limonen, Nootkaton und Epoxynootkaton ($\log P_{OW}$ 4,00; 4,03 bzw. 3,66) in einem sehr engen Bereich liegen, befand sich das Epoxynootkaton fast ausschließlich im wässrigen Medium. Dieser Effekt kann nicht über Verteilungskoeffizienten erklärt werden. Andere Metabolisierungsmechanismen wie z.B. Carriermechanismen oder auch physikalische Eigenschaften wie adsorptive Bindungen müssen hierfür verantwortlich sein (3.2.4). So wäre vorstellbar, dass die Oxidation von Nootkatonepoxid im aktiven Zentrum einer Monooxygenase aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen (zusätzliche Epoxygruppe) oder Molekülgröße nicht mehr als Substrat akzeptiert wird. Eine schematische Darstellung der Freisetzung zeigt **Abb. 3-30**.

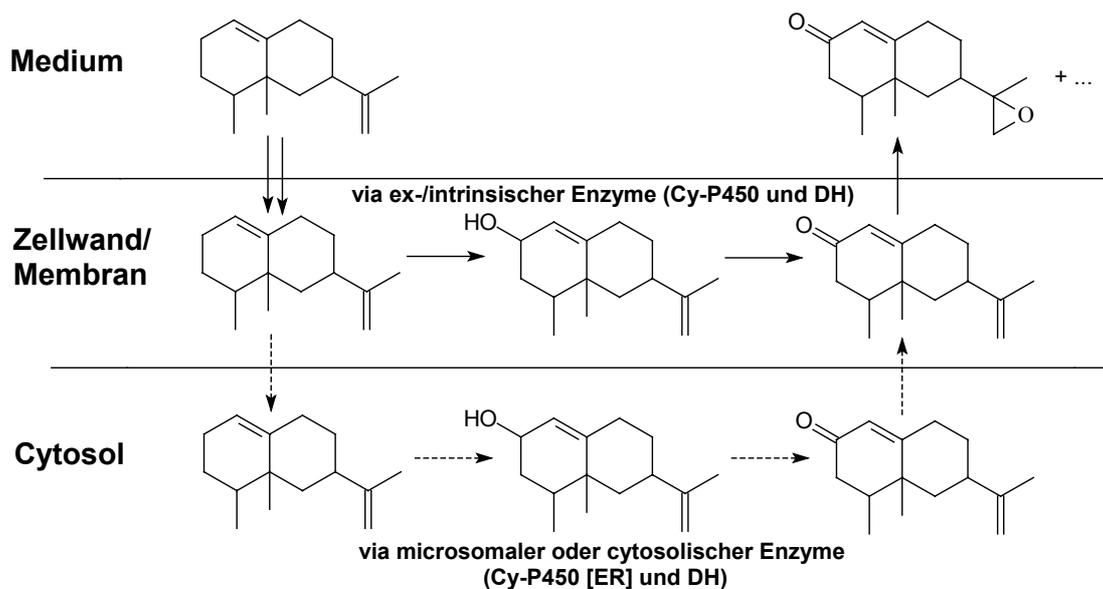


Abbildung 3-30: Modell der möglichen Metabolisierung von (+)-Valencen mit anschließender Freisetzung der Oxidationsprodukte (Cy-P450 = Cytochrom-P450-Monooxygenasen; ER = lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum; DH = Dehydrogenasen).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, sollte die Schwierigkeit einer ausreichenden Produktfreisetzung - nach theoretischen Berechnungen (**Tab. 3-7**) - noch stärker bei der Transformation des Farnesen hervortreten. Insbesondere einfach hydroxylierte Farnesenmetaboliten mit der Hydroxyfunktion in zentraler Position im Molekül, die sich als geruchaktiv ergeben haben (2.5.2), besitzen keine bedeutend bessere Löslichkeit als ihr Edukt Farnesen. Terminale Oxidationsprodukte wie 12-Hydroxyfarnesen

oder Sinensal haben immer noch eine um den Faktor 10 ungünstigere Verteilung bezüglich der lipophilen Phase als das Nootkaton.

Die ungünstige Freisetzung der Produkte aus dem System stellt die biotechnologische Anwendung der Valencenbiotransformation vor Probleme. So kann eine *in situ* Produktabtrennung direkt aus dem Kulturmedium, wie sie z.B. für die Abtrennung von Carvon aus einem Bioreaktor untersucht wurde (Gehrke, 2000), nicht durchgeführt werden. Mögliche Lösungsansätze bietet eine kostenaufwendige Extraktion des Kulturmediums mitsamt Mycel, die mit einem Abbruch der Kultivierung verbunden wäre. Eine weitere Möglichkeit bietet die Biotransformation in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen an, die hier ebenfalls für das Transformationssystem Valencen-Nootkaton untersucht wurde (2.3.10).

3.4.3.2 Verteilungsdynamik in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen

Die Verwendung von organisch-wässrigen Zweiphasensystemen bietet gegenüber herkömmlichen Kultivierungen in rein wässrigen Medien erhebliche Vorteile, wenn ein Transformationssystem mit schlecht löslichen Substraten und/oder Produkten zum Einsatz kommt. Durch Verwendung von organischen Lösungsmitteln wird der Precursor gemäß seinem Verteilungskoeffizienten kontinuierlich nachgeliefert, ohne toxische Substratkonzentrationen im wässrigen Kulturmedium zu erreichen. Die Produkte können durch die organischen Lösungsmittel erleichtert freigesetzt und direkt mit der organischen Phase abgetrennt werden (Carvalho *et al.*, 2002). Durch fortlaufende Gleichgewichtseinstellung der Edukt- und Produktkonzentration im Transformationssystem werden toxische Konzentrationsverhältnisse in der wässrigen Phase verhindert. Hydrolysen, Umlagerungsreaktionen oder andere in wässrigem Medium begünstigte Reaktionen können unterdrückt werden. Zweiphasensysteme werden insbesondere bei Steroidtransformationen verwendet (Fernandes *et al.*, 1998). Ein weiterer Vorteil kann eine Adaptation der Transformationskulturen an die lipophile Umgebung des Lösungsmittels darstellen und somit eine Oxidation der xenobiotischen Verbindungen wie z.B. Terpene stimulieren. Untersucht wurden hierbei n-Decan und Limonen (für Limonen siehe 3.4.4).

Ein Nachteil, der sich auch bei der Transformation von (+)-Valencen zeigte (2.3.9.8), ist die einsetzende Phasentoxizität der organischen Phase, die aus den transformationsaktiven Zellen Membran- und Zellbestandteile herauslösen. Deshalb werden auch verstärkt polymere Phasen, wie z.B. Polyethylenglycol, zur extraktiven Fermentation und auf Cosolvenseffekte untersucht (Sinha *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1998b).

Kultivierungen im Zweiphasensystem wurden auf dem Aromasektor z.B. für die Herstellung von Terpenylestern oder Methylketonen oder auch α -Terpineol untersucht (Savithiry *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1999; van Keulen *et al.*, 1997).

n-Decan ist aufgrund seines $\log P_{OW}$ von 5,67 (**Tab. 3-5**) geringer toxisch als das verwendete Limonen ($\log P_{OW}$ 4,03) oder auch Isooctan, das für eine Limonentransformation mit *Ganoderma applanatum* verwendet wurde (Busmann, 1990). Ebenfalls hat es aufgrund der kleinen und linearen Molekülform eine stärkere Membrangängigkeit als höhere Alkane wie z.B. das verwendete Hexadecan (Onken, 1998). Es bietet sich deshalb als organisches Solvens für eine Valencentransformation in einem Zweiphasensystem an, da es zu einer erhöhten Extraktion der im Mycel eingelagerten Produkte und auch Substrate kommt. Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Abtrennung der Lösungsmittelphase, da in Konzentrationen >20% keine Emulsionen auftreten. Die Verwendung von Phasen wie z.B. Miglyol führt zu starker Emulsionsbildung (Onken, 1998).

Während Nootkaton in lösungsmittelfreien Systemen, wie schon dargestellt, überwiegend im Mycel akkumulierte, kam es bei der Verwendung einer zweiten lipophilen Phase zu einer Freisetzung von Nootkaton von mehr als 95% der gebildeten Gesamtmenge (2.3.11). Hierbei zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Konzentration an n-Decan. Konzentrationen von 25% (v/v) n-Decan bewirkten eine annähernd gleiche Nootkatongenese im Vergleich zu einer Kontrollkultivierung, von 50% (v/v) Decanzusatz eine verstärkte Hemmung und von 100% (v/v) wieder einen leichten Anstieg der Nootkatonbildung. Dies könnte durch zwei gegenläufige Effekte erklärt werden. Die Verwendung einer Decankonzentration von 25% besaß eventuell die geringste Toxizität für den Organismus, jedoch wurde ebenfalls nur eine geringe Freisetzung/Extraktion von Nootkaton aus dem Mycel im Vergleich zu höheren Decankonzentrationen erreicht (2.3.11). Mit steigendem Decananteil nahm auch die Toxizität durch zunehmende Membranzerstörung zu, gleichzeitig jedoch auch die Extraktionskapazität der Decanphase, so dass bei einer Transformation mit 100% (v/v) Decanzusatz, relativ zu den kleineren Decankonzentrationen gesehen, am meisten Nootkaton extrahiert wurde, jedoch auch die geringste Transformation des Substrates stattfand. Obwohl hier die größte Toxizität durch hohe Decankonzentrationen angenommen werden musste, war die Kultur immer noch vital.

Konzentrationen <25% (v/v) n-Decan bewirkten eine Emulgierung von Mycel, wässriger und von organischer Phase, wie es auch bei der Verwendung von n-Dodecan beobachtet wurde (Carvalho *et al.*, 2002). Bei einer Konzentration von 10% (v/v) n-Dodecan zum Medium wurde auch bei der Transformation von Carveol zu Carvon mit *Rhodococcus erythropolis* im Bioreaktor eine Ausbildung einer emulgierten Zwischenschicht, in der das Mycel akkumulierte, beobachtet.

n-Decan wurde ebenfalls als Lösungsmittel bei der Limonentransformation mit Lyophilisaten verwendet. Hierbei zeigte das unpolare n-Decan (90%) eine drastische Verminderung der Transformationsaktivität auf Lyophilisaten von *P. sapidus*, die durch die Zerstörung der Membranintegrität (3.2.4) und das Eindringen des Lösungsmittels in das Zellinnere erklärt werden kann (2.2.8.2). Eine Enzymdenaturierung wäre die Folge. Die Verwendung des polaren Dimethylformamid in einer Konzentration von 20% (v/v) zeigte keine Cosolvenseffekte, obwohl es als übliches Cosolvens in enzymatischen Transformationen lipophiler Substrate dient (Koskinen und Klibanov, 1992).

Mit der Verwendung von n-Decan (25% v/v) in einer Valencentransformation mit *C. globosum* in Submerskultivierung ist eine schonende *in situ* Produktabtrennung während des Kulturverlaufs möglich. Eine postfermentative Extraktion des Mycels wäre entbehrlich, wodurch das Produkt direkt dem *downstream-processing* zugeführt werden kann. Der optimale Anteil der organischen Phase liegt auch bei Steroid-Transformationen mit *Aspergillus* im Zweiphasensystem bei 30% (Ceen *et al.*, 1987). Höhere Gehalte des organischen Lösungsmittels führten zu einem ungünstigen Massentransfer lipophiler Substrate in das wässrige Medium. 20% n-Dodecan stellte sich als günstigste Lösungsmittelkonzentration bei einer Transformation von Carveol zu Carvon mit *R. erythropolis* heraus (Carvalho *et al.*, 2002b). Ein Schutz vor lösungsmittelbedingter Membranschädigung ist auch durch eine Immobilisierung des Mycels auf einem polaren Träger denkbar (Tan und Day, 1998). Eine interessante Variante stellt ein *Interface* Bioreaktor dar, die für die Veresterung von Citronellol verwendet wird. Der Organismus ist hierbei auf einem festen Nährmedium immobilisiert, wodurch die Versorgung mit Cosubstraten gewährleistet wird und gleichzeitig durch eine Überschichtung mit n-Decan die Produkte kontinuierlich extrahiert werden (Oda und Ohta, 1997).

Eine Abtrennung der Farnesenoxidaionsprodukte wäre durch Kultivierungen in Zweiphasensystemen in Analogie zur hier beschriebenen Valencentransformation ebenfalls denkbar. Die Abtrennung des Precursors oder Produkts kann nachfolgend *in situ* an selektiven Adsorbentien erfolgen. Beide Transformationen könnten aufgrund der ähnlichen Substrat- und Produkteigenschaften technologisch analog durchgeführt werden.

3.4.4 Nährstoffversorgung und Cometabolisierungseffekte

3.4.4.1 Nährstoffversorgung und Sauerstoffbedarf

Der Stoffwechselweg der Terpene im jeweiligen Mikroorganismus spielt bei zahlreichen Biotransformationen eine Rolle (van der Werf *et al.*, 1994; Schrader und Berger, 2001, Trudgill, 1994). Für einige Mikroorganismen wird eine Co-Oxidation der Terpensubstrate angenommen, d.h. die partielle Oxidation von Terpenkohlenwasserstoffen wie *R*-(+)-Limonen oder α -Pinen, ohne dass eine Weiteroxidation und Metabolisierung stattfindet. Insbesondere wenn nährstoffreiche Medien verwendet werden, erscheint eine Metabolisierung von Terpenen als C-Quelle nicht notwendig. Andererseits können Terpenkohlenwasserstoffe als alleinige C-Quelle dienen und über eine β -Oxidation metabolisiert werden (van der Werf *et al.*, 1997; Trudgill, 1994).

Die Kultivierung von *Chaetomium globosum* zur Transformation von (+)-Valencen wurde hinsichtlich der Glucosezehrung untersucht (2.3.9.1). Es zeigte sich, dass ein Glucosegehalt von 0,5% zur Anzucht transformationsaktiver Biomasse ausreichte. Der zweite Anstieg des Nootkatongehaltes auf 13 mg L^{-1} in einer glucosearmen Kultivierung und das Auftreten höher oxidierte Metabolite könnte als einsetzende Mineralisierung von (+)-Valencen interpretiert werden. Das Sesquiterpenoid scheint beim Fehlen der C-Quelle Glucose verstärkt oxidiert zu werden, um es dem Metabolismus verfügbar zu machen. So kann der mikrobielle Metabolismus auch auf andere C-Quellen, wie Asparaginsäure, Bestandteile des Hefeextraktes oder eben Terpene, ausgerichtet und die entsprechenden Enzyme hierfür exprimiert werden. Dieser physiologische Effekt ist auch als zweiphasige Metabolisierung oder *Diauxie* bekannt und bei der Zehrung von verschiedenen Arten von Monosacchariden beobachtet worden (Schlegel und Zaborosch, 1992). Verschiedene Zuckerarten wirken über unterschiedliche Stressinduktoren auf die Promotorregionen der codierenden Gene, um die benötigten Enzyme zu exprimieren (Zahringer *et al.*, 2000).

Es ist bekannt, dass die organischen Hauptkomponenten des Mediums Kohlenstoff und Stickstoff einen entscheidenden Einfluss auf die Transformationsausbeute haben. Bei der Transformation von Limonen zu Carvon mit *Ganoderma applanatum* ging eine Abnahme des Stickstoffgehaltes mit einem Anstieg des Gehaltes an Oxidationsprodukten einher (Busmann, 1990), was auf die Involvierung von Peroxidasen schließen lässt, die verstärkt unter Stickstoffmangel gebildet werden (3.2.4.2).

Durch eine medienbedingte Selektion von terpenmetabolisierenden Mikroorganismen gelang die Isolierung von äußerst transformationsaktiven Stämmen (Trudgill, 1994). Hierbei werden sehr nährstoffarm zusammengesetzte Medien mit Terpenen als ausschließliche Kohlenstoffquelle verwendet. Es fand nicht nur eine partielle Oxidation, sondern auch eine Mineralisierung der Terpene statt.

Eine Verwendung von kohlenstoffarmem Medium scheint somit eine geeignete Methode zu sein, den Anteil an Oxidationsprodukten zu erhöhen, wobei jedoch eine weitergehende Mineralisierung des Zielprodukts unterbunden werden muss.

Sauerstoff ist ein essentielles Cosubstrat der Oxidation von Terpenkohlenwasserstoffen. Ebenfalls wird er von obligat aeroben Pilzen wie Ascomyceten (Griffin, 1994) zur Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Prozesse und für eine optimale Biomasseproduktion benötigt. Somit ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff während einer Kultivierung ausreichend zu gewährleisten. Sauerstoff ist jedoch mit $1,20 \text{ mmol L}^{-1}$ ($= 41,2 \text{ mg L}^{-1}$ bei 24°C) nur gering in Wasser löslich (Einsele *et al.*, 1984). Wird Luft zur Begasung eines Reaktors verwendet, so betragen die maximalen Sauerstoffkonzentrationen aufgrund des ebenfalls gelösten Stickstoffs nur $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. Zusätze von Salzen verringern die Konzentration nochmals. Daher kann eine ungenügende Versorgung zur Limitierung der Biotransformation führen. Die Zehrung des im Medium gelösten Sauerstoffes verläuft jedoch bei Pilzen im Vergleich zu Bakterien oder Hefen wesentlich langsamer, was Untersuchungen mit sauerstoffsensitiven Optoden gezeigt haben (Schäfer *et al.*, 2003). Hierbei wurde beobachtet, dass in Schüttelkolbenkulturen der Sauerstoffeintrag durch Durchmischung des Mediums größer ist als die biologische Zehrung.

Die Kontrolle einer ausreichenden Sauerstoffversorgung bei Kultivierungen von Basidiomyceten im Schüttelkolben erwies sich als schwierig (Onken, 1998). Für die Transformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* wurden zwei Versuchsansätze im Schüttelkolben gewählt, um die Sauerstoffzufuhr zu erhöhen (2.3.9.2).

Eine Oberflächenvergrößerung der Schüttelkolbenkultur führt im Allgemeinen zu einem erhöhten Gasaustausch und zu verbesserten Massentransferkoeffizienten (Irvine, 1990). Somit ist eine kontinuierliche Sättigung des flüssigen Mediums mit Sauerstoff eher möglich. Die Vergrößerung der Oberfläche einer Submerskultur steigerte die Nootkatongenese erst bei sehr großen Kontaktflächen des flüssigen Kulturmediums mit dem Kolbengasraum und zeigte eine zweieinhalbfache Erhöhung der absoluten Nootkatonmenge.

Sauerstoff kann ebenfalls extern dem Kulturkolben zugeführt werden. Dies wurde mittels einer diskontinuierlichen Sauerstoffbegasung erreicht. Eine Zufuhr von Sauerstoff wirkte sich jedoch nicht auf die Erhöhung der Nootkatongenese aus, sondern führte zu einem massiven Anstieg der chemischen Bildung. Eine Begasung mit Stickstoff führte zu einer deutlichen Hemmung der Nootkatongenese. Dies ist ein Indiz dafür, dass Sauerstoff als essentielles Cosubstrat unabdingbar für die oxidative Transformation ist, wodurch die Bedeutung der angepassten Sauerstoffkonzentration deutlich wird.

Eine bessere Sauerstoffzufuhr kann in einem Rührkesselreaktor erreicht werden. Hier besteht die Möglichkeit einer kontrollierten Sauerstoffzufuhr durch direkten Eintrag von Luft oder Sauerstoff. Der Massen-Transfer-Koeffizient von Sauerstoff liegt in Bioreaktoren um den Faktor 10 über dem einer Submerskultivierung ($k_L a = 4000 \text{ h}^{-1}$ im Gegensatz zu 500 h^{-1} ; Irvine, 1990). Eine Sauerstoffzufuhr durch mikroporöse Membranen, wodurch sich wesentlich kleinere Luftblasen bilden und somit eine bessere Mediumsättigung durch verstärkte Gasdiffusion stattfinden kann, konnte wegen des adhäsiven Wachstums von *C. globosum* und der damit verbundenen unvollständigen Produktgewinnung nicht durchgeführt werden (2.3.7). Diese Begasungsart erzielte hohe Produktmengen bei der Transformation von Citronellol (Onken, 1998).

Zum Scale-up wurde eine Transformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* im 5 L-Bioreaktor durchgeführt, wobei die Transformationsergebnisse erheblich unter den im Schüttelkolben erzielten Ergebnissen lagen (2.3.7). Obwohl der Substrataustrag durch eine direkte Begasung mit 0,08 vvm sehr gering war und eine fünfmalige Dosierung auf 1,8 mM durchgeführt wurde, kam es nur zu sehr geringen Nootkatonmengen von 1-2 mg L⁻¹. Werden die Ergebnisse aus dem Versuch der externen Sauerstoffzufuhr im Schüttelkolben hinzugezogen (2.3.9.2), so zeigt sich, dass durch die verminderte Reaktorbegasung auch eine Sauerstoffverarmung des Kulturmediums eingetreten sein kann, die die Produktbildung minimiert. Somit müsste ein Optimum an minimiertem Substrataustrag und maximierter Sauerstoffzufuhr gefunden werden. Durch eine Dosierung des Precursors über die Luftzufuhr könnte dieses Problem auch umgangen werden, da hier bei ausreichend hohen Substratdosen für eine ständige Substratsättigung des Kulturmediums gesorgt werden kann. Mit diesem Versuch zeigte sich, dass die im Schüttelkolben durchgeführte Valencentransformation nicht ohne weiteres auf eine Transformation im Bioreaktor übertragen werden kann. Sie führte im Rührkessel unter den erwähnten Bedingungen zu keinen industriell relevanten Produktausbeuten. Eine Optimierung durch die Anwendung optischer Sauerstoffelektroden, einer Substratzuführung über den Dampfraum oder auch binärer Systeme zur Produktgewinnung ist denkbar.

Transformationsreaktionen können nicht nur in Rührkesselreaktoren durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit, eine erhöhte Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, bietet die Anwendung eines Oberflächenreaktors oder auch Festbettreaktors. Ein Oberflächenreaktor wurde für die Transformation von Geraniol zu 6-Methyl-5-hepten-2-on verwendet, wobei der Precursor auf den auf Agar aufgewachsenen und sporulierenden Organismus dosiert wurde (Demytinaere und de Kimpe, 2001). Eine genaue Betrachtung der chemischen Terpenoidbildung wäre in diesen Untersuchungen jedoch nötig, da durch den direkten

Kontakt von Terpen mit Luftsauerstoff eine verstärkte Autoxidation einsetzen kann (siehe Valencentransformation mit Sauerstoffbegasung, S. 157). Ebenfalls ist eine Genese von Aromen wie γ -Decalactonen durch Mikroorganismen bekannt, die zur Immobilisierung auf einem natürlichen Material wie z.B. auf cellulosehaltigen Rückständen der Zuckerrohrverarbeitung wachsen und mit Kulturmedium versetzt wurden. Die Aromastoffe können hier durch Headspaceadsorption gewonnen werden (Araujo *et al.*, 2002; Sarhy-Bagnon *et al.*, 1997; Araujo *et al.*, 1997).

Die alternative Anwendung anderer Reaktortypen, wie z.B. Air-Lift-Reaktoren in Kombinationen mit Immobilisierungsmethoden, ist für eine Optimierung der Transformation denkbar (Godjevargova *et al.*, 1999; Alba und Calvo, 2000).

3.4.4.2 Cometabolisierungseffekte

Eine Adaptation von Transformationskulturen, die zu einer beschleunigten Induktion von relevanten Transformationsoxidasen führen soll, kann durch die Dosierung geringer Precursorkonzentrationen zur (Vor-)Kultur erreicht werden. So wurde bei der Transformation von Limonen mit precursoradaptierten Kulturen von *Pleurotus sapidus* eindrucksvoll eine höhere Carvongenese beobachtet (Onken und Berger, 1999). Eine Adaptation von Kulturen von *Chaetomium globosum* führte jedoch nur zu einer beschleunigten Nootkatongenese, nicht aber zu einer erhöhten Produktbildung (2.3.10.1).

Das Monoterpen Limonen kann ebenfalls als Induktor für oxidative Enzyme verwendet werden, die für die Valencenmetabolisierung verantwortlich sind. Dies zeigte die Induktion von Kulturen zur Herstellung von Lyophilisaten für Terpententransformationen (2.3.12.1, siehe auch 3.4.5.2). Mit Limonen induzierte Lyophilisate führten im Vergleich zu nicht induzierten zu einer erhöhten Produktausbeute.

In Submerskulturen führte eine Dosierung von 2,5 mM Limonen, äquimolar zur zugesetzten Valencenmenge, zu einer Abnahme der Nootkatongenese (2.3.10.2), die auf die Zelltoxizität von Limonen zurückgeführt werden kann (siehe auch 3.4.2). Eine Dosierung höherer Konzentrationen an Limonen in Transformationsversuchen mit Basidiomyceten zeigte ebenfalls eine toxische Wirkung durch einen Rückgang der Biomasse nach Terpenzugabe (Onken, 1998). Ein weiterer Grund für eine drastisch abnehmende Nootkatonkonzentration kann auch die kompetitive Hemmung der oxidativen Enzyme durch eine Zugabe eines weiteren Substrates sein. Da eventuell die Substratazeptanz für Limonen günstiger ist als für Valencen, werden verstärkt Limonenoxidationsprodukte gebildet. Dies zeigte die Genese von Perillaalkohol, die mit steigender Konzentration an Limonen wächst und bei 30 mM ein Maximum aufwies. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Limonenzugabe erst in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, da ab 30 mM die Produktbildung stagnierte. Außerdem zeigte der Versuch, dass sich technische also destillativ ungenügend gereinigte

Substrate für eine Biotransformation nur bedingt eignen, da sich die parallele Dosierung von Limonen und Valencen inhibierend auf die Nootkatonbildung auswirkte. Limonen ist Hauptbestandteil des Orangenöles und somit natürlicher Begleiter des (+)-Valencen (3.2.2). Der progressive Effekt einer Hemmung der Terpenttransformation wurde auch bei α -Pinen in einer Größenordnung von 0,5% (v/v), umgerechnet 35 mM, festgestellt (van Keulen *et al.*, 1997).

3.4.5 Kulturvorbehandlungen und Konzentrierungen

Die Menge und Art der Behandlung der Biomasse stellt einen entscheidenden Parameter der Optimierung von Biotransformationen dar. Die Submerskultivierung kann durch Verdichtung der Zellmasse auf höhere Biokatalysatorkonzentrationen pro Volumen gebracht werden (Konzentrierung). Eine Erhöhung der Biokatalyseaktivität kann auch durch eine Vorbehandlung der Zellen, wie z.B. Lösungsmittelbehandlungen, Gefrierprozesse etc., erreicht werden. Im Folgenden wird auf die Konzentrierung von Zellmasse wie auf die Lyophilisierung als Vorbehandlungsmethode näher eingegangen.

3.4.5.1 Biokonzentrate

Die Oxidation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* in Submerskultivierung stellt eine Biokonversion in Ganzzellsystemen dar. Hierbei wachsen Pilze häufig in Pelletform. Es wird angenommen, dass nur die äußere Schicht eines Pellet transformationsaktiv ist, während der innere Teil zunehmend der Sauerstoffverarmung und dem Selbstverdau unterliegt. Das Mycel von *Chaetomium globosum* wuchs unter der Mediumoberfläche in feiner Pelletform, wodurch die potenzielle Katalyseoberfläche im Vergleich zu anderen Organismen relativ groß war. Die Biooxidation von Valencen zeigte nur eine transiente Produktbildung (2.3.3), wobei das angestrebte Nootkaton zu mehrfach oxidierten Metaboliten abgebaut wurde. Eine Besonderheit war hier die Bildung submerser Sporen, die bei Terpenzugabe beobachtet wurde. Zellwandschichten einer konidiogenen Zelle blähen sich dabei aus einem Mycel heraus nach außen auf und bilden Konidien, die erkennbar größer sind (2.3.7, **Abb. 2-49**). Diese sogenannte holoblastische Entwicklung tritt als vegetative Vermehrungsform auf. Es handelt sich um eine Art von physiologischem Schutzmechanismus vergleichbar mit der Endosporenbildung (Esser, 2000). Eine hohe Resistenz von Sporen von *Penicillium digitatum* gegenüber Terpenen ist beschrieben (Wolken *et al.*, 2002). Dies könnte ein Ansatz für eine alternative Transformationsmethode mit Sporen als Biokatalysatoren darstellen.

Die Biomasse von *Chaetomium globosum* kann in Submerskultivierung bis zu einer bestimmten Zelldichte (maximal 35 g L^{-1} ; 2.3.9.6) aufkonzentriert werden.

Zellkonzentrierungen sind besonders bei Transformationen mit Bakterien bekannt (Hellmuth *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1998). Die Herstellung von Biokonzentraten aus Pilzmycel ist jedoch bisher nur wenig untersucht worden. Für die Herstellung von γ -Linolensäure durch Biotransformationen wird über eine Aufkonzentrierung von *Mucor* sp. auf eine Zelldichte von 100 g Trockenmasse L⁻¹ berichtet (Park *et al.*, 1991). Die Transformation von Ferulasäure zu Vanillin mit *Pycnoporus cinnabarinus* wurde durch höhere Zelldichten verbessert, die mit annähernd 7 g L⁻¹ um den Faktor 4 über der normalen Biomassenbildung lag (Oddou *et al.*, 1999). Die maximal erreichbaren Biomassen scheinen hier stark von der verwendeten Pilzart abzuhängen. Eine Konzentrierung der Biomasse von *C. globosum* verbesserte die Transformationsleistung bzgl. der Nootkatonbildung im Volumen-Zeit-Verhältnis (**Tab. 2-12**). Bezogen auf die Transformationsrate, gemessen in mg Produkt pro g Biotrockenmasse, wurde effektiv keine Steigerung erzielt (2.3.9.6). Da die Transformation von Farnesen nur in Biokonzentraten, nicht aber in normaler Submerskultivierung möglich war, kann nicht allein der Konzentrationseffekt für die Umsetzung verantwortlich sein (2.4.1). Möglich wäre auch verbesserte Diffusion/Absorption des Farnesens in das Mycel in Biokonzentraten, da sich Farnesen wegen der geringen Dichte als Wasser an der Oberfläche von Submerskultivierungen befindet und aufgrund der schlechten Löslichkeit wenig verfügbar zu sein scheint.

3.4.5.2 Kulturvorbehandlungen

Zelluläre Biokatalysatoren können vor ihrem Einsatz in Transformationsreaktionen vorbehandelt werden. Damit die Precursoren in die Zellmembranen diffundieren können, müssen sie zunächst die Zellwand und die Zellmembran durchdringen. Insbesondere die Zellmembran wirkt jedoch als osmotische Barriere und hemmt eine Biotransformation durch eine Verlangsamung des Influx von Substraten und Efflux von Produkten (van der Werf, 1999). Zellen können vor dem Einsatz in Biotransformationen permeabilisiert werden, um den Austausch an Substraten zu beschleunigen. Hierdurch wird wahrscheinlich eine Störung der Membranintegrität bewirkt, wobei Enzymsysteme intakt bleiben, gleichzeitig aber leichter zugänglich werden.

Für die Transformation von Limonen, Valencen und Farnesen wurde das Mycel zur Permeabilisierung der Zellen lyophilisiert. Durch diese Behandlung wurde die Ausbeute der Transformationsprodukte im Vergleich zur Kultivierung in Biokonzentraten stark gesteigert (2.2.8; 2.3.12; 2.4.6; **Tab. 2-12**). Eine beschleunigte Kinetik der Terpengenese lässt sich durch die Lyophilisierung insofern erklären, dass durch die Dehydratisierung des Zellmaterials die Struktur der Zellmembranen verändert und aufgebrochen wird, wodurch eine bessere Verfügbarkeit des Substrates wie auch eine bessere Freisetzung des Produkts möglich ist. Geringe Substratkonzentrationen in Transformationsansätzen benötigten eine

längere Induktionsphase als hohe Dosierungen, die eventuell auf Diffusionsbarrieren beruhen (2.3.12.2). Eine Induktionsphase von wenigen Stunden für die Expression von Oxidasen scheint bei relativ langsamem Wachstum der Pilze unwahrscheinlich zu sein. Eine Absättigung der lipophilen Zellwand/Membran mit Substrat könnte die Diffusionshemmung bewirken. Die Lyophilisierung stellt eventuell nur eine vorübergehende Schädigung der Zellmembranen und Zellwand von vitalen Zellen dar, die offensichtlich reparabel ist. Die Zellen oder ein Teil davon bleiben vital (2.3.12.1). Das Lyophilisat könnte auch eine Art Immobilisierung aktiver Enzyme auf inaktivem Zellmaterial darstellen („resting cells“).

Ein weiterer Grund für die Erzielung hoher Ausbeuten liegt ebenfalls in der Menge des Biokatalysators begründet. In den Transformationen mit *Chaetomium globosum* wurden Konzentrationen von 20 g L⁻¹ Biotrockenmasse erzielt, die circa die zweifache Konzentration von der erreichten Trockenmasse in Submerskultivierungen darstellen.

Pilze, deren Valencenoxidation auf transmembranen Monooxygenasen basiert, wie wahrscheinlich bei *C. globosum* (3.3.2.5), verloren bei einer Lyophilisierung ihre Transformationsaktivität, während *P. sapidus* seine Aktivität nach Lyophilisierung behielt. Laccasen sind stabile Enzymsysteme, die eine Lyophilisierung überstehen können, und wären als Katalysator für die hier vorliegende Transformation denkbar (3.2.4.2). Jedoch zeigte *P. sapidus* keine Oxidation von Valencen in Submerskultivierung. Dies könnte wiederum durch die verbesserte Zellpermeabilität erklärt werden, wodurch eventuell auch katalyserelevante, intrazelluläre Enzyme für Substrate zugänglich sind.

Die Verwendung von *resting cells* aus *Aspergillus niger* wurde auf eine Transformationaktivität bezüglich α -Pinen untersucht. Diese Zellen wurden in isotonischen Puffersystemen kultiviert und zeigten kein Wachstum mehr. Eine Verbenonbildung mit einer Konversionsrate von 16,5% wurde beobachtet (Agrawal und Joseph, 2000).

Zellmembranen können durch weitere chemische oder physikalische Verfahren permeabilisiert werden. Organische Lösungsmittel wie Toluol oder Chloroform können Zellen partiell aufschließen. Physikalisch ist dies durch Ultraschallbehandlung oder Extrusionen im industriellen Maßstab möglich (Cabral, 2001). Pseudomonaden, die durch Gefrieren und anschließend mit Toluol, Diethylether oder Emulgatoren behandelt wurden, zeigten erhöhte Umsatzraten für die Epoxidöffnung von α -Pinenoxid (Fontanille und Larroche, 2003).

3.4.6 Konversionsraten in Terpenttransformationen

Entscheidend für eine effektive Biotransformation sind die molare Konversionsrate und die absolute Menge an gebildetem Produkt. Aus **Tab. 3-8** ist ersichtlich, dass die Transformation

von (+)-Valencen in Submerskulturen mit vitalen Zellen aus Pflanzenzellkulturen oder Pilzkulturen geringe Produktbildungen zeigen, aber zum Teil hohe Konversionsraten (molare Ausbeute) aufweisen. Durch eine Erhöhung der Substratkonzentration kann zwar die absolute Produktbildung verbessert werden, jedoch sinkt die molare Konversionsrate - wahrscheinlich durch eine hohe Substrattoxizität - ab. Die Transformation des Monoterpens Limonen zu Carvon mit *P. sapidus* liefert ebenfalls nur eine molare Konversionsrate von 1,2 mol% (Onken und Berger, 1999), vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Terpenoidgenese (2.2.2.2). Die meisten Oxyfunktionalisierungen von Limonen mit unbehandelten Pilzkulturen liefern somit keine industriell relevanten Produktausbeuten (siehe auch Schrader und Berger, 2001).

Tabelle 3-8: Gegenüberstellung der gefundenen Valencentransformationen mit literaturbekannten Ganzzelltransformationen (¹de Kraker *et al.*, 2003; ²Drawert und Berger, 1984; ³Huang *et al.*, 2001, Ausbeute abgeschätzt, da keine genaue Angabe verfügbar; ⁴Willershausen, 1996).

	Zugabe [mM]	Produktmenge [mg L ⁻¹]	Zeit [h]	Molare Konversions- rate [mol%]	Ausbeute/Zeit mol% h ⁻¹
Vitale Zellen					
<i>Cichorium intybus</i> ¹	0,045	0,13	1	8,5	8,5
<i>Citrus paradisi</i> ²	0,001	0,61	6	21,0	3,5
<i>C. globosum</i>	2,25	8,2	96	1,6	0,18
Lyophilisate					
<i>P. sapidus</i>	30	248	14	5,4	3,7
Enzyme					
Laccase ³	22,5	n.d.	48	28,6 ³	0,6 ³
<i>Phanerochaete chrypsosporium</i> ⁴	k.A.	k.A.	18	„nahezu vollständig“	k.A.

Dagegen zeigen bakterielle und von Hefen katalysierte Transformationsreaktionen sehr hohe Produktbildungen von >8 mol%, wie z.B. die Bildung von Perillasäure mit *Pseudomonas putida* (Speelmans *et al.*, 1998) oder von Isopiperitenol mit *Hormonema* sp. (Van Dyk *et al.*, 1998a). Auch die Transformation des oxyfunktionalisierten Sesquiterpens β -Ionon wurde mit geeigneter Ausbeute (90%) von Streptomycceten katalysiert (Lutz-Wahl *et al.*, 1998). Offensichtlich haben Pilze (im Gegensatz zu Bakterien) als Eukaryonten durch ihre relativ dicke Zellwand eine starke Diffusionsbarriere für die Einführung der Terpenkohlenwasserstoffe und können diese eventuell nur erschwert metabolisieren.

Eine hohe Produktausbeute kann jedoch mit Vorbehandlungen der Pilzkulturen oder durch variierte Transformationsbedingungen erzielt werden. So wurden Limonen und Valencen mit Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* mit einer entschieden besseren Konversionsrate im Vergleich zu Submerskultivierungen transformiert (2.2.8; 2.3.12). Wie oben diskutiert, liegt hier wahrscheinlich eine Permeabilisierung der Zellmembran vor.

Limonen wurde z.B. mit *Penicillium digitatum*, immobilisiert in Alginat-Kugel, zu 45% α -Terpineol transformiert (Tan und Day, 1996). Auch Pflanzenzellen aus *Dioscorea deltoidea* wurden durch Immobilisierung auf Carrageen, Pectin, Polyurethan oder Polyphenylenoxid so modifiziert, dass die Oxidation von Limonen zu Carveol gesteigert wurde (Vanek *et al.*, 1999). Die Transformation von β -Ionon mit *Aspergillus niger* wurde durch die Verwendung von Zwei-Phasen-Systemen auf bis zu 70% Ausbeute gebracht (Grivel *et al.* 1999).

Eine Erhöhung der Produktausbeute kann deshalb wahrscheinlich nur durch eine Veränderung des Transformationssystems erfolgen. Eine rein enzymatische Umsetzung liefert die höchsten Konversionsraten (**Tab. 3-8**). Hierfür werden aber stabile Enzyme benötigt, was bei Monooxygenase nur selten der Fall ist. Ebenfalls wäre die Herstellung eines leicht kultivierbaren Biokatalysators wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* oder *E. coli*, in den die relevanten Oxidasegene aus Pilzen kloniert wurden, ein zielführender Weg.

4 Ausblick

Die Veredelung der Terpenkohlenwasserstoffe Limonen, Valencen und Farnesen zu hochwertigen aromaaktiven Verbindungen wie Carvon, Nootkaton, 7-Hydroxyfarnesen durch mikrobielle Biotransformationen wurde dargestellt. Die Identifizierung von Abbauprodukten und Aufklärung der stereoselektiven Bildungswege der oxidativen Metabolisierung stellten einen Schwerpunkt der Arbeit dar. Aufgrund des großen Potentials von verfügbaren Pilzen wurde eine Auswahl von bioaktiven Stämmen untersucht. Neue Wege und Ansätze wurden aufgezeigt, industriell verwertbare Terpenoide mit hoher Ausbeute zu generieren.

Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse können weiterführend eingehende Untersuchungen der selektiven Transformationsreaktionen durchgeführt wie auch die Anwendung im Bioprozess erprobt werden.

Zum erweiterten Verständnis der Oxidationsreaktionen wären kinetische Untersuchungen hilfreich, die sowohl die Enzymreaktion wie auch eventuell vorhandene Diffusionshemmungen (Lyophilisate) charakterisieren. Auch ist hinsichtlich der Transformationsreaktion die Unterscheidung zwischen einem radikalisch initiiertem oder einer enzymatischem, stereochemisch gesteuerten Reaktionsmechanismus relevant. Die Isolierung transformationsrelevanter Monooxygenasen und Laccasen unter Aktivitätserhalt wäre für eine Enzymcharakterisierung und die Bestimmung der Aminosäuresequenz sinnvoll. Insbesondere wäre ein Vergleich der Aminosäuresequenzen und der tertiären Enzymstrukturen im Hinblick auf die dirigierenden Effekte der unterschiedlichen Hydroxylierungsaktivitäten interessant. Auch könnten hier Substratmarkierungen Aufschluss über die genaue dissoziative Reaktionskinetik der Limonenhydroxylierung in Anlehnung an Wüst (2003) geben. Ebenfalls denkbar wäre eine umfangreiche Untersuchung von Ascomyceten im Screeningverfahren, die im Vergleich zu Basidiomyceten häufig selektivere Transformationsreaktionen zeigten.

Durch Ableitung von Primern aus der Aminosäuresequenz könnten cDNA-Banken von Ascomyceten und Basidiomyceten gescreent werden, um die DNA-Sequenz der Enzyme zu ermitteln und weitere Oxidasen zu finden. Hierdurch würden die Kenntnisse z.B. über eine Terpenbindungsregion am aktiven Zentrum und Informationen über Promotorgene erweitert werden. Es könnte die Klonierung der DNA-Sequenz und dann die Expression der Enzyme in geeigneten Vektorsystemen wie *E. coli* oder *Saccharomyces* durchgeführt werden (z.B. nach Akiyama *et al.*, 2002). Nach der Gewinnung ausreichender Enzymmengen kann nach Proteinkristallisationsversuchen eine Röntgenstrukturanalyse zur Bestimmung der Tertiär-

und Quartärstruktur der Enzyme durchgeführt werden. Liegen diese Daten vor, kann mit der Konstruktion eines effizienten Biokatalysators begonnen werden. Durch Punktmutationen der DNA-Sequenzen kann das aktive Zentrum verändert werden, wodurch die Substratakzeptanz variiert würde. Dies würde sich wahrscheinlich auf die Selektivität der Produktbildung auswirken. Durch „Knock-out“ des dem Zielprodukt nachfolgenden Katabolismus kann das angestrebte Terpenoid angereichert werden. Ein weiterer Weg ist die Transformation der verantwortlichen Gensequenzen über ein Vektorsystem in einen Organismus, der im Bioreaktor leicht kultivierbar ist.

Ebenfalls können durch Aktivitätsscreenings weitere Mikroorganismen mit homologer Katalysefähigkeit gefunden und eine Übertragbarkeit der Oxidationsaktivität auf andere Terpensubstrate untersucht werden. Fortführend könnte ebenfalls die Möglichkeit der Synthese der äußerst aromaaktiven Sinensale getestet werden.

Die Biokatalysatoren können im Bioprozess erprobt werden. Angefangen im Scale-up im 2-Liter-Rührkesselreaktor können die relevanten Parameter wie Substratzufuhr, Sauerstoffzufuhr, Medium, etc. eingestellt werden. Der Einsatz einer sensorgestützten Substratversorgung durch Optoden ist möglich (Schäfer *et al.*, 2003). Kultivierung in binären Systemen, wie hier mit n-Decan als lipophile Phase untersucht, führen zu einer verbesserten Produktfreisetzung, die besonders bei Sesquiterpentransformationen ein Problem darstellen. Alternative Bioprozessführungen wären denkbar. So ist die gesamte Bandbreite, angefangen vom Air-Lift- bis zum Festbettreaktor, für die Terpenbiotransformation bisher kaum untersucht worden.

Möglich wäre ebenfalls eine Terpentransformation mittels immobilisierter Oxidasen. Eine Immobilisierung durch Trägerfixierung oder Einkapselung wäre z.B. für Transformationen mit Lyophilisaten denkbar. Eine Wiederverwendung des Biokatalysators ohne Aktivitätsverlust müsste hier ebenfalls getestet werden. Eine Immobilisierung des Lyophilisates an Trägermaterialien wie Silicate oder Agarosekugeln könnte durchgeführt werden. Eine Bindung an einen festen Träger über Acrylate wäre ebenso machbar wie die Einkapselung in Polysacchariden wie z.B. Alginate oder Carrageenan. Diese verkapselten Biokatalysatoren könnten in Bioreaktoren wie Fluidized-Bed-Reaktoren angewendet werden, da sich bereits stabilisierende Effekte von Immobilisierungen auf Cytochrom-P450-Aktivitäten zeigen (Dror und Freeman, 1995).

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Chemikalien

5.1.1 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Punkt 5.1.1.1 aufgeführten, kommerziell erhältlichen Mikroorganismen aus den angegebenen Bezugsquellen verwendet. Ebenfalls wurden Kulturen aus verschiedenen Substraten isoliert (5.1.1.2).

5.1.1.1 Kommerziell erhältliche Mikroorganismen

Die in **Tab. 5-1** angegebenen Kulturen wurden von folgenden Sammlungen bezogen:

- Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig,
- Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, NL,
- Landwirtschaftliche Universität in Wageningen (Wag., De Jong *et al.*, 1992), NL (zusätzlich bezeichnet mit *),
- American Type Culture Collection, Manassas, V, USA.

Die in der Spalte „Substrat“ angegeben Buchstaben verweisen auf das jeweils untersuchte Substrat (L: *R*-(+)-Limonen, V: (+)-Valencen, F: Farnesen).

Tabelle 5-1: untersuchte Mikroorganismen

Art	Stamm		Substrat
<i>Armillariella melea</i>	CBS	100.12	L
<i>Aspergillus niger</i>	DSM	737	L, F
<i>Aspergillus niger</i>	DSM	821	L
<i>Athrobacter simplex</i>	DSM	40872	V
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM	32	V
<i>Beauveria bassiana</i>	DSM	62078	V
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	ATCC	9055	V
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	DSM	62078	V
<i>Botrytis cinerea</i>	DSM	877	L, V, F
<i>Chaetomium cochloides</i>	DSM	1909	L, V
<i>Chaetomium globosum</i>	DSM	1962	L, V, F
<i>Cunninghamella echinulata</i>	DSM	1505	L
<i>Cunninghamella elegans</i>	DSM	1908	L
<i>Cyanthus limbatus</i>	CBS	335.81	V

Tabelle 5-1: Mikroorganismen (Forts.)

Art	Stamm		Substrat
<i>Fusarium proliferatum</i>	DSM	764	L, V, F
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS	250.61	L
<i>Glomerella cingulata</i>	ATCC	12697	V
<i>Gongronella butleri</i>	DSM	2917	L
<i>Grifola frondosa</i>	CBS	480.63	L, V
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	CBS	311.29	V
<i>Lentinus edodes</i>	CBS	225.51	V
<i>Lepista irina</i>	CBS	366.47	V
<i>Lepista nuda</i>	DSM	8620	L
<i>Lepista nuda</i>	CBS	300.58	L
<i>Marasmius scorodonius</i>	CBS	137.83	V
<i>Marasmius scorodonius</i>	CBS	850.87	V
<i>Meripilus giganteus</i>	CBS	561.86	V
<i>Mucor hiemalis</i>	CBS	333.71 A	V
<i>Mucor plumbeus</i>	CBS	110.16	V
<i>Nocardia spec.</i>	DSM	40872	V
<i>Nocardia spec.</i>	DSM	46002	V
<i>Penicillium citrinum</i>	DSM	1179	L
<i>Penicillium digitatum</i>	DSM	2748	L
<i>Penicillium italicum</i>	DSM	2755	L
<i>Penicillium solitum</i>	CBS	424.89	F
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBS	671.71	L, V
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBS	481.73	V
<i>Pichia angusta</i>	DSM	70277	L
<i>Pleurotus euosmus</i>	DSM	5331	L, V
<i>Pleurotus lampas</i>	CBS	323.49	L
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DSM	1020	L, V
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	DSM	5339	L, V
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSM	8266	L, V, F
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM	50198	V
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM	6413	V
<i>Rhizoctonia carotae</i>	CBS	464.48	L
<i>Rhizoctonia solani</i>	DSM	852	L, V
<i>Rhizopus arrhizus</i>	DSM	906	L
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM	43966	V
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM	48205	V
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	DSM	43202	V

Tabelle 5-1: Mikroorganismen (Forts.)

Art	Stamm		Substrat
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM	43966	V
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM	48205	V
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	DSM	43202	V
<i>Streptomyces arenae</i>	DSM	40737	L
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	DSM	1907	L
<i>Trametes versicolor</i>	Ital*	93	V
<i>Trametes versicolor</i>	Wag.Eit*	39	V
<i>Trametes versicolor</i>	DSM	11269	V
<i>Trametes versicolor</i>	DSM	11309	V
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DSM	599	V

5.1.1.2 Isolierte Mikroorganismen (Eigenisolate)

Die Stämme mit der Abkürzung LB wurden vom Lab. Bioaromas/FEA–UNICAMP der Universität Campinas, Brasilien, zur Verfügung gestellt. Hierzu gehören folgende isolierte Organismen mit den in Klammern angefügten Habitaten: LB 2000 (Erde), LB 2010 (Mango), LB 2015 (Umbu), LB 2025 (Mango), LB 2038 (Acerola), LB 2047 (Tamarine), LB 2060 (Serigula).

Es wurden weitere Mikroorganismen aus Früchten und Gewürzen (Mandarine, Grapefruit, Ingwer, Walnuss, Pfeffer, Kiwi) isoliert. Hierbei wurden Abstriche aus oberflächlich verkeimten Pflanzenteilen auf Kulturplatten mit SNLH-Medium bei 24 °C inkubiert. Entsprechende Stämme wurden durch Ausstrichverfahren (Bast, 1999) oder Ausstechen (Pilze) vereinzelt und als Reinkultur herangezogen.

5.1.2 Chemikalien

Tabelle 5-2: Bestandteile der Kulturmedien

Substanz	Reinheit	Lieferant
Agar Agar	f.d. Mikrobiologie	Merck
L-Asparagin-Monohydrat	Reinst	Merck
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	> 98%	Fluka
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	99%	Baker
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	-	Riedel-De Haen
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f.d. Mikrobiologie	Merck
Glycerol	> 98%	Roth
HCl (37 %)	Reinst	Riedel-de Haen
KCl	Reinst	Riedel-de Haen
Hefeextrakt	f.d. Mikrobiologie	Merck
KH ₂ PO ₄	f.d. Molekularbiol.	Merck
KOH	p.a.	Riedel-de Haen
MgSO ₄ x 1 H ₂ O	Chem. Rein DAB 7	Riedel-de Haen
MnSO ₄ x H ₂ O	Purum p.a.	Fluka
SeO ₂	p.a.	Merck
Titriplex III	> 99%	Merck
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Puriss, p.a.	Fluka

Tabelle 5-3: Standardsubstanzen, Substrate und Inhibitoren

Substanz	Reinheit	Lieferant
Campher	> 97%	Fluka
(-)-Carveol, <i>trans/cis</i> -Gemisch	Isom. 97%	Aldrich
<i>R</i> -(-)-Carvon	Puriss. > 99%	Fluka
<i>S</i> -(+)-Carvon	> 99%	Fluka
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	-	Fluka
(-)-Dihydrocarveol	> 98%	Fluka
(-)-Dihydrocarvon	> 97%	Fluka
(+)-Dihydrocarveol	Purum	Fluka
(+)-Dihydrocarvon	> 97%	Fluka
Farnesen	Isomerengemisch	Treatt
Heptansäuremethylester	> 99%	Sigma
<i>cis</i> -Limonenepoxid	> 99%	Fluka
<i>trans</i> -Limonenepoxid	> 99%	Fluka
<i>R</i> -(+)-Limonen	Purum. > 98%	Fluka
<i>S</i> -(-)-Limonen	Puriss. > 99%	Fluka
(+)-Nootkaton	> 98%	H&R
(+)-Perillaaldehyd	> 99%	Fluka
(+)-Perillaalkohol	purum, > 98%	Fluka
Piperiton	> 97%	Ziegler
Proadifen (SKF-525 A), α -Phenyl- α -propyl-benzenessigsäure-2-[diethylamino]ethylester	> 95%	Sigma
α -(+)-Terpineol	Puriss. > 99%	Fluka
Thymol	> 99%	Fluka
Toluol	> 99 %	Fluka
(+)-Valencen*	> 90%*	Treatt
Veratrylalkohol	> 97%	Fluka

*destillativ unter Hochvakuum 16 mbar, 118 – 120 °C und Stickstoffbegasung nachgereinigt.

Tabelle 5-4: Enzyme und sonstige Chemikalien

Substanz	Reinheit	Lieferant
ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammioniumsalz)	99%	Fluka
BSTFA (Bis[trimethylsilyl]-trifluoracetamid)	-	Sigma
BSTFA + 1 % TMSI (Trimethylchlorsilan)	-	Sigma
Citronensäure-Monohydrat	Puriss. P.a.	Fluka
Dansylhydrazin	97%	Fluka
DTT (Dithiothreitol)	> 99,5%	Fluka
FAD (Flavinadenindinucleotid)	> 90%	Fluka
Na ₂ -Glucose-6-phosphat	> 98%	Fluka
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	240 U mg ⁻¹ Prot.	Fluka
Kupfer(I)iodid	> 98%	Merck
Laccase aus <i>Trametes spec.</i>	ASA Lot.-Nr.: 2020-10	ASA Spezialenzyme GmbH
Lewatit OC 1062	-	Bayer
Lithiumaluminiumhydrid	1M in Ether	Fluka
m-Chlorperbenzoesäure	> 70%	Sigma
MgCl ₂ , wasserfrei	> 99%	Riedel-de Haen
MOPS (4-[N-Morpholino]butansulfonsäure)	99,5%	Fluka
Natriumcarbonat	Reinst	Fluka
Natriumsulfat	Reinst	Riedel-de Haen
Natriumchlorid	Reinst	Riedel-de Haen
NADH	98%	Sigma
NADPH	> 97%	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	> 99,5%	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Reinst	Riedel-de Haen
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	> 99%	Sigma
Polyethylenglycol 4000	-	Fluka
Polyvinylpyrrolidon	-	Sigma
D-(+)-Saccharose	> 99,5%	Fluka
Tris-HCl (2-Amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propandiol)	> 99%	Sigma
Triton X 100	99%	Sigma
Tween 80	99%	Sigma

5.1.3 Lösungsmittel

Es sind nur die häufig verwendeten Lösungsmittel genannt. Selten benutzte Lösungsmittel und Chemikalien werden bei der jeweiligen Anwendung spezifiziert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Gebrauch redestilliert und ebenso wie Fassware über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Die Redestillate wurden nach einer Reinheitskontrolle wieder eingesetzt. Diethylether wurde vor Gebrauch frisch destilliert und lichtgeschützt über KOH gelagert.

Tabelle 5-5: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheit	Lieferant	Verwendung
Aceton	redest.	Hoechst	Reinigung
Dichlormethan	redest.	Hoechst	Extraktion, Synthesen
Diethylether	redest.	Kraemer & M	Extraktion, Synthesen, Säulenchromatographie
Dimethylsulfoxid	puriss., absolut	Fluka	Synthesen
Ethanol, unvergällt	redest.		Nährmedien, Säulenchromatographie
Ethanol, unvergällt	HPLC	Roth	HPLC
Ethylacetat	reinst	Riedel-de Haen	Extraktion
n-Hexan	HPLC	Roth	HPLC
Methanol	HPLC	Baker	Lösungsmittel f. Standards
Methanol	redest.	Bayer	Synthesen
Pentan	redest.	BASF	Extraktion, Säulenchromatographie
Acetonitril	HPLC	Roth	HPLC
Tetrahydrofuran	puriss., absolut	Fluka	Synthesen

5.1.4 Gase

Die Luft für den Kompressor wurde durch Ansaugen über einen Staubfilter der Raumluft entnommen und nach der Kompression zur Trocknung durch eine 5 x 30 cm Silicagelsäule geleitet.

Tabelle 5-6: Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendung
Druckluft	getrocknet	Kompressor	Detektorgas/Hilfsgas
Helium	5.0	Linde	Trärgas (GC/MS)
Stickstoff	5.0	Linde	Spülgas/ Kulturbegasung
Wasserstoff	5.0	Linde	Trärgas/ Detektorgas
Sauerstoff	5.0	Linde	Kulturbelüftung

5.1.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert.

Tabelle 5-7: Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel.

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus
Steril-Werkbank	Laminar-Flow 821/825	Stangl
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Schüttler	Infors HAT	Infors
Brutschrank	UM 500	Memmert
Ultra-Turrax	TP 18/10, 170 W	Janke & Kunkel
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Vakuumpumpe	Two Stage Nr.3	Edwards
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus
Vortexer	Typ Reax I, 2400 U min ⁻¹	Heidolph
Rührwerkskugelmühle	DYNO-Mill Typ KDL	W.A. Bachofen
Schwingmühle	Dangoumill	Prolabo
Lichtmikroskop	Will H-500	Hunt GmbH
Ultraschallbad	Sonorex 510 H	Bandelin
Destillationskolonne	Vigreux	LAT

5.1.6 Bioreaktor

Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach

Kulturgefäß:	5 L
Sauerstoffelektrode:	Ingold, Nr. 322 756 701
pH-Elektrode:	Mettler Toledo Nr. 10 465-35 K9
Druckluft:	Membrankompressor (Druck 0,6 bar) sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Satorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Abluft:	PTFE-Membranfilter (s.o.) als Sterilbarriere
Standardbedingungen:	24 °C, 250 rpm
Belüftung:	Luftrohr (a.D. 8 mm), 0,4 L min ⁻¹ ; 0,08 vvm bei 5 L Füllvolumen
Belüftung über Kapillarmembran:	Accurel [®] PP S6/2-Kapillarmembran, Akzo Nobel Faser AG Wuppertal, i.D.: 1,8 mm, Porengröße: 0,2 µm, Wandstärke 0,45 mm, Wicklung: 12 m Kapillare; gewickelt um 4 Edelstahlrohre (35 cm lang, äusserer Durchmesser: 8 mm), die mittels Klemmstutzen in das Reaktordeckel eingeführt wurden. Innerer Durchmesser der Wicklung: 10 cm (siehe auch Onken 1998). Zuluft: 50 mL min ⁻¹

5.2 Kultivierung von Transformationskulturen

5.2.1 Kulturmedien

Die Medienbestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 300 mL (100 mL Füllmenge) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (200 mL Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.2.1.1 SNL-Standardmedium (Sprecher und Hanssen, 1982)

30 g L⁻¹ Glucose-Monohydrat; 4,5 g L⁻¹ Asparagin-Monohydrat; 3,0 g L⁻¹ Hefeextrakt; 1,5 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄; 1,0 mL L⁻¹ Spurenelementlösung (bestehend aus 0,08 g L⁻¹ FeCl₃*6 H₂O; 0,09 g L⁻¹ ZnSO₄*7 H₂O; 0,03 g L⁻¹ MnSO₄*H₂O, 0,005 g L⁻¹ CuSO₄*5 H₂O; 0,4 g L⁻¹ EDTA) wurden mit 0,1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt.

5.2.1.2 Supplementiertes Medium

Für die Induktion der Oxidasen im Versuch 5.3.1 wurde das Medium aus 5.2.1.1 zusätzlich mit 5 µg L⁻¹ Selen (als Selendioxid) und Cobalt (als Cobalt[II]chlorid) supplementiert.

5.2.1.3 Glucosearme Kulturführung

Für die glucosearme Führung von Experimentalkulturen wurde der Anfangsglucosegehalt des Mediums aus 5.2.1.1, wenn nicht anders erwähnt, vor dem Sterilisieren auf 0,5 % (5 g L⁻¹) eingestellt.

5.2.1.4 SNLH-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem Medium nach 5.2.1.1 zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar vor dem Sterilisieren zugegeben.

5.2.2 Kulturführung

5.2.2.1 Stammkultivierung

Aus den von kommerziellen Anbietern gelieferten Stämmen wurden jeweils zwei Stammkulturen auf Agarplatten mit SNLH-Agar Medium angelegt. Hierbei wurde eine Agarplatte mit einem quadratischen Agarstück (ca. 0,5 x 0,5 cm) beimpft und bei 24 °C im Brutschrank kultiviert. Nach Bewachsen der Hälfte der Agarplatte wurde die Kultur bei 4 °C gelagert. Die Stammkulturen wurden mindestens alle 6 Monate nach dem gleichen Verfahren erneuert.

5.2.2.2 Gefrierkulturen

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurde das Mycel einer bewachsenen Agarplatte mit einem sterilisierten Spatel abgeschabt und in steriles SNLH-Medium mit einem Zusatz von

20% (v/v) Glycerol überführt. Die Aufbewahrung der Kulturen erfolgte bei -70 °C in einem 2 mL Eppendorfgefäß.

5.2.2.3 Homogenisieren von Kulturen

Die Homogenisierung von Mycel aus Agarplatten oder flüssigem Kulturmedium erfolgte innerhalb des sterilen Kulturmediums mit einem vorab hitzesterilisierten Ultra-Turrax Homogenisator für 10 s bei niedrigster Drehgeschwindigkeit.

5.2.2.4 Vorkulturen

Von der auf Kulturplatten geführten Stammkultur wurden mycelbewachsene Agarstücke mit einem sterilisierten Spatel in 100 mL SNL-Standardmedium in einen 300 mL Kolben überführt, homogenisiert (5.2.2.3) und drei Tage im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

5.2.2.5 Vorkulturen mit Substratadaptation

Von den Vorkulturen aus 5.2.2.4 wurden 10 mL homogenisiertes Medium in 100 mL SNLH-Medium überführt und bei 24 °C und 150 rpm kultiviert. Die Zugabe des Substrates zur Adaptation (20 µL) erfolgte nach drei bzw. fünf Tagen Kultivierungszeit. Nach sieben Tagen erfolgte aus dieser Kultur das Inokulieren einer Experimentalkultur.

5.2.2.6 Experimentalkulturen

Pro 100 mL SNLH-Medium wurden 10 mL der Vorkultur nach Homogenisieren unter sterilen Bedingungen in das Transformationsmedium pipettiert. Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 200 mL SNLH-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm.

5.2.2.7 Kultivierung als Biokonzentrat

Für eine Kultivierung in Biokonzentraten wurde das Medium einer drei Tage alten Experimentalkultur durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm (15.764 g) abgetrennt und die verbliebene Zellmasse (ca. 20 g Feuchtmasse) in einen sterilen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt, der anschließend mit 10 mL frischem Medium supplementiert und bei 200 rpm und 24°C inkubiert wurde.

5.2.2.8 Kultivierung mit *R*-(+)-Limonen bzw. Decan

R-(+)-Limonen: Die Experimentalkulturen wurden nach 5.2.2.6 angesetzt. *R*-(+)-Limonen wurde den Kulturen in verschiedenen Gehalten zu Beginn der Substratdosierung zugesetzt. Die Gehalte betragen 1,02% (v/v; 75 mM), 0,408% (v/v; 30 mM), 0,102% (v/v; 7,5 mM), 0,034% (v/v; 2,5 mM) und beim Kontrollansatz 0%. Die Kultivierung erfolgte bei 150 rpm und 24 °C.

n-Decan in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen: Die Kulturen wurden, wie unter 5.2.2.8 beschrieben, durch Zentrifugation aufgearbeitet. Der überführten Zellmasse wurde anschließend SNLH-Medium und organische Phase Decan im wechselnden Verhältnis von 100% Medium bis 100% Decan zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 200 rpm und 24 °C.

5.2.2.9 Kultivierung im Bioreaktor

Im Bioreaktorversuch mit *C. globosum* wurden 1,8 L SNLH-Medium mit 200 mL einer homogenisierten Vorkultur inokuliert. Es erfolgte keine Nachdosierung von Glucose, da die Zehrung sehr langsam erfolgte. Es wurde täglich eine 40 mL-Probe entnommen, wobei nach Zentrifugation aus 30 mL durch Extraktion die Produktbildung bestimmt wurde. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde zur Trockenmassenbestimmung eingesetzt (5.5.2.1).

5.2.3 Dosierung von Transformationssubstraten und Inhibitoren

5.2.3.1 Direkte Substratdosierung in das Kulturmedium

Für die Substratdosierung in Submerskultivierungen (5.2.2.7) wurden, soweit nicht anders vermerkt, 100 µL des jeweiligen Terpensubstrates (*R*-[+]-Limonen, *S*-[-]-Limonen, [+]-Valencen, Farnesen) nach einem Kulturalter von drei Tagen direkt in die Submerskultur gegeben.

Im Bioreaktorversuch nach 5.2.2.10 wurden viermal 400 µL (+)-Valencen direkt in das Kulturmedium gegeben. Dabei fand die Dosierung am 2., 3., 4. und 5. Kultivierungstag statt.

5.2.3.2 Direkte Substratdosierung mit Tensidzusatz

Zu einer drei Tage alten Experimentalkultur erfolgte eine tägliche Valencenzugabe über eine Emulsion, die folgendermaßen hergestellt wurde:

1 ml Präparationspuffer (10 mM TRIS/HCl, 145 mM NaCl, pH 7,0) wurden zu 60 mg Triton X-100 bzw. 80 mg Tween 40 gegeben und mit 100 µL Valencen versetzt. Die Lösungen wurden mit Stickstoff begast und 1 min auf dem Vortexer durchmischt. Die Ansätze A wurden im Gegensatz zu Ansatz B 10 min bei 50 °C temperiert und abschließend im Ultraschallbad 10 min homogenisiert. Die Lösungen wurden vor der Zugabe sterilfiltriert (die Sterilfilter waren zuvor auf Terpendurchlässigkeit getestet worden). Ebenfalls wurden Blindwerte ohne Mycel mitgeführt und unter den gleichen Bedingungen substratsupplementiert und kultiviert.

5.2.3.3 Substratdosierung in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen und Biokonzentraten

Zu der nach 5.2.2.8 und 5.2.2.9 vorbereiteten Kultur wurden 0,5% (v/v) (+)-Valencen (250 µL je 50 mL) unmittelbar nach dem Überführen der Biomasse in einen 100 mL-

Erlenmeyerkolben und nach Zugabe des SNLH-Mediums bzw. der zweiten Phase n-Decan zudosiert.

5.2.3.4 Substratdosierung über die Gasphase

Für die Gasphasendosierung in Schüttelkulturen (Onken, 1999) wurde ein braunes 1,5-mL-Vial mit Draht an der Unterseite des Cellulosestopfens befestigt (300 mL Erlenmeyerkolben), so dass sich zwischen Stopfenöffnung und Gefäßöffnung ein Abstand von ca. 2 cm befand. In das Gläschen wurde zur besseren Verdunstung des Substrates ein Streifen Chromatographiepapier (0,4 x 3 cm) gesteckt.

5.2.3.5 Durchführung der Sauerstoffbegasung im Kulturkolben

Für eine zusätzliche Sauerstoffversorgung in der Submerskultivierung von *C. globosum* wurde jeweils 100, 100, 250, 400 und 500 mL angewachsene Experimentalkultur in sterilisierte Kulturkolben der Volumina 0,1, 0,1, 0,5, 1 und 1 L überimpft und somit unterschiedliche Oberflächen des Kulturmediums eingestellt (490, 314, 227, 176 und 112 cm²). Es wurden 2,25 mM (+)-Valencen zudosiert.

In einem zweiten Ansatz wurde das Gasvolumen des Kopfraums eines 500 mL-Erlenmeyerkolbens, der 200 mL Experimentalkultur enthielt, mit einem Sauerstoffstrom vollständig ausgetauscht (Volumen 250 mL). Die Zugabe des Precursors erfolgte nach der Sauerstoffversorgung vom dritten bis zum sechsten Kultivierungstag mit jeweils 50 µL, so dass eine Enddosierung von 4,5 mM erreicht wurde.

5.2.3.6 Dosierung des Terpenalkohols Carveol

Zur Transformation von (-)-Carveol mit *Pleurotus sapidus* wurden jeweils 50 µL des Terpenalkohols (47,9 mg) pro 100 mL-Submerskultur vom dritten bis zum sechsten Kultivierungstag zudosiert, so dass eine Enddosierungsmenge von 191,6 mg L⁻¹ (12 mM) erhalten wurde.

5.2.3.7 Zugabe der Inhibitoren DABCO und Proadifen sowie von Eisen(III)Ionen

Der Monooxygenase-Inhibitor SKF-525 A (Proadifen) sowie der Singulett-Sauerstoff-Hemmstoff DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) wurde vor der Zudosierung in unvergälltem Ethanol gelöst, sterilfiltriert und dann 100 µL dieser Lösung zu Beginn der Substratdosierung zur Submerskultur zugegeben, so dass eine Endkonzentration der Inhibitoren von 0,1 mM im Kulturvolumen erreicht wurde. Zur zusätzlichen Supplementierung von Eisen wurde Eisen(III)chlorid in destilliertem Wasser gelöst und nach Sterilfiltration zur Kultur hinzugegeben, so dass eine Konzentration von 0,3 mM Eisen als Eisen(III)chlorid erreicht wurde.

5.2.3.8 Blindwerte

Alle Blindwerte wurden analog zum entsprechenden Biotransformationsversuch (5.2.3.1-5.2.3.7) durchgeführt, wobei zwischen chemischem und biologischem Blindwert unterschieden wurde. Der chemische Blindwert wurde nur mit Medium ohne Kultur durchgeführt, wobei entsprechendes Terpen zeitgleich zur Biotransformationskultur zugesetzt wurde. Der biologische Blindwert wurde ohne Substratdosierung, aber mit vitaler Kultur durchgeführt. Er war insbesondere bei adaptierten Kulturen relevant, um über die Inokulierung eingetragene Produktmengen zu erfassen. Blindwerte in Gegenwart von autoklaviertem Mycel wurden entsprechend einer Biotransformationskultur inkubiert, wobei die Biomasse durch Autoklavieren zuvor inaktiviert wurde.

5.3 Enzymatische Transformationen

5.3.1 Transformationen mit Exoenzymen

5.3.1.1 Gewinnung von Exoenzymen

Aus Vorkulturen wurden drei Experimentalkulturen mit 100 mL-SNL-Hefe-Medium mit Se(IV)/Co(II)-Supplementierung übergeimpft. Eine Zugabe von a) Toluol (Endkonzentration 1-2 mM) und b) Veratrylalkohol (1mM) erfolgte nach drei Tagen Kultivierungszeit. Ebenfalls wurde ein Ansatz ohne Zugabe kultiviert. Die Probenahme erfolgten am zweiten und siebten Tag nach Induktion. Am zweiten Tag nach Induktion wurde ca. die Hälfte des Kulturmediums entnommen (~ 50 mL) und durch frisches, supplementiertes Medium ersetzt. Die Probe wurde unter flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Nach sieben Tagen wurde das komplette Medium abgenommen und mit dem vorher entnommenen Medium nach Auftauen vereinigt. Die Abtrennung der Biomasse erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 rpm (2000 g). Die Messung von pH-Wert, H₂O₂ und Glucose erfolgte bei Probenahme.

5.3.1.2 Nachweis von Oxidationsaktivitäten

Zu den drei in 5.3.1.1 gewonnenen Kulturüberständen wurden äquimolare (2 mM) Mengen von Limonen, Dimethylallylalkohol, Thymol in DMF zusammen zugegeben und die DMF-Konzentration auf 3% (v/v) eingestellt. Die Umsetzung erfolgte bei 200 rpm und 24 °C für 4 h.

Die Produkte wurden durch SPME-Adsorption (5.5.3.5) aus 5 mL Medium adsorbiert. Bei Nachweis von Produkten erfolgte eine Extraktion mit Pentan/Ether, anschließendem Trocknen des Extraktes mit Natriumsulfat und destillative Abtrennung des Lösungsmittels.

5.3.2 *R*-(+)-Limonen-Transformation mit Rohextrakten

5.3.2.1 *R*-(+)-Limonen-Transformation mit Rohextrakten aus induzierter Biomasse von *P. sapidus* und *F. proliferatum*

Experimentalkulturen von *P. sapidus* (200 mL) wurden nach drei Tagen mit 0,62 mM Limonen induziert und nach weiteren zwei Tagen zur Biomassengewinnung aufgearbeitet.

Für den Zellaufschluss wurden 50 g Biomasse durch Zentrifugation (4000 U min⁻¹ [2000 g] 10 min) und zweimaliges Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung vom Medium getrennt und in einer Rührwerkskugelmühle (5.1.5) mit 40 mL Extraktionspuffer (A: Citratpuffer 0,1 M, pH 6 bzw. B: 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4, 0,25 M Saccharose, 1 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mM EDTA, 5 µM FAD, 0,7 g PVP, Croteau, *et al.*, 2001) und 70 mL Glasperlen für 10 min mit 4000 rpm aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde bei 4 °C durchgeführt.

Die Umsetzung erfolgte mit 50 mL des jeweiligen Rohextraktes unter Zugabe von 1 mM *R*-(+)-Limonen über Nacht. Ebenfalls wurden biologische und chemische Blindwerte mitgeführt. Produkte wurden durch Extraktion, wie in 5.3.2.2 beschrieben, gewonnen.

5.3.2.2 *R*-(+)-Limonen-Transformation mit *solubilisierten* Rohextrakten aus induzierten Kulturen von *P. sapidus* und *F. proliferatum*

Experimentalkulturen von *P. sapidus* (200 mL) wurden nach drei Tagen mit 0,62 mM *R*-(+)-Limonen induziert und nach weiteren zwei Tagen zur Biomassengewinnung aufgearbeitet.

Experimentalkulturen von *F. proliferatum* (200 mL) wurden nach einem Tag mit 0,62 mM Limonen induziert und nach einem weiteren Tag aufgearbeitet.

50 g Biofeuchtmasse wurde, wie in 5.3.2.1 beschrieben, unter der Verwendung eines Tris-Extraktionspuffers (50 mM Tris-HCl, 20 % Glycerol, 5 mM MgCl₂, 5 µM FAD, 5 mM PMSF, pH 7,5) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde zur Solubilisierung im Emulgator Triton X-100 (2 %ig) auf Eis 1 h gerührt und bei 10.000 rpm (15.764 g) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL Extraktionspuffer aufgenommen.

Die Umsetzung erfolgte mit 5 mL des jeweiligen Rohextraktes unter Zugabe von *R*-(+)-Limonen (1,25 mM) über Nacht. Zusätzlich wurde ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt (1mM NADPH, 5 mM Glucose-6-Phosphat, 10,8 i.U. Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase). Die Produkte wurden durch zweifache Extraktion mit 10 mL Pentan/Ether-Gemisch unter Zugabe des inneren Standards Campher (50 µg) gewonnen. Der Extrakt wurde destillativ eingeeengt und gaschromatographisch quantifiziert.

5.3.3 (+)-Valencentransformation mit Laccasen aus *Trametes spec.*

Mit kommerziell erhältlicher Laccase aus *Trametes spec.* wurde eine Transformation von (+)-Valencen durchgeführt. Hierzu wurden zu 2 ml 0,1 M Citratpuffer mit Zusatz von 0,5% v/v Emulgator Tween 80 in Ansatz 1) 7,2 U Laccase mit 10 µL ABTS-Lösung (0,5 mM), 2) Laccase ohne ABTS-Lösung, 3) ABTS-Lösung ohne Laccase und 4) weder Laccase noch ABTS-Lösung gegeben und mit 10 µL (+)-Valencen (30,1 mM) versetzt (Huang *et al.*, 2001). Die Umsetzung erfolgte 17,25 und 44,5 h. Die Ansätze wurden mit 2 mL Pentan/Ether (iStd. Camphor 50 µg) extrahiert.

5.4 Terpentransformation mit Lyophilisaten

5.4.1 Herstellung von Lyophilisaten

Aus drei Tage alten Vorkulturen des jeweiligen Organismus wurden Experimentalkulturen angezogen (siehe Punkt 5.2.2.5). Nach viertägiger Kultivierung wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (2000 g, 10 min.) abgetrennt und mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Zellmasse wurde in ein 400 mL Becherglas überführt, unter flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter sterilen Bedingungen gefriergetrocknet. Induzierten Kulturen wurden nach zweitägiger Kultivierungsdauer 20 µL *R*-(+)-Limonen pro 200 mL Kulturansatz zugegeben.

5.4.2 Transformationsversuche mit Lyophilisaten

In einem 4-mL-Schraubdeckelgläschen wurden zu 50 mg Lyophilisat 1,5 mL MOPS-Puffer (pH 7,0) gegeben und die getrocknete Zellmasse für eine Stunde in Horizontallage bei 200 rpm und 24 °C rehydratisiert. Nach Zugabe von 10 µL Terpen (Limonen 41,4 mM, Valencen und Farnesen 27,5 mM) erfolgte die Umsetzung für 24 h bei 150 rpm und 24 °C. Die Proben wurden nach Zugabe des inneren Standards (Campher für Limonentransformation, Thymol für Sesquiterpentransformation; jeweils 55,3 µg) mit 2 mL Pentan/Ether-Gemisch extrahiert und der Extrakt nach Trocknen über Natriumsulfat in den Gaschromatograph injiziert.

5.5 Analytik

5.5.1 Probenahmeverfahren

5.5.1.1 Probenahme in Transformationsversuchen

Aus den jeweiligen Submerskultivierungen wurden täglich nach Umschwenken 5 mL-Proben genommen und diese bei 4000 rpm (2000 g) zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde nach 5.5.3.2 extrahiert. Zur Analytik der Sesquiterpene wurden 5 mL ohne Abtrennung der Biomasse extrahiert (5.5.3.3).

5.5.1.2 Probenahme in Optimierungsversuchen

Kultivierungen zur Transformation, die der Untersuchung von exogenen Faktoren auf die Transformationsleistung dienten (2.3.9-2.3.11), wurden zu den jeweils angegebenen Transformationstagen gestoppt und 100 mL Kultur dreimal mit 50 mL Pentan/Ether-Gemisch extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereint, über Natriumsulfat getrocknet und destillativ eingeeengt. Sie wurden gaschromatographisch quantifiziert (5.9.2.2).

5.5.1.3 Probenahme aus dem Bioreaktor

Aus dem Bioreaktor wurden 40 mL Medium entnommen und bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Rückstand wurde zur Trockenmassebestimmung nach 5.5.2.1 verwendet. 30 mL des Überstandes wurden nach Zusatz des inneren Standards Thymol (55,3 µg) dreimal mit 20 mL Ethylacetat extrahiert und wie in 5.5.1.2 behandelt.

5.5.1.4 Untersuchung der Bioreaktor-Abluft

Die Abluft des Bioreaktors wurde während der Transformation direkt durch eine Glassäule (1 x 12 cm) mit 10 g aktiviertem Lewatit geleitet. Das Lewatit wurde am Ende der Transformation mit 3 x 30 mL Pentan/Ether extrahiert, der Extrakt in der Vigreux-Destillation aufkonzentriert, über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch untersucht (5.9.2.2). Die Aktivierung des Lewatits wurde durch eine dreimalige Reinigung mit Methanol, Ether und Hexan mit jeweils dem doppelten Volumen des Harzes durchgeführt und das Lewatit im Trockenschrank getrocknet.

5.5.2 Bestimmung von Kulturparametern

5.5.2.1 Bestimmung der Zellmasse

- Feuchtmasse:

Nach Zentrifugation der Pilzkulturen bei 4000 rpm (2000 g) wurde der Überstand abgossen und die Zellmasse in den Zentrifugenbehältern ausgewogen.

- Trockenmasse:

Ein aliquoter Teil der Pilzkultur wurde über ein tariertes Filterpapier abgesaugt und der Filter 24 h bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend ausgewogen.

Schnellmethode: Ein aliquoter Teil der Pilzkultur wurde in ein tariertes Zentrifugenglas gegeben und nach Zentrifugation zweimal mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gewaschen und 24 h bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und ausgewogen.

5.5.2.2 Glucosegehalt

- Photometrische Bestimmung:

Die Glucose wurde enzymatisch mit dem Glucose (HK) 16-UV Kit von Sigma Diagnostics nach Herstelleranweisung durchgeführt.

- Schnellmethode (Teststäbchen):

Die Durchführung erfolgte mittels Diabur-Test[®] 5000 von Boehringer Ingelheim nach Herstelleranweisung.

5.5.2.3 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde direkt nach den Probenahmen mit einem täglich kalibrierten pH-Meter bestimmt.

5.5.2.4 Prüfung auf Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wurde mit Analysestäbchen (Merck, 1.1.0011.0001) nachgewiesen.

5.5.2.5 Prüfung auf Kontaminationen

Es erfolgte eine Prüfung des Kulturmediums auf Kontaminationen durch eine mikroskopische Untersuchung. Hierbei waren insbesondere Hefen und Bakterien relevant.

5.5.3 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

5.5.3.1 Extraktion von Kulturüberständen

Die Kulturen (200 mL) wurden nach beendeter Transformation mit internem Standard versetzt (Campher bzw. Thymol in ethanolischer Lösung, Endkonzentration 25 mg L⁻¹). Die Abtrennung der Biomasse erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 rpm (2000g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit 3 x 100 mL Pentan/Ether-Lösungsmittelgemisch extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C Badtemperatur eingengt. Der erhaltene Extrakt wurde mittels GC und GC-MS untersucht.

5.5.3.2 Mikroextraktion („LPME – Liquid phase micro extraction“)

1 mL Kulturüberstand der Probe aus 5.5.1.1 wurde nach Zusatz von 0,5 g Natriumchlorid und innerem Standard Campher (50 µg) mit 1 mL Hexan extrahiert, der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet und on-column in den Gaschromatograph (5.9.2.1) injiziert.

5.5.3.3 Extraktion der Gesamtkultur

Aufgrund des ungünstigen Verteilungskoeffizienten für lipophile Substanzen wurden die Proben aus der Valencen- und Farnesentransformation jeweils mit Mycel extrahiert. Hierzu wurden zu jeweils 4 mL Probe 0,2 g Natriumchlorid und 0,5 mL Aceton gegeben und nach Vermischung mit 4 mL Pentan/Ether-Gemisch extrahiert. Bei Emulsionsbildung wurden die Proben bei 4.000 rpm (2000 g) zentrifugiert und nach Trocknen über Natriumsulfat gaschromatographisch untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über Kalibrierung mit externen Standardreferenzen (Nootkaton, (+)-Valencen).

5.5.3.4 Aufarbeitung von Pilzmycel zur Bestimmung der Edukt- und Produktverteilung

Die Extraktion von Pilzmycel wurde zur Bestimmung des Verteilungsgleichgewichtes von Precursor und Produkten in Kulturüberstand, Cytosol und Zellwand-/Membranbestandteilen benötigt. Die Gewinnung der extrazellulären Fraktion erfolgte nach vier Tagen Transformationszeit (Kulturalter 7 Tage) durch Zentrifugation bei 4000 rpm (2000 g) für 10 min, zweimaliges Waschen des Myzels mit 0,9% Natriumchloridlösung und anschließender Extraktion der vereinigten wässrigen Phasen. Der darauf folgende Aufschluss der Zellmasse (20,3 g Biofeuchtmasse) erfolgte mit der Rührwerkskugelmühle bei 4 °C für 10 min unter Zusatz von 40 mL Glasperlen, 10 mL Wasser und 1 mg Natriumazid mit anschließender Zentrifugation bei 12.000 g und lieferte die überstehende, *cytosolische* Fraktion sowie die verbleibende *Zellwand/Membranfraktion*. Auftretende Emulsionen bei der Extraktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Der Gehalt an Edukt und Produkten wurde auf 1 L Kulturvolumen hochgerechnet. Die Quantifizierung erfolgte über externe Kalibrierung.

5.5.3.5 SPME–Extraktion

Zu 5 mL Medium wurden 0,5 g Natriumchlorid und ein innerer Standard (Campher, 20 mg L⁻¹) zugegeben und eine Acrylamid-SPME-Faser (Supelco) hineingetaucht. Die Verbindungen wurden für 45 min bei 250 rpm extrahiert. Die Faser wurde im Split-splittless-Injektor eines GCs für 3 min bei 230 °C desorbiert (5.9.2.2).

5.6 Bestimmung von Geruchsqualitäten und Geruchsschwellen

Die Geruchsqualitäten und -schwellenwerte im Verdünnungsmedium Luft wurden mittels GC-O in Anlehnung an die Arbeiten von Christoph (1983) bestimmt.

Bei der Gaschromatographie mit olfaktorischer Detektion (GC-O, siehe 5.9.2.4) ist die Kapillarsäule am Ende mit einem Y-Glasverbinder versehen, der den Gasstrom über zwei kurze Säulenstücke zu gleichen Teilen in den FID-Detektor und den Sniffport leitet. Der Sniffport wurde auf 200 °C beheizt, um ein vorzeitiges Kondensieren der Substanzen zu verhindern, und mündete in einem mit Teflonband abgedichteten Glastrichter. Jede untersuchte Substanz wurde von drei Testpersonen bezüglich ihrer Geruchsqualität und ihres Geruchsschwellenwertes beurteilt. Dabei galt als Erkennungsschwelle die Konzentration bzw. Intensität einer Substanz, bei der ihre charakteristischen Geruchseigenschaften für mindestens die Hälfte der Testpersonen noch eindeutig erkennbar waren.

Die Erkennungsschwellen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{c \cdot V}{2} \text{ mit:}$$

M = Reizmenge, die am Sniffausgang eluiert wird [ng],

c = Konzentration der Lösung [ng μL^{-1}],

V = Einspritzvolumen [μL].

5.7 Chemische Synthesen

5.7.1 Epoxidierung von (+)-Valencen mit m-Chlorperbenzoesäure

Zu einer Lösung aus 3,06 g (0,015 mol) Valencen in 100 mL Dichlormethan wurde bei 5 °C unter Rühren 3,6 g (0,016 mol) 75 %ige m-Chlorperbenzoesäure zugesetzt und nach Lösen bei 5 °C 23 h gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit 25 mL 10 %iger Natriumsulfitlösung, mit 50 mL 1 %iger Natronlauge und mit 50 mL destilliertem Wasser gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und aufkonzentriert (Synthese nach Ziegler, 1997).

Ausbeuten: **Monoepoxide**: KI 1974 (CW 20M): 19,1 %, 584 mg; KI 2002: 34,2 %, 1046 mg; KI 2036: 3,2 %, 99 mg; *Valencen-11,12-epoxid* KI 2093, 4,1 %, 124 mg; **Diepoxide**: KI 2388: 2,6 %, 78 mg; KI 2404: 3,3 %, 1001 mg; KI 2410: 3,0 %, 92 mg; KI: 2462: 0,5 %, 15 mg.

Das (+)-Valencen wurde an einer Chromatographiesäule (5 cm x 30 cm) an Kieselgel mit Pentan abgetrennt und die Epoxide mit steigendem Ethergehalt des Laufmittels als Isomergemisch gewonnen. Die Fraktionierung und Aufreinigung erfolgte über die präparative Gaschromatographie (5.9.2.6).

5.7.2 Oxidation von (+)-Valencen zu Nootkaton

Zur Herstellung von tert.-Butylchromat wurden 20 mL tert.-Butanol zu 6,8 g Chrom(VI)oxid hinzugegeben und diese Mischung bei 30 °C für 15 min gerührt. Zu dieser Lösung wurden dann 60 mL Hexan hinzugegeben, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet, das fertig gestellte tert.-Butylchromatreagenz tropfenweise zu 2,5 g (+)-Valencen in 60 mL Hexan, 10 mL Eisessig und 2,6 mL Acetanhydrid gegeben und für 45 min bei 50 °C, dann bei 60 °C für 22 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gekühlt, mit 180 mL 10%iger Oxalsäurelösung versetzt und für 30 min gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, zweimal mit Wasser, einmal mit 10%iger K₂CO₃-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nootkaton wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel vom verbliebenen Valencen abgetrennt (Synthesen nach Hunter, 1965). Nootkaton wurde über NMR-Spektroskopie identifiziert. Ausbeute: 53,3%; 1,33 g Nootkaton (**32**).

Strukturdaten von **32**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 0,95 (d, 3H, J³ = 6,8 Hz, C14); 1,15 (s, 3H, C15); 1,4 (m, 2H, C8); 1,75 (s, 3H, C13); 1,9 (m, 2H, C6), ~2,0 (m, 1H, C4), 2,2 (q, 2H, C3), 2,3-2,4 (m, 1H, C7), 2,6 (m, 2H, C9), 4,74 (d, 2H, J² = 9,4 Hz, C12), 5,77 (s, 1H, C1).

5.7.3 Reduktion von Nootkaton zu α- und β-Nootkatol

112 mg Nootkaton (0,5 mmol) wurden in 5 mL wasserfreiem Diethylether gelöst und unter Rühren bei 0 °C langsam mit 0,5 mL 1 M Lithiumaluminiumhydridlösung (0,5 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde nach 24 h durch Zusatz von 1 g MgSO₄ x 7 H₂O beendet und mit Magnesiumsulfat wasserfrei eine weitere Stunde getrocknet. Nach Abfiltrieren der festen Bestandteile wurde der Ether mit Wasser gewaschen, getrocknet und anschließend eingeeengt. Es wurden 54,8 mg (48,8% Ausbeute) β-Nootkatol erhalten (KI 2394), α-Nootkatol entstand nur zu 3,1 mg (2,7%, KI 2426). Die Nootkatole wurde durch präparative Gaschromatographie (100°C, 3 min., 5 °C min.⁻¹, 220 °C) aufgereinigt und über NMR-Spektroskopie identifiziert (Synthese nach de Kraker, 2003).

Ausbeute: 94,2%; 105 mg α-Nootkatol (**31a**); 3,0%, 3 mg β-Nootkatol (**31b**).

Strukturdaten von **31a**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 0,88 (d, 3H, C14); 1,01 (s, 3H, C15); 1,22 (m, 2H, C8); 1,35-1,6 (m, 1H, C4); 1,68 (s, 3H, C13); ~1,7-1,9 (m, 2H, C9); 1,81 (m, 2H,

C3); 2,1 (m, 2H, C6), 2,34 (m, 1H, C7), 4,2-4,3 (d, 1H, C2), 4,72 (d, 2H, C12); 5,37 (d, 1H, C1).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} = 15,7 (C14); 18,8 (C15); 21,1 (C13); 32,7 (C6); 33,3 (C8); 37,8 (C4); 38,2 (C9); 39,6 (C5); 41,2 (C7); 45,0 (C3); 68,5 (C2); 108,8 (C12); 124,9 (C1); 146,9 und 148,2 (C10 und C5).

5.7.4 Epoxidierung von Nootkaton bzw. Nootkatol mit m-Chlorperbenzoesäure

Analog zu 5.7.1 wurde zu einer Lösung aus 0,6 g (2 mmol) Nootkaton bzw. Nootkatol in 20 mL Dichlormethan bei 5 °C unter Rühren 0,5 g (3 mmol) 75 %ige m-Chlorperbenzoesäure zugesetzt und nach Lösen bei 5 °C 23 h gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit 5 mL 10 %iger Natriumsulfitlösung, mit 10 mL 1 %iger Natronlauge und mit 10 mL dest. Wasser gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und aufkonzentriert. Die Standards wurden zur Identifizierung der Verbindung **33** verwendet; deswegen fand keine kernresonanzspektroskopische Untersuchung des Syntheseproduktes statt. Strukturdaten siehe 2.3.4.4.

5.8 Derivatisierungen

5.8.1 Derivatisierung mit Dansylhydrazon zur DC Analyse (Anderson, 1985)

Zu 100 μL Extrakt einer Mikroextraktion (5.5.3.2) wurden 200 μL 0,01 M HCl in Methanol und 40 μL Reaktionslösung (10 mg Dansylhydrazin in 1 ml 0,01 M HCl in Methanol) gegeben. Nach 2 h Reaktion bei Raumtemperatur wurden die derivatisierten Proben an Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographieplatten (Merck) mit dem Fließmittel Hexan/Ethylacetat 5:20 aufgetrennt und unmittelbar nach Abdampfen des Lösungsmittels mit einer 25%igen Polyethylenglycol(PEG 400)-Lösung in Dichlormethan besprüht. Die Detektion erfolgte bei 360 nm (gelbe Fluoreszenz auf blauen Untergrund).

Eine quantitative Auswertung erfolgte durch Scannen der Chromatographieplatte und Auswerten der Fluoreszenzintensitäten über die Software Gel Scan 3D Version 2.5.

5.8.2 Silylierung für die Gaschromatographie

Zur Silylierung wurden 80 μL der in Pentan/Ether gelösten Probe mit 20 μL BSTFA (bis-(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid) oder BSTFA mit 1% Trimethylchlorsilan versetzt. Die Silylierung fand über Nacht bei Raumtemperatur statt.

5.9 Chromatographie

5.9.1 Säulenchromatographie: Adsorptionschromatographie an Kieselgel

Eine Glassäule (3 x 30 cm) mit Fritte (Por. 2) wurde mit Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck) befüllt und mit Pentan equilibriert. Nach Aufgabe der Probelösung in Pentan wurden die zu isolierenden Substanzen durch Variation der Lösungsmittelzusammensetzung (Pentan/Diethylether 100:0 \Rightarrow 0:100) eluiert und die Säule durch Spülen mit Methanol regeneriert. Die gesammelten Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel 60 mit Fließmittel Dichlormethan getrennt, mit Ethanol-Schwefelsäurereagenz (20% konzentrierte Schwefelsäure in Ethanol) besprüht und bei 105 °C entwickelt.

5.9.2 Kapillargaschromatographie (HRGC)

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

Gaschromatograph:	Fisons GC 8000 Series
Injektor:	Cold on column, 50 °C, Kühlung
Vorsäule:	FS-CW desaktiviert, 3 m \times 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	J&W Innowax, 30 m \times 0,32 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke
Detektor:	FID, 250 °C
Trägergas:	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,5 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ :50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramme:	Limonentransformation: 50 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 150°C, 10 min, 5°C min ⁻¹ – 240 °C (10 min) Sesquiterpententransformation: 100 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ – 240 °C (5 min)

5.9.2.2 HRGC mit Split-Splitless-Injektion und Flammenionisationsdetektor (FID) für silylierte Proben und SPME-Desorption

Gaschromatograph:	Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series
Injektor:	Split-Splitless (Splittverhältnis 1:20), 230 °C, Splitöffnung nach 1 min
Vorsäule:	FS-Phenyl-Sil desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	Optima 5-MS, 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	FID, 250 °C
Trägergas:	H ₂ ; Vordruck: 70 kPa; Fluss: 2,5 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramme:	50 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ – 280 °C (10 min)

5.9.2.3 HRGC mit On-Column-Injektion zur chiralen Trennung

Gaschromatograph:	Siemens Sichromat 1-4 Doppelofen
Injektor:	PTV, 50 °C, 0,5 min-150 °C min ⁻¹ , 230 °C, 1 min
Trennsäule (linker Ofen):	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Chirale Säule (rechter Ofen):	Macheray-Nagel Hydrodex β-3P (25 m x 0,25 mm i.D., Trennphase: Heptakis-(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin verdünnt mit OV-1701)
Detektoren:	FID, 250 °C
Trägergas:	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,2 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chromatopac C-R3A Integratoren (Shimadzu)
Temperaturprogramm:	Linker Ofen: 50 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ – 230 °C (10 min). Rechter Ofen: 50 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ – 100 °C (20 min), 1 °C min ⁻¹ 220 °C.

5.9.2.4 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O)

Gaschromatograph:	Satochrom (Sato)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Vorsäule:	FS-CW desaktiviert, 3 m × 0,32 mm ID (Chromatographie-Service)
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	FID, 250 °C; Sniff-Port, 220 °C
Trägergas:	H ₂ ; Vordruck: 50 kPa; Fluss: 3,3 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ :50 kPa; Luft: 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 4 °C min ⁻¹ - 230 °C (10 min)

5.9.2.5 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)GC 1:

Gaschromatograph:	GC 8000 (Fisons)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Trennsäule:	CW 20M, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Macherey & Nagel)
Detektor:	MD 800 (Fisons)
Trägergas:	He, Vordruck: 50 kPa, Fluss 3,1 ml min ⁻¹
Temperaturen:	Ionenquelle 200 °C, Interface 230 °C, Quadrupol Massenfilter 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	<i>m/z</i> 33-400
Datenaufnahme:	Masslab Version 1.3 (Fisons)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min), 5°C min ⁻¹ - 230 °C (20 min)
Auswertung:	Spektrenbibliothek Wiley, NBS54K (Nist), LMC

GC 2:

Gaschromatograph:	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor:	Cold on column, 40 °C
Trennsäule:	BC SE 54, 30 m × 0,32 mm ID, 0,4 µm Filmdicke (Leupold)

Detektor:	Mass Spectrometer 5989 A (Hewlett - Packard)
Trägergas:	He, Vordruck: 50 kPa, Fluss 3,3 mL min ⁻¹
Temperaturen:	Ionenquelle 250 °C, Interface 250 °C, Quadrupol Massenfilter 100 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	<i>m/z</i> 33-500
Datenaufnahme:	MS HP-UX Chem Station, B06.01 Software
Temperaturprogramm:	50 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 280 °C (10 min)

5.9.2.6 Präparative Gaschromatographie

Gaschromatograph:	GC 5890 Series II (Hewlett-Packard) mit MCS (Gerstel)
Injektor:	KAS-3 Kaltaufgabesystem (Gerstel), 40 °C
Autosampller:	HP 7673 (Hewlett-Packard), Injektionsvolumen 5 µL
Fraktionensammler:	PFS (Gerstel)
Säule 1:	BC CW 20M, 3 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Säule 2:	BC CW 20M, 25 m × 0,53 mm ID, 2 µm Filmdicke (Leupold)
Detektoren:	Vor-/Hauptdetektor: FID, 250 °C
Gase und Strömungen:	Trägergas: H ₂ ; Fluss: 5 mL min ⁻¹ Gegengase 1 und 2: H ₂ ; 10 mL min ⁻¹ Hilfsgase 1 und 2: H ₂ ; 1 mL min ⁻¹
Detektorgase:	H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa
Temperaturen:	Transferleitung 200 °C, Verteiler 200 °C, Fallen -10 °C
Temperaturprogramm:	70 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ - 210 °C (10 min)
Datenaufnahme und Steuerung:	Vectra QS/16S (Hewlett-Packard) mit MCS 1.15 Software (Gerstel)

5.9.2.7 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

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

mit: N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert
 n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
 A = Analyt
 t' = relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t₀

Die Alkanreihe enthielt alle Alkane von C₁₁ bis C₃₀ mit Ausnahme von C₂₇ und C₂₉.

5.9.2.8 Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee)

Der Enantiomerenüberschuss wurde berechnet nach:

$$ee(\%) = 100 \cdot \frac{Area_1 - Area_2}{Area_1 + Area_2}$$

mit: Area₁ = Peakfläche des überwiegend vorliegenden Enantiomers
 Area₂ = Peakfläche des geringer vorliegenden Enantiomers

5.9.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

5.9.3.1 HPLC-DAD-ELSD (serielle Kopplung Diodenarraydetektor und Evaporative Light Scanning Detector)

Pumpe:	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Degasser:	Jasco DG-980-50 3-Line Degasser
Gradientenformer:	Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit
Flussrate:	0,8 mL min. ⁻¹
Injektionsventil:	Rheodyne RH 7725i mit 20 µL Probenschleife
Säule:	Macheray-Nagel Nucleosil 250/4,CC 100-RP-18 mit Vorsäule
Fließmittel:	Methanol-Wasser-Gradient (0 bis 5 min. 40%:60%; 15 min bis 25 min 100% Methanol, 30 bis 35 min. 40%/60%)
Diodenarray Detektor:	Jasco MD-910 Multiwavelength Detector Wellenlängen 190 – 480 nm.

ELSD:	Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich), Gain 11, Verdampfungstemperatur 38 °C, Druckluft 2,0 bar
Datenaufnahme:	Dell Dimension 166a mit Borwin-PDA V1.0 (JMBS Developements, Le Fontanil, Frankreich)

5.9.3.2 HPLC-MS (Kopplung Massenspektrometer)

LCMS System:	Shimadzu, LCMS-QP8000 α
Degasser:	Shimadzu DGU-12A
Gradientenformer:	LC-10AD/LC-10ATVP
Flussrate:	0,5 mL min. ⁻¹
Injektionsventil:	20 μ L Probenschleife
Säule:	Macheray-Nagel Nucleosil 250/4,CC 100-RP- 18 mit Vorsäule
Fließmittel:	Methanol-Wasser isokratisch 90:10
vorgeschalteter UV-Detektor	Shimadzu SPD-10AvP, 210 nm
Massenspektrometer:	Shimadzu LCMS-QP8000 α APCl-positiv-Modus

5.10 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer:	Perkin Elmer Lambda 12
Datenaufnahme:	UV Win Lab (Version 2.0)
Schichtdicke der Küvette:	1 cm

5.11 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektrometer:	Bruker WP-400
Lösungsmittel:	CDCl ₃
¹ H-NMR:	400 MHz
¹³ C-NMR:	50 MHz
Messverfahren:	¹ H, ¹³ C, ¹ H, ¹ H-COSY, ¹ H, ¹³ C-HMQC, TOCSY, NOE.

5.12 Entsorgungshinweise

Biologisches Material

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Filtration wurde das Medium in das Laborabwasser und feste Bestandteile in den Laborabfall gegeben.

Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch die verwendeten Aufarbeitungsverfahren (Mikroextraktion) sowie durch weitgehende Wiederverwendung destillativ gereinigter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenierter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel.

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

6 Literaturverzeichnis

Abraham, W.-R., Hoffmann, H.M.R., Kieslich, K., Reng, G., Stumpf, B. (1985), Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids, in: Porter, R., Clark, S. (Ed.), *Enzymes in Organic Synthesis, Ciba Foundation Symp.* 111, Mai 1984, S. 146-180.

Abraham, W.-R., Stumpf, B. (1987), Biotransformation of Humulene by Fungi and Enantioselectivity of the strains used, *Z. Naturforsch.* **42c**, 79-86.

Abraham, W.-R., Arfmann, H.-A., Giersch, W. (1992), Microbial Hydroxylation of Precursors of Sinensal, *Z. Naturforsch. Section C J. Biosci.* **47** (11-12), 851-858.

Achterholt, R., Priefert, H., Steinbüchel, A. (2000), Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR 167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 799-807.

Abdel-Raheem, A., Shearer, C.A. (2002), Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal diversity.* **11**, 1-19.

Adams, R.P. (1995), Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Acad. Press, Inc., New York.

Agrawal, R., Deepika, N., Joseph, R. (1999), Strain improvement of *Aspergillus* sp. by induced mutation for biotransformation of α -pinene to verbenol, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 249-252.

Agrawal, R., Joseph, R. (2000), Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 335-337.

Akiyama, R., Sato, Y., Kajiwara, S., Shishido, K. (2002), Cloning and expression of cytochrome P450 genes, belonging to a new P450 family, of the basidiomycete *Lentinula edodes*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**(10): 2183-2188.

Alba, M.J.G., Calvo, E.G. (2000), Characterization of bioreaction processes: Aerobic Escherichia coli cultures, *J. Biotechnol.* **84**, 107-118.

Aleu, J., Hanson, J.R., Galan, R.H., Collado, I.G. (1999), Biotransformation of the Fungistatic Sesquiterpenoid Patchulol by *Botrytis cinerea*, *J. Nat. Prod.* **62**, 437-440.

Andersson, J.M. (1986), Fluorescent Hydrazides for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biological Carbonyls, *Anal. Biochem.* **152**, 146-153.

Anet, E.F.L.J. (1969), Autoxidation of α -Farnesene, *Aust. J. Chem.* **22**, 2403-10.

Arantes, S., Fraoq, A., Hanson, J.R. (1999), The preparation and microbial hydroxylation of the sesquiterpenoid nootkatone, *J. chem. res. (S)*, 248.

Aromenverordnung i.d.F. vom 22.12.1981, zuletzt geändert durch Verordnung zur Änderung der Aromenverordnung und zur Aufhebung lebensmittelrechtlicher Vorschriften für Teigwaren vom 18.6.2001.

Bast, E. (1999), Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum Verlag Heidelberg.

Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001), Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. Ausg., Springer, Berlin.

- Berger, R.G., Latza, E., Krings, U., Preuss, A., Treffenfeldt, W., Vollmer, H. (2000), Process for selective enrichment and separation of aroma molecules by adsorption, *Patent EP 0979806*.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E. (1997), Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2495-2501.
- Bohlmann, F., Suwita, Q., King, R.M., Robinson, H. (1980), Neue ent-Labdan-Derivate aus *Austroeurpatorium chaparensis*. *Phytochem.* **19**, 111-114.
- Bouwmeester, H.J., Konings, C.J.M., Gershenzon, J., Karp, F., Croteau, R. (1999), Cytochrome P-450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits of caraway (*Carum carvi*), *Phytochem.* **50**, 243-248.
- Bowen, E.R. (1975), Potential by-products from microbial transformation of D-Limonene, *Florida State Horticultural Society*.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M., Robinson, H. (1984), Phenylethylamide aus *Critoniella acuminata*, *Planta Medica* **50**(2), 187-188.
- Braddock, R.J., Chadwallader, K.R. (1995), Bioconversion of citrus d-limonen, in *Fruit Flavours: Biogenesis, Characterization and Authentication: Proc. Symp.*, Chicago, MI: August 1993, 142-148, Washington, DC: ACS.
- Breitmeier, E. (1999), Terpene: Aroma, Düfte, Pharmaka, Pheromone, Teubner-Verlag, Stuttgart.
- Brown, C.A., Black, S.D. (1989), Membrane Topology of Mammalian Cytochromes P-450 from Liver Endoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.* **8**, 4442-4449.
- Busmann, D. (1990), Oxyfunktionalisierung und Katabolyse von Terpen-Kohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten, Dissertation, Universität Hannover.
- Bussmann, R.W., Galvez M., J.R., Ordonez G., O.R. Forest Structure in an undisturbed Tropical Mountain Forest in Southern Ecuador. <http://www.natureandculture.org/GermanResearchGroups/papers/AG%20Bussmann/Forest%20structure.pdf>.
- Cabral, J.M.S. (2001), Biotransformations. In: Ratledge, C., Kristiansen, B., *Basic Biotechnology*, 471-501, Cambridge University Press.
- Cadwallader, K.R.; Braddock, R.J., Parish, M.E. (1995), Isolation of α -terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*, *J. Food Sci.* **57**(1), 241-244.
- Cane, D.E. (1999), Sesquiterpene Biosynthesis: Cyclization Mechanisms, aus: Cane, D.E., ed., *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Pergamon.
- Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R. (2002), Influence of reactor configuration on the production of carvone from carveol by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **19-20**, 377-387.
- Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R. (2002b), Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-Carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **19-20**, 389-398.
- Ceen, E.G., Dunhill, P., Herrmann, J.P.R. (1987), Two-Liquid Phase Reactor Studies of 11 α -Hydroxylation of Progesterone by *Aspergillus ochraceus*, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 743-746.
- Chang, H.C., Oriel, P.J. (1994), Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*, *J. Food. Sci.* **59**, 660-662.
- Chayen, R., Mazur, Y., Wyler, H., Berman, Elisha, Potgieter, E., Goldberg, S. (1987), Urodiolenone from grapefruit juice, a urinary metabolite found in hypertensive subjects, *Phytochem.* **27**(2), 369-372.
- Christoph, N., (1983), Die Anwendung der gaschromatographischen Sniffing-Technik zur Bestimmung von Geruchsschwellen und Aromastoffen, Dissertation TU München.

- Crock, J., Wildung, M., Croteau, R. (1997), Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12833-12838.
- Cutler, H.G. (1995), Natural product flavour compounds as potential antimicrobials, insecticides, and medicinals, *Agro Food Industry Hi-Tech – Jul./Aug.*, 19-23
- Dauben, W.G., Lorber, M., Fullerton, D.S. (1969), Allylic Oxidation of Olefin with Chromium Trioxide-Pyridine Complex, *J. Org. Chem.* **34**(11), 3587-3592.
- Davis, N.W. (1990), Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases, *J. Chromatogr.* **503**, 1-24.
- De Araujo, A.A., Pastore, G.M., Berger, R.G. (2002), Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **98-100**, 747-751
- De Araujo, A.A.; Lepilleur, C., Delcourt, S., Colavitti, P., Roussos, S. (1997), Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system, In: Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (Ed.): *Advances in Solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., S. 93-112.
- De Kraker, J.-W., Schurink, M., Franssen, M.C.R., König, W.A., de Groot, A., Bouwmeester, H. (2003), Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots, *Tetrahedron* **59**, 409-418.
- Demyttenaere, J., de Kimpe, N. (2001), Biotransformation of terpenes by fungi: Study of pathway involved, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **11**, 265-270.
- Dewick, P.M. (2001), *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Wiley, Chichester.
- Dhavalikar, R.S., Albroscheit, G. (1973), Mikrobiologische Umsetzung von Terpenen: Valencen, *Dragoco Report*, **12**, 251-258
- Dhavalikar, R.S., Bhattacharyya, P.K. (1966), Microbiological transformation of terpenes: part VIII fermentation of limonene by a soil *Pseudomonas*, *Ind. J. Biochem.* **3**, 144-157.
- Dhavalikar, R.S., Rangachari, P.N., Bhattacharyya, P.K. (1966), Microbiological transformations of terpenes: Part IX. Pathways of degradation of limonene in a soil *Pseudomonad.*, *Ind. J. Biochem.* **3**, 158-164.
- Doig, S.D., Boam, A.T., Leak, D.I., Livingston, A.G., Stuckey, D.C. (1998), A Membrane Bioreactor for the Biotransformation of hydrophobic molecules, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 587-594.
- Dracynska, B., Cagara, C.Z., Siewinski, A., Rymkiewicz, A., Zabza, A., Leufvén, A. (1985), Biotransformation of pinene XVII. Transformation of α - and β -pinenes by of *Armillariella melea* (honey fungus), *J. Basic. Microbiol.* **8**, 487-492.
- 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.
- Dror, Y., Freeman, A. (1995), Stabilization of Microbial Cytochrom P-450 Activity by Creation of Stationary-Phase Conditions in a Continuously Operated Immobilized-Cell Reactor, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3), 855-859.
- Duetz, W.A., Marques, S., Wind, B., Ramos, J.L. (1996), Catabolite Repression of the Toluene Degradation Pathway in *Pseudomonas putida* Harboring pWW0 under Various Conditions of Nutrient Limitation in Chemostat Culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 601-606.
- Duetz, W.A.; Marques, S., de Jong, C., Ramos, J.L., van Andel, J.G. (1994), Inducibility of the TOL Catabolic Pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) Growing on Succinate in continuous culture: Evidence of Carbon Catabolite Repression Control, *J. Bacteriol.*, 2354-2361.

- Duetz, W.A., Fjalman, A.H.M., Ren, S.Y., Jourdat, C., Witholt, B. (2001), Biotransformation of D-Limonene to (+)-*trans*-Carveol by toluene grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2829-2832.
- Duetz, W.A., Jourdat, C., Witholt, B. (2001b), Process for the preparation of perillyl alcohol. *Patent EP* 1236802.
- Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen, J.B. (2003), Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeast, and plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 269-277.
- Einsele, A., Finn, R.K., Samhaber, W. (1984), Mikrobiologische und chemische Verfahrenstechnik, VCH-Weinheim.
- Eltis, L.D., Karlson, U., Timmis, K.N. (1993), Purification and Characterization of cytochrome P450_{RRI} from *Rhodococcus rhodochrous*, *Eur. J. Biochem.* **213**, 211-216.
- Erdtman, H., Hirose, Y. (1962), The Chemistry of the Natural Odor *Cupressales*, *Acta Chem. Scan.*, **a** **16**, 1311.
- Esser, K. (2000), Kryptogamen, Pratikum und Lehrbuch, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Figuerdo, A.C., Almendra, M.J., Barroso, J.G., Scheffer, J.J.C. (1996), Biotransformation of Monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea Millefolium* L. ssp. *millefolium*, *Biotechnol. Lett.* **18**(8), 863-868.
- Fontanille, P., Larroche, C. (2003), Optimization of isonovalal production from α -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 534-540.
- Gary, M.O., Dolan, M.C., Karchesy, J., Panella, N.A. (2002), Compounds for pest control and methods for their use, *Patent WO* 0250053.
- Gehrke, M. (2000), Funktionalisierung von Polystyren-Divinylbenzen-Harzen zur selektiven Festphasenextraktion von Aromastoffen, Dissertation, Universität Hannover.
- Gesetz zur Neuordnung seuchenrechtlicher Vorschriften – (Seuchenrechtsneuordnung – SeuchRNeuG vom 20.Juli 2000; Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG).
- Gillette, J.R., Darbyshire, J.F., Sugiyama, K. (1994), Theory for the observed isotope effects on the formation of multiple products by different kinetic mechanisms of cytochrome P450 enzymes, *Biochem.* **33**(10), 2927-37.
- Giles, P.M.Jr. (1999), IUPAC Recommendations 1999, Revised Section F: Natural Products and Related Compounds, *Pure Appl. Chem.* **71**, 587-643.
- Godjevargova, T., Aleksieva, Z., Ivanova, D. (2000), Cell immobilization of *Trichosporon cutaneum* strain with phenol degradation ability on new modified polymer carriers, *Proc. Biochem.* **35**, 699-704.
- Gotoh, O. (1992), Substrate Recognition Sites in Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Proteins Inferred from Comparative Analyses of Amino Acid and Coding Nucleotide Sequences, *J. Biol. Chem.* **267** (1), 83-90.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F. (2002), Plant defense and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress, *Plant physio. Biochem.* **40**(6-8), 471-478.
- Griffin, D.H. (1994), *Fungal Physiology*, 2. Auflage, Wiley, New-York.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N. (1999), The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour Fragr. J.* **14**, 322-332.

- Grivel, F., Larroche, C., Gros, J.B. (1999), Determination of the reaction yield during biotransformation of volatile and chemically unstable compounds β -Ionone by *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Progr.* **15**, 697-705.
- Haleva-Toledo, E., Naim, M., Zehavi, U., Rouseff, R.L. (1999), Formation of α -Terpineol in Citrus Juices, Model and Buffer Solutions, *J. Food Sci.* **64**(5), 838-841.
- Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F., Croteau, R. (2000), Functional Expression of regiospecific Cytochrom P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **379**(1), 127-136.
- Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J.A.M. (1994), Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents, *TIBTECH* **12**, 409-415.
- Hellmuth, K., Korz, D. J., Sanders, E. A., Deckwer, W.-D. (1994), Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J. Biotechnol.* **32**(3), 289-98.
- Hensgartner, U., Bernhard, K., Meyer, K. (1992), Synthesis, Isolation, and NMR-Spectroscopic Characterization of Fourteen (Z)-Isomers of Lycopene and of Some Acetylenic Didehydro- and Tetradehydrolycopenes, *Helv. Chim. Acta* **75**, 1848-1865.
- Herbers, R., Starke, H. (2001), *Naturstoffe*, Aulis-Verlag, Köln.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2002) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Heyen, U., Harder, J. (2000), Geranic Acid Formation, an Initial Reaction of Anaerobic Monoterpene Metabolism in Denitrifying *Alcaligenes defragrans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(7), 3004-3009.
- Hocknull, M.D., Lilly, M.D. (1987), The Δ^1 -dehydrogenation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex* in organic-aqueous two-liquid phase environments. In: *Biocatalysis in Organic Media*, ed. Laane, C., J. Tramper, J., Lilly, M.D.. Elsevier, Amsterdam, 393-398.
- Holland, H.L. (1992), *Organic Synthesis with oxidative enzymes*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Hou, C.T. (2000), Biotransformation of unsaturated fatty acids to industrial products, In: *Adv. Appl. Microbiol.* **47**: 201-220.
- Huang, R., Christenson, P., Labuda, I. M. (2001), Production of natural flavours by laccase catalysis, *Patent EP 1 083 233*.
- Ichinose, H., Wariishi, H., Tanaka, H. (2002), Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 658-664.
- Inoue, A., Hoprikoshi, K. (1991), Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter LogP., *J. Ferm. Bioeng.* **71**, 194-196.
- Irvine, T.S. (1990), Laboratory fermenters, in: McNeil, B., Harvey, L.M. ed.: *Fermentation: A practical approach*, Oxford University press.
- Isken, S., Santos, P. M. A. C., de Bont, J. A. M., (1997), Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**(5), 642-647.
- Janssens, L., de Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. (1992), Production of Flavours by microorganisms, *Proc. Biochem.*, **27**, 195-215.
- Jelen, H.H., Mirocha, C.J., Wasowicz, E., Kaminski, E. (1995), Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichotecenes, *Appl. Environm. Microbiol.*, 3815 – 3820.

Jensen, K.A., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K.E. (1996), Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3679-3686.

Jensen, H. P., Sharpless, K. B. (1975), Selenium dioxide oxidation of d-limonene, *J. Org. Chem.* **40**(2), 264-5.

Jennings, W., Shibamoto, T. (1980), Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Acad. Press, New York.

Johnson, M. A., Croteau, R., (1984), Biosynthesis of ascaridole: iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**(1), 254-66.

Karp, F., Mihaliak, C.A., Harris, J.L., Croteau, R. (1990), Monoterpene Biosynthesis: Specificity of the Hydroxylation of (-)-Limonene by Enzyme Preparations from Peppermint (*Mentha piperita*), Spearmint (*Mentha spicata*), and Perilla (*Perilla frutescens*) Leaves, *Arch. Biochem. Biophys.* **276** (1), 219-226.

Kieslich, K. (1976), Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds, Thieme Verlag, Stuttgart.

Kieslich, K., Abraham, W.-R., Stumpf, B., Thede, B., Washausen, P. (1986), Transformation of terpenoids, in: *Progress in Essential Oil Research* (Brunke, H.J., Ed.) 367-394, Berlin: Walter de Gruyter.

King, A., Dickinson, R. (2000), Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*, *Yeast* **16**, 499-506.

Kodjayan, N., Berdague, J.-L. (1996), A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds, Edition du Laboratoire Flaveur.

Koskinen, A.M.P., Klibanov, A.M. (1992), Enzymatic reactions in organic media, Blackie Academic & Professional, S.10-13.

Kovats-Indices aus Institutsliste des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hannover.

Krasnobajew, V. (1984), Terpenoids, in: *Biotechnology 1st Edn.*, Vol. 6a *Biotransformations* (Rehm, H.-J., Reed, G., Eds.), 97-125. Weinheim: Verlag Chemie.

Krings, U., Kelch, M., Berger, R.G. (1993), Adsorbents for the recovery of aroma compounds in fermentation processes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **58**, 293-299.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987), Rule for optimization of biocatalysis in organic-solvents, *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87.

Lamare, V., Furstoss, R. (1990), Bioconversion of Sesquiterpenes, *Tetrahedron* **46**(12), 4109-4132.

Lang, E., Nerud, F., Novotna, E., Zadrazil, F., Martens, R. (1996), Production of lignolytic exoenzymes and C-14-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose substrate, *Folia Microbiol.*, **41** (6), 489-493.

Langhoff, S. (2002), Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen, Dissertation, Universität Hannover.

Lewis, D.F.V. (1996), Cytochrome P450: Structure, Function and Mechanism, Taylor&Francis, London.

Luckner, M. (1990), Secondary metabolism in plants and animals, Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.

Lupien, S., Karp, F., Wildung, M., Croteau, R. (1999), Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression

- of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase, *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 181-192.
- Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schmidt-Dannert, C., Wohlleben, W., Hauer, B., Schmid, R.D. (1998), Stereo- and Regioselective hydroxylation of α -Ionone by *Streptomyces* strains, *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 3878-3881.
- MacLeod, W.D., Buigues, N. (1964), Nootkatone, a New Grapefruit Flavour Constituent, *J. Food Sci.* **29**, 565-568.
- Manitto, P. (1980), Biosynthesis of natural products, Ellis Horwood Ltd., Chichester (UK).
- Mang, H. (2002), Synthese von chiralen Acetogeninbausteinen unter Verwendung enzym-initiiertes Kaskadenreaktionen mit Hilfe bakterieller Epoxidhydrolasen, Karl-Franzens-Universität, Graz, Österreich.
- Maupin, G.O., Dolan, M.C., Karchesy, J., Panella, N.A. (2002), Compounds for Pest Control and Methods for their Use, *Patent WO 0250053*, 27.06.2002.
- McClements, D.J. (1999), Food Emulsions: Principle, Practice, and Techniques, CRC Press.
- McLafferty, F.W., Turecek, F. (1995), Interpretation von Massenspektren, Spektrum Verlag.
- Meier, H.J., Ullrich, U. (1995), Grundlagen der organischen Chemie, Gustav Fischer Verlag.
- Meylan, W.M., Howard, P.H. (1995), Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* **84**, 83-92.
- Mihaliak, C.A., Karp, F., Croteau, R. (1993), Cytochrome P-450 Terpene Hydroxylases, In: Dey, P.M., Harbourne, J.B. (ed.) *Enzymes of Secondary Metabolism, Methods plant biochem.*, **9**, 261-279.
- Miyazawa, M., Nankai, H., Kameoka, H. (1996), Biotransformation of acyclic terpenoid (2E,6E)-farnesol by plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*, *Phytochem.* **43**, 105-109.
- Miyazawa, M., Honjo, Y., Kameoka, H. (1997), Biotransformation of the Sesquiterpenoid β -Selinene using the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata* as a biocatalyst, *Phytochem.* **44**(3), 433-436.
- Miyazawa, M., Huruno, H., Kameoka, H. (1991), Biotransformation of (+)-pulegone to (-)-1R-8-hydroxy-4-p-menthen-3-one by *Botrytis allii*, *Chem. Express*, **6**(7), 479-82.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. (1998), Bacterial role in flavour development, *Meat sci.*, **49**: 111-123.
- Muller, B., Dean, C., Schmidt, C., Kuhn, J.-C. (1998), Process for the preparation of nootkatone, *Patent US 5 847 226*, 8.12.1998.
- Myers, C.E. (1997), Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes as cancer therapy, *Patent US 5 602 184*, 2.11.1997.
- Näf, R., Velluz, A., Meyer, A.P. (1996), Volatile Constituents of Blood and Blond Orange Juices: A Comparison, *J. Essent. Oil Res.* **8**: 587-595.
- Nelson, D.R., Strobel, H.W. (1988), On the Membrane Topology of Vertebrate Cytochrome P-450 Proteins, *J. Biol. Chem.* **263**(13), 6038-6050.
- Noma, Y., Hashimoto, T., Murakami, C., Furusawa, M., Asakawa, Y. (2001), Microbial Transformation of Valencen, Nootkatol and Nootkaton, Lecture #23, *ISEO 2001*, Wroclaw, Poland.
- Noma, Y., Yamasaki, S., Asakawa, Y. (1992), Biotransformation of limonene and related compounds by *aspergillus cellulosa*, *Phytochem.* **31**(8), 2725-2727.

Nuhn, P. (1997), *Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, 3. Aufl., Hirzel, Stuttgart.

Oda, S., Kato, A., Matsudomi, N., Ohta, H. (1995), Production of (S)-citronellic acid and (R)-citronellol with an interface bioreactor, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 83-87.

Oda, S., Ohta, H. (1997), Double Coupling of Acetyl Coenzyme A Production and Microbial Esterification with Alcohol Acetyltransferase in an Interface Bioreactor, *J. Ferment. Bioeng.* **83**(5), 423-428.

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. (1994), *Sence and Fragrances*, Springer-Verlag, Berlin.

Okuda, Mitsuyoshi (1994), New Microorganism and preparation of Nootkaton using the microorganism *Rhodococcus*, *Patent JP 6303967*, 01.11.1994.

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

Onken, J. (1998), *Biotechnologie lipophiler Substrate in wäßrigen Systemen: Terpenttransformation durch Basidiomyceten als Modell*, Dissertation an der Universität Hannover.

Oriel, P.J., Savithiry, S., Chang, H.C.(1997), Process for the preparation of monoterpenes using bacterium containing recombinant DNA, *Patent US 5 688 673*, Nov. 1997.

Osborne, S.J., Leaver, J., Turner, M.K. (1992), Membrane concentrations of primary alcohols which inhibit progesterone 11 α -hydroxylase in *Rhizopus nigricans*. In *Biocatalysis in non-conventional media*, ed. Tramper, J., Vermue, M.H., Beefting, H.H., von Stockar, U. Elsevier, London. 31-36.

Park, O.-J., Holland, H.L., Khan, J.A., Vulfsonj, E.N. (2000), Production of flavour ketones in aqueous-organic two-phase systems by using free and microencapsulated fungal spores as biocatalysts, *Enz. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 235-242.

Park, J.H., Shin, H.K. (1991), High density cell cultures sp. KCTC 8405P for the production of γ -linoleic acid in fed-batch culture, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**(2), 126-129.

Poppe, L., Novák, L. (1992), *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Wiley-VCH, Weinheim.

Poulos, T.L., Howard, A. J. (1987), Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam., *Biochemistry* **26**(25), 8165-74.

Reil, G., Berger, R.G. (1996), Genesis of aroma compounds in phototrophic cell culture of grapefruit, *C. paradise* cv. White Marsh, *Proc. 8th Weurman Flavour Symposium*, Reading (Mottram, D. S., Taylor, A. J. Eds.), pp. 97-104. Cambridge: Royal Soc. Chem.

Reil, G. (1993), *Identifikation von Schlüsselaromen für die Synthese flüchtiger Naturstoffe durch Pflanzenzellkulturen*, Dissertation, Technische Universität München.

Ruzicka, L. (1953), Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds, *Experientia* **9**, 357-67.

Sime, J.T., (1998), Biotransformations Applied to Plant Chemicals: A Natural Combination, *The Natural Choice*, *Chemistry in Britain*, May, 26-28.

Royals, E.E., Horne, S.E. Jr. (1951), Conversion of d-limonene to l-carvone, *J. Am. Chemi. Soc.*, **73**, 5856-7.

Rouseff, R. (2002), Flavor Database, University of Florida, Citrus Research and Education Center, http://www.lal.ufl.edu/rouseff/Website2002/Subpages/database_g_Frameset.htm.

- Ruiz, J.C., de la Rubia, T., Perez, J., Lopez, J.M. (2002), Effect of olive oil mill wastewater on extracellular lignolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavio-alba*, *FEMS Microbiol. Lett.* **212**(1), 41-45.
- Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W. (1998), Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants, Institut für Lebensmittelchemie der TUM München.
- Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Pioch, D., Roussos, S. (1997), Coconut-like aroma production by *Trichoderma hazarianum* in solid state fermentation, In: Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzalez, G. (Ed.): *Advances in Solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., 379-392.
- Savithiry, N., Cheong, T.K., Oriol, P. (1997), Production of α -Terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 213-220.
- Schäfer, S., Kaspera, R., Krings, U., Schrader, J., Sell, D., Berger, R. G. (2003), Sensorgestützte Biokonversion zur Gewinnung natürlicher terpenoider Aromastoffe, *Lebensmittelchemie*, **57**(1), 15.
- Schäfer, S., Schrader, J., Sell, D. (2003), Faseroptische Sensoren zum Aktivitätsmonitoring höherer Pilze bei der Terpenbiotransformation, *Lebensmittelchemie* **57**(5), 121.
- Schalk, M., Croteau, R. (2000), A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**(22), 11948-11953.
- Schlegel, H.G., Zaborosch, C. (1992), Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Schrader, J. & Berger, R.G. (2001), Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In : *Biotechnology* Vol. 10 : Special Processes, Rehm, H.J. (ed.), Wiley-VCH, Weinheim, Chapter 13, 374-422.
- Schüler, M. (2002) Enzymatische Darstellung isoprenoider Acyloine, Diplomarbeit, Inst. für Lebensmittelchemie, Universität Hannover.
- Sime, J.T., Samuel, P., Cheetham, J., Gradley, M.L., Banister, N.E. (2000), Use of sesquiterpenes for inhibiting oxidative enzymes, *Patent US* 6,054,490.
- Sime, T.J. (1998), Biotransformations applied to plant Chemicals: A natural combination, The natural choice, *Chemistry in Britain*, May, 20-28.
- Singer, A.C., Gilbert, E.S., Luepromchai (2000), Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 838-843.
- Sinha, J., Dey, P.K., Panda, T. (2000), Aquous two-phase: the system of choice for extractive fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol* **54**, 476-486.
- Speelmans, G., Bijlsma, A., Eggink, G. (1998), Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 538-544.
- Spicer, J. A., Brimble, M.A., Rowan, D.D. (1993), Oxidation of α -farnesene, *Aust. J. Chem.*, **46**, 1929-1939.
- Sprecher, E., Hanssen, H.-P. (1982), Influence of Strain Specificity and Culture Conditions on Terpene Production by Fungi, *Planta med.* **44**, 41-43.
- Steinbüchel, A., Priefert, H., Rabenhorst (1997), Synthesenzyme für die Herstellung von Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd, Ferulasäure, Vanillin und Vanillinsäure und deren Verwendung, *Patent EP* 0 845532.

Steliopoulos, P., Mosandl, A. (2001), Electron impact-induced fragmentation of the sesquiterpene germacrene D, *Eur. J. Mass Spectrom.* **7**, 503-508.

Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1998), Strassburger: Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Jena.

Sunesson, A.-L., Nilsson, C.-A., Carlson, R., Blomquist, G., Andersson, B. (1997), Production of volatile metabolites from *streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum board and tryptone glucose extract agar – influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels, *Ann. Occup. Hyg.*, **41**(4), 393-413.

Tan, Q., Day, D.F., Chadwallader (1998), Bioconversion of R-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202), *Proc. Biochem.* **33**, 29-37.

Tan, Q., Day, D.F. (1998b), Organic co-solvent effects on the bioconversion of R-(+)-limonene to R-(+)- α -terpineol, *Proc. Biochem.* **33**, 29-37.

Tateba, H., Morita, K., Tada, M. (1992) Photochemical reaction of nootkatone under various conditions, *J. Chem. Res., Syn.* **5**, 140-141.

Tay, S.T.-L., Hemond, F.H., Krumholz, L.R., Cavanaugh, C.M., Polz, M.F. (2001), Population Dynamics of two toluene degrading bacterial species in a contaminated stream, *Microbial Ecol.*, DOI:10.1007/s002480000089.

Tecelao, C.S.R., van Keulen, F., da Fonseca, N.M.R. (2001), Development of a reaction system for the selective conversion *trans*-(-)-carveol to (-)-carvone with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **11**(4-6), 719-724,

Teunissen, M. J., De Bont, J. A. M. (1995), Will terpenes be of any significance in future biotechnology? Colloques - Institut National de la Recherche Agronomique, **75**(Bioflavour 95), 329-337.

Tius, M. A., Kerr, M. A. (1988), A convenient synthesis of (R)-(+)-perillaldehyde, *Synth. Comm.* **18**(16-17), 1905-11.

Trudgill, P.W. (1994), Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes, in: *Biochemistry of Microbial Degradation* (Ratledge, C., Ed.), 33-61. Kluwer Acad. Publ. London.

Van den Brink, H.M., van Gorcom, R.F.M., van der Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. (1998), Review: Cytochrome P450 Enzyme Systems in fungi, *Fungal Gen. Biol.* **23**, 1-17.

Van der Werf, M., van der Ven, C., Barbirato, F., Eppink, M.H.M., de Bont, J.A.M., van Berkel, W.J.H. (1999), Stereoselective Carveol Dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *J. Biol. Chem.* **274**(37), 26296-26304.

Van der Werf, M., Swarts, H.J., de Bont, J.A.M. (1999), *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2092-2102.

Van der Werf, M.J., de Bont, J.A.M., Leak, D.J. (1997), Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes, In: Scheper, T. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. **55**, 148-175.

Van der Werf, M.J., Overkamp, K.M., de Bont, J.A.M. (1998), Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 Belongs to novel class of epoxide hydrolases, *J. Bacteriol.* 5052-5057.

Van der Werf, M.J., Boot, A.M. (2000), Metabolism of carveol and dihydrocarveol in *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *Microbiol.*, **146**, 1129-1141.

Van Dyk, M.S., van Rendsburg, E., Rensburg, I.P.B., Moleleki, N. (1998), Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **5**, 149-154.

- Van Dyk, M.S., van Rendsburg, E., Moleleki, N. (1998a), Hydroxylation of (+)-limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by *Hormonema* sp., *Biotechnol. Lett.* **20**, 431-436.
- Vanek, T., Valterova, I., Vankova, R., Vaisar, T. (1999), Biotransformation of (-)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells, *Biotechnol. Lett.* **21**(7), 625-628.
- Van Keulen, F., Correia, C.N., da Fonseca, M.M.R. (1998), Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **5**, 295-299.
- Van Rendsburg, E. Moleleki, N., van der Walt, J.P., Botes, P.J., van Dyk, M.S. (1997), Biotransformation of (+)-limonene and (-)-piperitone by yeasts and yeast-like fungi, *Biotechnol. Lett.*, **19**(8), 779-782.
- Vermue, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R., Tramper, J. (1993), Toxicity of homologous series of organic solvents for gram-positive bacteria *Athrobacter* and *Nocardia* sp. and gram-negative *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp., *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 747-758.
- Verordnung (EG) Nr. 50/2000 der Kommission vom 10. Jan. 2000 über die Etikettierung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten, die genetisch veränderte oder aus genetisch veränderten Organismen hergestellte Zusatzstoffe und Aromen enthalten, *EU Abl. L* 6/15.
- Vidya, C.M., Agrawal, R. (2003), Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 421-422.
- 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**(12), 1113-1117.
- Wackett, L.P., Gibson, D.T. (1982), Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*, *Biochem. J.* **205**, 117-122.
- Westgate, S., Vaidya, A.M., Bell, G., Halling, P.J. (1998), High specific activity of whole cells in an aqueous-organic two-phase membrane bioreactor, *Enzym. Microbiol. Technol.* **22**, 575-577.
- Willershausen, H., Graf, H. (1996), Mikrobieller Abbau von Lignin, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **1**(47), 24-28.
- Wise, M.L., Croteau, R. (1999), Monoterpene Biosynthesis, aus: Cane, D.E, ed., *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Pergamon.
- Wolken, W.A.M., Tramper, J., van der Werf, M.J. (2002), Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *penicillium digitatum*, *Biotechnol. Bioeng.* **80**(6), 685-690.
- Wüst, M., Croteau, R.B. (2002), Hydroxylation of specifically deuterated limonene enantiomers by cytochrome P450 Limonene-6-hydroxylase reveals the mechanism of multiple product formation, *Biochem.* **41**, 1820-1827.
- Zahringer, H., Thevelein, M.J., Nwaka, S. (2000), Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variation of PKA effect during stress and growth, *Mol. Microbiol.*, **35**(2), 397-406.
- Ziegler, E. (1998), *Flavourings*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Ziegler, F.E., Reid, G.R., Studt, W.L., Wender, P.A. (1977), Stereochemistry of Dialkylcuprate Additions to Cyclopropylacrylic Esters, An Application to the Synthesis of (\pm)-Eremophilone, *J. Org. Chem.* **42** (11), 1991-2001.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R.G. (2003), A peroxidase from *lepista irina* cleaves β , β -carotene to flavor compounds, *Biol. Chem.* **384**(7), 1049-1056.
- Zweig, S. (1923), *Magellan: Der Mann und seine Tat*, 19. Aufl. Gustav Fischer Verlag.

7 Anhang

Tabelle 7-1: R_f-Werte und Signalempfindlichkeit der mit Dansylhydrazin derivatisierten Terpenoide.

Substanz	R _f	Signalintensität / Flächeneinheiten
S-Carvon	0,89	51
R-Carvon	0,86	60
Perillaaldehyd	0,56	59
Nootkaton	0,66	56
Farnesal	0,65	51
Myrtenal	0,61	72
Verbenon	0,47	~ 60 (Interferenz)
Citral (Neral/Geranal)	0,71 / 0,59	60 / 54
Citronellal	0,71	63

Tabelle 7-2: Transient gebildetes Carvon/Isopiperitenon im Screeningverfahren der Limonenbiotransformation, bestimmt mittels Dünnschichtchromatographie (- = n.n. ;+ = nachweisbar, aber nicht bestimmbar , x = Gehalt außerhalb linearen Bereiches).

Stamm	Transformationstag, Konzentration in mg L ⁻¹					
	1	2	4	7	10	14
Blindwert	0,1	0,6	1,0	0,7	0,6	0,2
<i>Pleurotus sapidus</i>	-	0,8	6,3	x	x	x
<i>Chaetomium globosum</i>	-	0,1	0,2	0,4	0,1	-
<i>Grifola frondosa</i>	-	0,1	0,1	0,2	0,3	-
<i>Phan. chrysosporium</i>	-	-	+	-	-	0,3
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	-	-	+	-	0,8	-
<i>Pleurotus lampas</i>	-	-	-	-	-	0,5
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	0,5	1,3
<i>Penicillium italicum</i>	-	-	0,5	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	0,5	-	0,5	-
<i>Penicillium digitatum</i>	-	-	-	-	-	1,1
<i>Cunningh. echinulata</i>	+	1,4	1,9	1	0,3	-
<i>Aspergillus niger DSM 737</i>	-	-	0,7	1,2	0,3	0,2
<i>Aspergillus niger DSM 821</i>	-	4	-	-	0,2	0,3
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,9	2,2	3,1	5,5	6,1	4,0
<i>Armillariella melea</i>	1,8	2,0	2,3	2,2	1,7	1,4
<i>Rhizoctonia. carotae</i>	-	-	0,9	0,6	-	-
<i>Lepista nuda</i>	-	-	0,5	0,3	0,7	0,2
<i>Glomerella butleri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium cochloides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	+	5,4	+	6,9
<i>Cunninghamella elegans</i>	0,9	1,2	1,2	+	1,9	2,2
<i>Pleurotus euosmus</i>	-	1,4	3,3	3,1	2,8	3,2
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	+	+	1,0	-
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	-	1,0	0,8	5,3	7,2	9,2
<i>Ganoderma applanatum</i>	-	-	-	-	-	1,0
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia angusta</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces arenae</i>	-	-	-	-	-	-

Tabelle 7-3: Identifizierung von Transformationsprodukten der Limonentransformation über Kovats-Indices, Massenspektroskopie und authentische Standardverbindungen.

Nr.	Verbindung	KI (CW20M)	KI (Lit.)	Identifizierung
3	Limonen	1190	1206 ⁴	Std., MS
19	<i>cis</i> -Limonen-1,2-epoxid	1430	1437 ³	Std., MS
19	<i>trans</i> -Limonen-1,2-epoxid	1444	1450 ¹	Std., MS
22	Sabinenhydrat	1541	-	MS ⁵
17	Linalool	1548	1546 ¹	Std., MS
21	<i>trans</i> -Dihydrocarvon	1588	1589 ³	MS, KI
11	4-Terpineol	1591	1594 ³	MS ⁵
21	<i>cis</i> -Dihydrocarvon	1605	1600 ²	Std., MS, KI
14	<i>trans</i> -2,8-Menthadien-1-ol	1620	1622 ⁴	Std., MS, KI
14	<i>cis</i> -2,8-Menthadien-1-ol	1664	1673 ⁴	MS, KI
12	4-Hydroxy -mentha-1,8-dien	1678	-	MS (siehe Abb. 7-1)
9	α -Terpineol	1689	1685 ⁴	Std., MS
16	Piperiton	1701	1697 ⁴	Std., MS ⁵
6	Carvon	1710	1715 ⁴	Std., MS
20	Neodihydrocarveol	1719	-	Std., MS ⁶
8	Isopiperitenol	1741	1745 ⁸	MS ⁶
25	Perillaaldehyd	1758	1755 ³	Std., MS
28	Isodihydrocarveol	1775	-	Std., MS ⁶
13	p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1788	-	MS ⁷
28	Neoisodihydrocarveol	1797	-	Std., MS ⁶
15	Isopiperitenon	1812	-	MS ⁸
4	<i>trans</i> -Carveol	1825	1839 ³	Std., MS
5	<i>cis</i> -Carveol	1855	1858 ³	Std. MS
13	<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1879	-	MS ⁷
28	Neodihydrocarveol	1918	-	MS ⁶
10	p-Mentha-1,8(10)-dien-9-ol	1982	1982 ³	MS, KI
7	Perillaalkohol	1988	1994 ⁸	Std., MS

- Kovats-Indices wurden entnommen aus : ¹ Kondjoyan und Berdague (1996), ² Jennings und Shibamoto (1980), ³ LCI-Referenzliste, ⁴ Davis, N.W. (1990), ⁸ Rouseff (2002).
- Spektrenvergleich : MS⁵: Adams (1995), MS⁶: van Dyk *et al.* (1998), MS⁷: Tius und Kerr (1988), MS⁸: van Rendsburg *et al.*(1997).

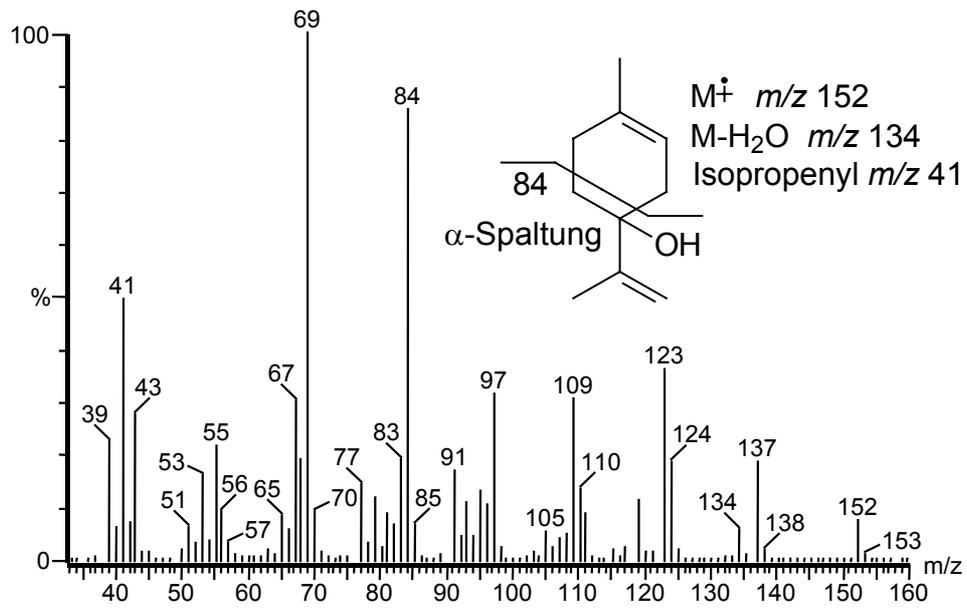


Abbildung 7-1: Massenspektrum des 4-Hydroxy-mentha-1,8-dien.

Tabelle 7-4: Transformation von *R*-(+)-Limonen mit ausgewählten Kulturen (Gehalte in mg L⁻¹).

Verbindung	<i>Pleurotus lampas</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Pl.sajor-caju</i>	<i>Pleurotus euosmus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Armilaria mellea</i>	<i>Gan.ap-planatum</i>	<i>Glomerella butleri</i>	<i>Grifola frondosa</i>	<i>Phaneroch. cryospor.</i>	<i>Pen. citrinum</i>	<i>Pen. digitatum</i>	<i>Pen. italicum</i>
<i>cis</i> -Limonen-1,2-epoxid	-	0,5	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Limonen-1,2-epoxid	-	1,1	-	0,2	0,3	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
8,9-epoxy-p-menthen	-	0,5	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
Linalool	-	1,6	1,8	1,5	0,9	0,4	1,0	0,6	3,0	1,5	0,4	1,2	1,3
Dihydrocarvon (trans)	-	0,1	-	0,9	0,6	0,1	-	-	-	-	-	-	-
4-Terpineol	0,2	-	0,2	-	-	-	0,1	0,1	0,6	0,7	0,3	0,2	0,2
<i>cis</i> -Dihydrocarvon	-	-	-	0,4	0,1	0,1	0,1	-	0,2	-	-	0,1	0,1
<i>trans</i> -2,8-Menthadien-1-ol	0,9	8,0	0,3	1,8	1,2	0,3	1,5	1,0	0,9	0,2	0,1	-	0,5
<i>cis</i> -2,8-Menthadien-1-ol	0,4	5,7	0,3	1,5	0,9	0,1	1,0	1,2	0,7	0,1	0,1	-	0,4
4-Hydroxy -mentha-1,8-dien	0,2	3,1	0,2	0,9	0,4	-	1,0	0,7	0,4	0,1	-	0,4	0,1
α -Terpineol	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	20,9	0,1	-
Piperiton	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvon	0,5	6,5	0,1	1,9	1,2	0,8	0,2	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Neodihydrocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopiperitenol	1,3	2,1	0,6	1,5	0,6	1,0	2,0	4,1	1,9	0,4	0,1	0,9	0,9
Perillaaldehyd	0,9	0,4	-	0,5	0,2	0,1	0,3	0,1	-	1,1	-	-	-
(1R,2R,4S)-(-)-Isodihydrocarveol	-	0,1	-	0,3	-	-	0,1	-	-	-	-	0,4	0,4
p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	0,4	-	0,1	0,2	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
(1R,2S,4)-(-)-Neoisodihydrocarveol	-	-	-	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	0,2
Isopiperitenon	0,3	1,1	2,2	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	-	-	0,2	0,3	0,3
<i>trans</i> -Carveol	1,1	8,6	0,5	2,0	1,0	0,7	1,2	0,5	1,8	0,3	0,4	0,3	0,3
<i>cis</i> -Carveol	1,1	6,2	2,8	2,3	1,2	0,2	2,2	1,2	2,4	0,3	2,8	1,2	1,2
<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	0,5	-	0,1	0,3	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
Neodihydrocarveol	0,4	1,2	-	0,4	2,7	0,4	0,4	0,2	0,1	1,0	-	0,3	0,2
p-Mentha-1,8(10)-dien-9-ol	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,3	0,1
Perillaalkohol	0,2	0,2	0,3	0,4	-	-	0,3	15,5	0,1	8,7	-	2,8	2,7
pH	5,23	5,58	5,12	5,65	6,36	5,91	4,93	4,31	5,91	3,82	5,48	5,02	5,17
TRM [g L ⁻¹]	6,4	8,7	15,1	6,2	7,2	12,9	11,4	16,3	7,1	5,2	8,2	10,5	7,2
Glc [%]	1,5	2,5	1,5	1	1	2	1,5	0	2	2	0	1	0

Tabelle 7-4: Fortsetzung.

Verbindung	Ch. globos.	Ch. cochloid.	Lepista. nuda	Fusar. proliferat.	Cun. echinulata	A. niger DSM 737	A. niger DSM 821	Botrytis cinerea	Rhizocton. solani	Rhizocton. carotae	Than. cucumeris	Isolat Zitrone	Blindwert
<i>cis</i> -Limonen-1,2-epoxid	0,4	0,1	-	-	2,7	-	-	-	0,9	-	2,3	-	-
<i>trans</i> -Limonen-1,2-epoxid	0,1	0,2	0,1	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
8,9-epoxy-p-menthen	0,2	-	-	0,5	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
Linalool	3,4	0,9	1,3	1,9	-	1,4	-	-	-	2,0	0,4	-	0,1
Dihydrocarvon (trans)	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	1,1	-	-
4-Terpineol	-	-	-	-	-	2,3	0,4	0,1	-	1,1	-	0,1	-
<i>cis</i> -Dihydrocarvon	-	0,2	-	0,6	0,8	0,1	-	-	1,7	-	1,6	-	-
<i>trans</i> -2,8-Menthadien-1-ol	0,2	2,8	0,2	4,6	0,5	0,3	0,2	-	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
<i>cis</i> -2,8-Menthadien-1-ol	0,2	0,4	0,2	1,2	-	-	0,2	1,6	0,1	0,1	0,1	-	1,0
4-Hydroxy -mentha-1,8-dien	0,2	1,0	-	0,3	1,9	0,1	1,4	-	0,9	0,1	2,3	-	-
α -Terpineol	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	0,1	-	14,0	-
Piperiton	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvon	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	1,6	0,1	0,2
Neodihydrocarveol	-	-	-	0,3	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
Isopiperitenol	1,2	13,3	0,1	3,4	1,9	0,1	0,9	6,1	3,0	0,1	-	-	-
Perillaaldehyd	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,6	0,2	-	0,1	-	-	-
(1R,2R,4S)-(-)-Isodihydrocarveol	-	0,1	-	0,2	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-
p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(1R,2S,4)-(-)-Neoisodihydrocarveol	-	-	-	1,0	0,6	-	-	-	3,4	-	-	-	-
Isopiperitenon	0,4	1,2	0,2	1,7	3,0	0,3	0,3	2,3	3,3	0,8	3,0	-	0,1
<i>trans</i> -Carveol	0,3	1,0	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	1,2	1,5	0,5	1,1	0,3	0,4
<i>cis</i> -Carveol	4,9	13,1	0,1	15,0	0,2	0,1	-	0,4	0,1	1,2	0,5	0,6	0,3
<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Neodihydrocarveol	0,1	1,0	0,8	-	-	1,9	1,1	1,3	-	-	1,0	-	-
p-Mentha-1,8(10)-dien-9-ol	1,8	-	-	-	-	0,4	1,2	-	-	-	-	-	-
Perillaalkohol	4,8	5,0	-	-	0,5	1,5	8,8	14,0	-	0,2	-	-	-
pH	6,52	5,97	5,15	4,79	6,86	2,46	3,94	4,86	5,23	4,98	6,71	6,79	5,32
TRM [g L ⁻¹]	9,1	11,5	10,2	9,0	11,4	8,9	10,2	4,7	11,6	8,2	12,0	13,5	0
Glc [%]	1	0	1,5	0	0	0	0	0	0,5	3	0,5	0,5	3




Abbildung 7-2: Massenspektrum von **34** und überlagerten Produkten im CI.

LCMSolution Version 2.04 Su1

01.08.2




Abbildung 7-3: Spektrum aus APCI-MS vom Diol oder Hydroperoxid der Valencenbiotransformation.

Lebenslauf

Rüdiger Kaspera

geboren am 05. Mai 1974 in Oldenburg (Oldb.)

Schulbildung

1980 – 1993

Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium (Cäcilien-
schule) in Oldenburg.

Allgemeine Hochschulreife.

Zivildienst

07/1993 – 10/1994

Mobiler Sozialer Hilfsdienst im Deutschen Paritätischen
Wohlfahrtsverband, Oldenburg.

Studium

10/1994 - 11/1998

Studium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-
Universität unter Prof. Dr. H.P. Thier, Münster.

Abschluss: 1. Staatsexamen.

Berufliche Erfahrung

07 – 09/1997

Praktikum: Labor für Qualitätssicherung, CTL Lüllmann, Bremen.

01/1999 – 01/2000

Berufsqualifizierendes Jahr zum staatlich geprüften
Lebensmittelchemiker am Chemischen Landes- und Staatliches
Veterinäruntersuchungsamt unter Dr. A. Preuß in Münster,
Westf.

Abschluss: 2. Staatsexamen.

02/2000 – 06/2000

Forschungsprojekt am Department of Food Science auf dem
Gebiet Food Biotechnology unter Prof. K. Shetty, University of
Massachusetts, USA, Isolierung und Charakterisierung von
Peroxidasen aus Keimlingen der *Vicia faba* L.

07/2000 - 02/2004

Dissertation als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Lebensmittelchemie unter Prof. Dr. Dr. R.G. Berger, Universität
Hannover.

Hannover, den 18.12.2003.

Erklärung gemäß § 6 Absatz 1, c) und b) der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

Hiermit erkläre ich, Rüdiger Kaspera, eidesstattlich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rüdiger Kaspera'. The signature is written in a cursive style with a large, sweeping initial 'R'.

Rüdiger Kaspera

Hannover, 16. Februar 2004

Publikationsliste gemäß § 6 Absatz 1, Abschnitt d) der Promotionsordnung der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

Schäfer, S., Kaspera, R., Krings, U., Schrader, J., Sell, D., Berger, R.G. (2003) Sensorgestützte Biokonversion zur Gewinnung natürlicher terpenoider Aromastoffe. *Lebensmittelchemie*, 57(1): 15.

Kaspera, R., Krings, U., Onken, J., Berger, R.G. (2003) Stereospecific allylic oxidation of limonene: A route to pure (S)-(+)-Carvone; ed. Le Quéré, J.L., Étiévant, P.X: 10th Weurman Flavour Symposium 2002, Beaune, France, Intercept STM Publishers.

Kaspera, R., Krings, U., Onken, J., Berger, R.G. (2002) Biotechnologische Gewinnung enantiomerenreiner Carvone. *Lebensmittelchemie*, 56(4):76-77.

Kaspera, R., McCue, P., Shetty, K. (2001) Partial purification of a basic guaiacol peroxidase from fava bean (*Vicia faba L.*): Characterization of enzyme stability following elicitor treatment. *Food Biotechnology*, 15: 99-111.