

**Oxidoreduktasen aus Agaricomyceten
für Lebensmittel- und Waschmittelanwendungen**

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

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Laura Isabel Friederike Lanfermann

geboren am 15.12.1986 in Hannover

2015

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

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 09.07.2015

Zusammenfassung

Oxidierende Enzyme rückten in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus biotechnologischen Interesses. Sie unterstützen den Abbau komplexer Substrate, werden in Detoxifikationsprozessen genutzt oder katalysieren Oxyfunktionalisierungen im Sekundärmetabolismus komplexer Naturstoffe. Basidiomyceten bieten ein großes Spektrum noch unerforschter Oxidoreduktasen. Die vorliegende Dissertation diente dem Nachweis und der Identifikation neuer oxidierender Aktivitäten aus Basidiomyceten für biotechnologische Applikationen.

In Oberflächenkulturen des Braunfäulepilzes *Laetiporus sulphureus* wurde in Vorarbeiten der intensiv würzig riechende Aromastoff Sotolon als Schlüsselaromakomponente identifiziert. Es wurde vermutet, dass während der Genese des Stoffes durch ein oxidierendes Enzym 4-Hydroxyisoleucin erzeugt wird. Die Aktivität ist von großem Interesse für die pharmazeutische Industrie. Die vorliegende Arbeit diente der Aufklärung des Sotolon-Biogeneseweges und dem Nachweis einer entsprechenden oxidierenden Aktivität. Zu diesem Zweck wurden ¹³C-markiertes Leucin und Isoleucin und ¹⁸O-markiertes Wasser eingesetzt. Über GC-MS Analysen wurde Isoleucin als Vorläufersubstanz des Aromastoffs und eine Oxygenaseaktivität nachgewiesen. Die Biosynthese von Sotolon erfolgte über eine Desaminierung von Isoleucin und anschließende enzymatische Hydroxylierung in aliphatischer C4-Position der Ketosäure (3-Methyl-2-oxopentansäure). Eine Bildung von 4-Hydroxyisoleucin wurde im Rahmen dieser Experimente hingegen nicht detektiert. Durch diese Arbeit wurden wertvolle neue Erkenntnisse über einen Prozess zur kalten Produktion des Aromastoffs Sotolon gewonnen. Auf Basis der Ergebnisse kann eine Isolierung der Oxygenase und Betrachtung des Substratspektrums folgen, um eine potentielle enzymatische Bildung von 4-Hydroxyisoleucin nachzuweisen.

In einem zweiten Basidiomyceten, *Ganoderma applanatum*, wurde eine β -Carotin abbauende oxidierende Aktivität untersucht. Durch Zugabe des Farbstoffes wurde die Bildung der degradierenden Aktivität gesteigert. Nach einem mehrschrittigen Aufreinigungsprozess wurde der Aktivität eine elektrophoretisch reine Proteinbande in der SDS-PAGE zugewiesen. Über Proteinsequenzierungen und anschließende Genamplifikation wurden zwei Manganperoxidase-Isoenzyme identifiziert, die eine 97.8 %ige Identität auf Aminosäureebene aufwiesen. Die Isoenzyme wurden biochemisch charakterisiert und zeigten eine für vergleichbare Enzyme noch nicht beschriebene Aktivität im Alkalischen. Ein Applikationsversuch im simulierten

Waschprozess zeigte das Potential der Enzyme, chemische Bleichmittel in herkömmlichen Waschmitteln zu ersetzen.

Die vorliegende Arbeit ermöglichte neue Einblicke in oxidierende Enzymaktivitäten aus zwei Basidiomyceten für unterschiedliche Applikationen. Zukünftige Untersuchungen sollen die Erkenntnisse zu den Enzymen vertiefen und die Perspektiven einer biotechnologischen Anwendung intensiver evaluieren.

Schlagwörter: Oxidierende Aktivität, *Laetiporus sulphureus*, Sotolon, 4-Hydroxyisoleucin, Oxygenase, *Ganoderma applanatum*, β -Carotin-Abbau, Manganperoxidase, alkalisches Wirkoptimum, Waschmittel

Abstract

Oxidising enzymes are attractive catalytic agents in biotechnological applications. They support the degradation of complex substrates and are used in detoxification processes or in the secondary metabolism of complex compounds, among other purposes. Industries are constantly searching for new possibilities, and basidiomycetes offer a wide range of still unknown oxidoreductases. The present research focused on the detection and characterisation of new oxidising activities from basidiomycetes for use in biotechnological processes.

Surface cultures of the brown-rot fungus *L. sulphureus* produced sotolon, a flavour compound imparting a strong curry-like, seasoning odour. Sotolon was assumed to arise from an enzymatic hydroxylation of L-isoleucine in the basidiomycete cultures. The postulated intermediate, 4-hydroxyisoleucine, can be used to treat diabetes and enzymes forming this compound are of outstanding interest for the pharmaceutical industry. During the present study, the genesis of sotolon in cultures of *L. sulphureus* was monitored using ^{13}C -labelled leucine and isoleucine and ^{18}O -labelled water. GC-MS analyses revealed an oxygenase activity to be part of the biosynthesis pathway, and isoleucine was finally proven to be the precursor of the flavour compound. However, 4-hydroxyisoleucine was not detected during these experiments. In cultures of *L. sulphureus* isoleucine was deaminated and the corresponding keto acid (3-methyl-2-oxopentanoic acid) was hydroxylated at the aliphatic C4-position by an oxygenase. These results provided evidence for a new, cold formation pathway of the flavour compound sotolon. They can lead to further studies on the substrate spectrum of the oxygenase for the potential formation of 4-hydroxyisoleucine.

In a second part of the study, a β -carotene degrading enzyme activity of the white-rot fungus *G. applanatum* was investigated. Supplementing β -carotene to media induced the degradation activity of the cultures. A multi-step purification strategy was applied to produce a single protein band in the SDS-PAGE. Protein sequencing *via* LC-MS and gene amplification experiments identified two manganese peroxidase isoenzymes with 97.8 % identity on amino acid level. The isoenzymes were biochemically characterised and showed a β -carotene degrading activity in the alkaline range which was not described for similar enzymes until now. Simulated washing experiments proved the applicability of the isoenzymes under washing conditions. The enzymes may replace common brightening agents in detergent formulations.

The present research delivered insight into new oxidising enzyme activities from two basidiomycetes for different biotechnological applications. Future experiments shall improve

our knowledge on these enzymes and evaluate more intensely the perspectives of their biotechnological applicability.

Key words: oxidising activity, *Laetiporus sulphureus*, sotolon, 4-hydroxyisoleucine, oxygenase, *Ganoderma applanatum*, β -carotene degradation, manganese peroxidase, alkaline activity, detergent

Danksagung

Prof. Dr. Dr. Berger gab mir die Möglichkeit, unter angenehmen Arbeitsbedingungen am Institut für Lebensmittelchemie diese interessante und vielseitige Aufgabenstellung zu bearbeiten. Stets unterstützte er meine Arbeit durch seine Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung. Hierfür möchte ich ihm sehr herzlich danken.

Herrn PD Dr. Krings und Frau Dr. Linke danke ich für die immer offene Tür und die intensive Betreuung meiner Arbeit. Stets standen sie mir mit Denkanstößen und Tipps, konstruktiver Kritik und motivierenden Worten zur Seite. Insbesondere der fachliche Rat von Herrn Krings zur LC- und GC-MS und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen rund um das Thema Carotinabbau mit Frau Linke waren mir eine große Hilfe. Vielen Dank!

Frau Prof. Dr. Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. Dr. Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu führen.

Der Firma Nestlé und der Firma Henkel danke ich für die interessanten Forschungsthemen und die Unterstützung der Projekte.

Ein ausdrücklicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie für die gemeinsame Zeit. Die Hilfsbereitschaft im Labor, die wissenschaftlichen Diskussionen im Büro und auch oft ein offenes Ohr für Probleme haben mir weitergeholfen. Ich freue mich, dass einige unter ihnen zu Freunden geworden sind.

Des Weiteren möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken: Meine Eltern Fanny und Theo Lanfermann, meine Großeltern Rita und Alwin Bergmann, meine Geschwister Elena und Konstantin Lanfermann, ganz besonders mein Mann Jan Hendrik Lanfermann und alle weitere Verwandten und Freunde haben mich mit viel Liebe stets unterstützt und ermuntert, meinen wissenschaftlichen Weg zu gehen. Ohne ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihren moralischen und emotionalen Beistand wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vorbemerkung & Veröffentlichungen

Diese Dissertation basiert auf folgenden Schriften, die in *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

Lanfermann, I., Krings, U., Schopp, S., Berger, R. G., (2014). *Isotope labelling experiments on the formation pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from L-isoleucine in cultures of Laetiporus sulphureus*. Flavour and Fragrance Journal, 29 (4), pp. 233-239.

Lanfermann, I., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G., (2015). *Manganese Peroxidases from Ganoderma applanatum Degrade β -Carotene Under Alkaline Conditions*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 174 (8): p. 3800-3812.

Die folgenden Veröffentlichungen und Vorträge sind im Zeitraum der Doktorarbeit erarbeitet worden, jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift:

Veröffentlichung

Krings, U., Lanfermann, I., Schopp, S., Berger R. G., (2014). *Enzymatic hydroxylation of L-leucine and L-isoleucine: a key step to natural lactones?* In: Current Topics in Flavor Chemistry & Biology. Proceedings of the 10th Wartburg Symposium, Eisenach (Hofmann T., Krautwurst D., Schieberle P., eds.), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, pp. 123-129.

Vortrag

Lanfermann, I., Krings, U., Schopp S., Berger, R. G.; *Biogenese von Sotolon in Laetiporus sulphureus durch enzymatische Hydroxylierung von 3-Methyl-2-oxopentansäure*. Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Hamburg School of Food Science, Hamburg, 24.-25. März 2014.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Pilze | 1 |
| 1.1.1 <i>Filamentöse Pilze</i> | 1 |
| 1.1.2 <i>Basidiomyceten und Ascomyceten</i> | 2 |
| 1.1.3 <i>Weißfäule- und Braunfäulepilze</i> | 2 |
| 1.2 Oxidierende Aktivitäten in Holzfäulepilzen..... | 5 |
| 1.2.1 <i>Oxidoreduktasen</i> | 5 |
| 1.2.2 <i>Extrazelluläre oxidierende Enzyme in Holzfäulepilzen</i> | 17 |
| 1.2.3 <i>Niedermolekulare oxidierende Aktivitäten</i> | 21 |
| 1.3 Biotechnologische Applikation von Pilzen und Enzymen | 22 |
| 1.3.1 <i>Oxidierende Enzyme als Biokatalysatoren in der organischen Synthese</i> | 22 |
| 1.3.2 <i>Biotechnologische Applikation lignolytischer Enzyme aus Basidiomyceten zum Abbau organischer Substanzen</i> | 24 |
| 1.3.3 <i>Aromaproduktion durch Pilze</i> | 26 |
| 1.3.4 <i>Enzyme in Waschmitteln</i> | 27 |
| 1.4 Zielsetzung..... | 29 |
| 2 Vorwort zur Publikation „Isotope labelling experiments on the formation pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from L-isoleucine in cultures of <i>Laetiporus sulphureus</i> ” | 30 |
| 3 Isotope labelling experiments on the formation pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from L-isoleucine in cultures of <i>Laetiporus sulphureus</i> | 31 |
| 3.1 Abstract..... | 31 |
| 3.2 Introduction..... | 31 |
| 3.3 Experimental..... | 32 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | <i>Materials</i> | 32 |
| 3.3.2 | <i>Cultivation of Laetiporus sulphureus</i> | 33 |
| 3.3.3 | <i>HPLC of Amino Acids</i> | 33 |
| 3.3.4 | <i>HPLC-MS²</i> | 34 |
| 3.3.5 | <i>GC-FID and GC-MS of Volatiles</i> | 34 |
| 3.3.6 | <i>¹⁸O-Water Supplementation</i> | 35 |
| 3.4 | Results and Discussion | 35 |
| 3.4.1 | <i>Cultivation of L. sulphureus in Minimal Medium</i> | 35 |
| 3.4.2 | <i>Metabolism of Aliphatic Amino Acids in Cultures of L. sulphureus</i> | 36 |
| 3.4.3 | <i>L-Isoleucine Metabolism of L. sulphureus Leading to Sotolon</i> | 39 |
| 3.4.4 | <i>Hydroxylation of L-Isoleucine Metabolites: Water Addition or Enzymatic Oxygenation?</i> | 42 |
| 3.5 | Conclusion | 44 |
| 3.6 | Acknowledgements | 45 |
| 4 | Vorwort zur Publikation „Manganese Peroxidases from <i>Ganoderma applanatum</i> Degrade β-Carotene Under Alkaline Conditions“ | 46 |
| 5 | Manganese Peroxidases from <i>Ganoderma applanatum</i> Degrade β-Carotene Under Alkaline Conditions | 47 |
| 5.1 | Abstract | 47 |
| 5.2 | Introduction | 47 |
| 5.3 | Materials and Methods | 48 |
| 5.3.1 | <i>Chemicals</i> | 48 |
| 5.3.2 | <i>Cultivation of G. applanatum</i> | 49 |
| 5.3.3 | <i>β-Carotene Emulsion</i> | 49 |
| 5.3.4 | <i>Enzyme Activity Assay</i> | 49 |
| 5.3.5 | <i>Application Under Alkaline Conditions</i> | 50 |
| 5.3.6 | <i>Purification of the β-Carotene Degrading Manganese Peroxidases</i> | 51 |
| 5.3.7 | <i>Electrophoresis</i> | 51 |
| 5.3.8 | <i>ESI Tandem MS Analysis</i> | 52 |
| 5.3.9 | <i>cDNA Synthesis and Gene Amplification</i> | 52 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.4 | Results and Discussion | 54 |
| 5.4.1 | <i>Carotene-Degrading Activity of G. applanatum Submerged Cultures.....</i> | 54 |
| 5.4.2 | <i>Purification and Identification of Manganese Peroxidases Responsible for β-Carotene Degradation</i> | 55 |
| 5.4.3 | <i>Biochemical Characterisation of Manganese Peroxidases of G. applanatum...57</i> | 57 |
| 5.4.4 | <i>Brightening Effect of Manganese Peroxidases of G. applanatum on Carotenoid Emulsions Under Alkaline Washing Conditions.....</i> | 61 |
| 5.5 | Acknowledgments | 63 |
| 6 | Ausblick | 64 |
| 7 | Literatur..... | 67 |
| | Lebenslauf | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) |
| BLAST | basic local alignment search tool |
| CD-activity | β -carotene degrading activity |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CyP | Cytochrom-P450 |
| Da | Dalton |
| DCM | dichloromethane |
| DTT | dithiothreitol / (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butane-2,3-diol |
| EC | Enzyme Commission |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EI | electron ionisation |
| ExPASy | Expert Protein Analysis System |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FID | flame ionisation detector |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| <i>G. applanatum</i> | <i>Ganoderma applanatum</i> |
| GC | gas chromatography |
| GC-O | gas chromatography olfactometry |
| HIC | hydrophobic interaction chromatography |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| HRP | Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase) |
| IEF | isoelectric focussing |
| LiP | Ligninperoxidase |
| <i>L. sulphureus</i> | <i>Laetiporus sulphureus</i> |
| LC | liquid chromatography |
| m/z | mass-to-charge ratio |
| mM/M | millimolar [mmol L ⁻¹] / molar [mol L ⁻¹] |
| MnP | Manganperoxidase |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MS | mass spectrum/mass spectrometry |

| | |
|-------------------------------------|---|
| NAD ⁺ /NADP ⁺ | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid/-Phosphat |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OD | optical density/absorption |
| OD _{max} | maximum absorption |
| ODP | odour detection port |
| OI | odour impression |
| OPA | ortho-phthaldialdehyde |
| PAGE | polyacrylamid gel electrophoresis |
| PCR | polymerase chain reaction |
| pI | isoelectric point |
| Ref | reference substance |
| RI | retention index |
| rpm | revolutions per minute |
| rSNL | rich standard nutrition liquid media |
| ssDNA | single strand deoxyribonucleic acid |
| SDS | sodium dodecyl sulphate |
| SEC | size exclusion chromatography |
| SNL | standard nutrition liquid media |
| Tris | 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol |
| UV-Vis | ultra violet-visible |
| VA | Veratrylalkohol |

Aminosäuren werden nach dem internationalen Drei- oder Einbuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 Pilze

1.1.1 *Filamentöse Pilze*

Unscheinbar braun oder rot mit Punkten, stinkend oder lecker würzig, schmackhaft und gesund oder tödlich giftig, ein Fruchtkörper im Wald, Schimmel in der Zimmerecke oder Hefe im Brot: Unter dem Begriff Pilze wird ein Reich innerhalb der Eukaryoten zusammengefasst, welches sich durch eine hohe Diversität auszeichnet. Berechnungen des Artenreichtums belaufen sich auf 1,5 – 5,1 Millionen Spezies [1-3] und könnten noch immer die wahre globale Diversität unterschätzen. Von diesen Spezies sind tatsächlich weniger als 5 % (ca. 100.000) bekannt [1]. Pilze sind in nahezu allen Habitaten der Welt zu finden [4] und erfüllen in ihren Ökosystemen sehr vielseitige Aufgaben [5, 6].

Pilzzellen zeigen biochemische und morphologische Gemeinsamkeiten mit tierischen und auch mit pflanzlichen Zellen. Es sind heterotrophe Organismen, deren Zellen keine Chloroplasten, aber oft Vakuolen enthalten. Sie bilden meist Zellwände aus Chitin und Glucanstrukturen, allerdings nicht aus Cellulose, wie von Pflanzen bekannt [6, 7]. Die meisten Pilze sind unbewegliche, filamentöse, mehrzellige Organismen [4, 6, 7]. Um neue Habitate zu erobern, nutzen sie oft Sporen, die sowohl aus einer sexuellen Reifung als auch aus einer mitotischen Teilung resultieren können. Ist jedoch eine Nahrungsquelle vorhanden, wird diese durch ein Netz aus langen, verzweigten Hyphen kolonisiert [6]. In ihrem vegetativen Status zeigen Pilzzellen nahezu keine Differenzierung [7] und Hyphen verschiedener Arten unterscheiden sich oft nur gering, z.B. in der Ausbildung von Septen [3]. Neben den beschriebenen filamentösen Pilzen sind viele einzellige Hefen oder auch dimorphe Pilze bekannt. Auf diese Arten soll jedoch nicht näher eingegangen werden, da sich die Promotionsarbeit auf die Kultivierung filamentöser Basidiomyceten beschränkte.

Die heterotrophe Lebensweise filamentöser Pilze basiert auf einer extrazellulären Hydrolyse der Nahrungsquelle und anschließender Absorption löslicher Abbauprodukte und Minerale. Diese Weise, in ein Substrat hinein zu wachsen und es verfügbar zu machen, ist äußerst vorteilhaft [8]. Aus diesem Grund entwickelten sich bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Evolution Symbiosen zwischen Pflanzen und Mycorrhizapilzen [8-10]. Für die extrazelluläre Hydrolyse der Substrate ist eine Vielzahl sekretorischer Enzyme verantwortlich, die sich für

einen Einsatz in der biotechnologischen Branche als sehr interessant erweisen [11, 12]. Die Substrate der Pilze sind artenbedingt sehr unterschiedlich [7, 13]. Manche Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* können, wie aus dem Haushalt bekannt, fast jede organische Kohlenstoffquelle angreifen, ob Lebensmittel, Tapete oder Möbelstück. Andere Pilze hingegen sind auf bestimmte Wirte und Substrate spezialisiert. Dies geht mit der Bildung spezifischer hydrolytischer und oxidierender Enzyme einher. Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Basidiomyceten handelt es sich um holzzersetzende Pilze (Kapitel 1.1.3).

1.1.2 Basidiomyceten und Ascomyceten

Die beiden Abteilungen Basidiomycota und Ascomycota gehören zum Unterreich der Dikarya, und ca. 98 % aller bisher beschriebenen Pilzarten sind ihnen zuzuordnen [6, 7, 14]. Der Bezeichnung entsprechend weisen Dikaryoten zumindest in einem Teil ihres Lebenszyklus Zellen mit zwei Nuclei auf. Abgesehen von dieser Gemeinsamkeit ist jedoch auch in diesem Unterreich eine hohe Artenvielfalt erkennbar.

Basidiomyceten und Ascomyceten unterscheiden sich in den Zellstrukturen zur Ausbildung der Meiosporen während der sexuellen Vermehrung. Ascomyceten sind die größte Gruppe der Pilze [6, 14, 15]. Sie bilden während der sexuellen Phase schlauchartige Zellen (Asci), welche meist 8 Endosporen enthalten [7]. Basidiomyceten bilden eine sehr vielseitige Gruppe. Es sind ca. 30.000 Arten bekannt [4, 15], darunter viele Pflanzenpathogene und holzzersetzende Pilze. Die Meiose erfolgt unter Bildung von meist 4 Sporen in der sogenannten Basidie. Hierbei handelt es sich um eine Zellstruktur, die als Ständer für die Exosporen dient. Während der Reifung schnüren sie sich an der Außenseite der Basidie ab [6, 7, 14]. Bei vielen Basidiomyceten befinden sich diese Zellstrukturen in Fruchtkörpern (Basidiokarprien bzw. Basidiomatat [6]). So gehören einige der bekannten Speisepilze wie Steinpilze (*Boletus edulis*), Pfifferlinge (*Cantharellus cibarius*) oder Zuchtchampignons (*Agaricus bisporus*) zur Unterabteilung Agaricomycotina [16].

1.1.3 Weißfäule- und Braunfäulepilze

Viele Basidiomyceten leben als Parasiten oder Saprobionten auf sterbendem und totem Holz. Bei der Verholzung von Pflanzenzellen wird der Primärzellwand, welche hauptsächlich aus Cellulose-Mikrofibrillen, Hemicellulosen und Pektin besteht, eine meist mehrschichtige Sekundärzellwand aufgelagert [17]. Diese enthält einen hohen Anteil Lignin (Polymer aus Phenylpropanoiden) und Cellulose. Auf diese Weise erhält Holz seine extrem hohe Zug- und

Bruchfestigkeit und bietet eine große Herausforderung für einen mikrobiellen Abbau. Holzzeretzende Organismen wandeln diesen großen Kohlenstoffspeicher zu einer leichter zugänglichen Energieform um und bilden somit einen sehr wichtigen Bestandteil vieler Ökosysteme. Die Zersetzung des Holzes wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Substanzen und Proteine ermöglicht, die über Hydrolyse- und Redoxreaktionen Makromoleküle spalten können [18]. Holzfäulepilze werden anhand makroskopischer Charakteristika in die Kategorien Weiß-, Braun- und Moderfäule untergliedert.

Weißfäulepilze können eine vollständige Degradation des Holzes herbeiführen. Die Anfangsphase ihres Angriffes zeichnet sich durch die namensgebende Weißfärbung des Holzes aus. Sie wird durch die Anreicherung kristalliner Cellulose während der Lignindegradation hervorgerufen, da Polysaccharide zunächst nur in geringem Maße abgebaut werden [18, 19]. Die Zersetzung des Lignins wird durch eine Vielzahl oxidierender Enzyme, insbesondere Laccasen und verschiedene Peroxidasen (Kapitel 1.2.2), durchgeführt [20]. Ein Abbau des Lignins wird von den Weißfäulepilzen zwar präferiert [21], reicht meist jedoch als einzige Kohlenstoffquelle nicht aus [6]. So führen sie durch einen Co-Metabolismus der Polysaccharide oft auch zum Abbau von Cellulosen, Hemicellulosen und/oder Pektinen [6, 7]. Die Intensität des Polysaccharidabbaus ist jedoch artenbedingt sehr unterschiedlich. Manche Weißfäulepilze bauen simultan alle Holzbestandteile ab, während selektive Weißfäulepilze fast ausschließlich zur Lignindegradation führen und zusätzlich nur geringe Mengen Hemicellulose verstoffwechseln [22, 23]. Durch diesen komplexen Metabolismus bieten Weißfäulepilze ein großes Spektrum oxidierender Aktivitäten, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

Braunfäulepilze machen nur ca. 7 % der holzerstörenden Organismen aus, sind aber dennoch zu einem großen Anteil für den Holzabbau in Wäldern verantwortlich [18, 20]. Sie haben die Fähigkeit zur Produktion Lignin abbauender Peroxidasen während der Evolution verloren [19] und somit alternative Mechanismen für den Aufschluss des Holzes entwickelt. Cellulose und Hemicellulose werden von diesen Pilzen intensiv abgebaut, Lignin hingegen wird durch Demethylierungen und Demethoxylierungen modifiziert [24, 25]. Der Angriff von Braunfäulepilzen erfolgt in zwei Phasen. Zunächst werden mittels Oxalsäure und niedermolekularer Chelatoren die Strukturen des Holzes aufgebrochen (siehe auch Kapitel 1.2.3). Anschließend kommt es ausgehend von Hemicellulose-Seitenketten zu einer extensiven

Degradation der Polysaccharide [18, 26]. Das zurückbleibende, modifizierte Ligningerüst ist für die Braunfärbung und somit für die Namensgebung verantwortlich.

Innerhalb dieser Dissertation wurden oxidierende Aktivitäten des Weißfäulepilzes *Ganoderma applanatum* und des Braunfäulepilzes *Laetiporus sulphureus* untersucht. Beide gehören der Ordnung der Polyporales (Stielporlingsartige) der Großpilze an, die zur Klasse Agaricomycetes zählt. Sie wachsen stiellos an Holz und bilden große Fruchtkörper, die senkrecht vom Baumstamm ragen (Konsolenform). Auf der Hutunterseite befindet sich die in Röhren angeordnete und von feinen Poren durchsetzte sporentragende Schicht.

L. sulphureus (Schwefelporling) ist ein stammbürtiger Pilz [27], kann also in höheren Bereichen des Baumstammes meist in Weiden, Eichen und Eiben gefunden werden [6]. Er bildet fächerartige, einjährige Fruchtkörper mit auffallender Orangefärbung [27]. Für dieses Charakteristikum sind einzigartige, nicht-isoprenoide Polyenstrukturen (*laetiporic acids*) verantwortlich [28, 29]. *L. sulphureus* lebt meist parasitär und greift lebende Bäume an verletzten Stellen (abgebrochene, abgeschnittene Zweige) an. Generell gilt der Pilz als essbar und wird durch seinen besonderen Geschmack auch „*chicken of the woods*“ genannt [6]. In der Literatur wird dieser Pilz insbesondere mit einer Produktion von Radikalfängern in Verbindung gebracht und als potentieller anti-oxidativer und anti-mikrobieller Zusatzstoff für Lebensmittel gesehen [30, 31]. Zusätzlich produziert er den interessanten, sehr intensiv würzigen Aromastoff Sotolon, dessen Biosyntheseweg unter anderem Gegenstand dieser Arbeit ist (Kapitel 3).

G. applanatum (Flacher Lackporling) wächst am unteren Stammfuß oder Wurzelstock (wurzelnbürtig) als Schwächeparasit an Laubhölzern [27]. Er wird auch Malerpilz genannt, da die Oberfläche der Fruchtschicht besonders glatt ist und sehr feine Poren enthält [7]. Bei Druck oder Ankratzen des Fruchtkörpers kommt es zur Braunfärbung, sodass direkt auf der Oberfläche gemalt werden kann. *G. applanatum* wird zudem in der traditionellen Medizin Asiens bereits seit 100 BC eingesetzt [32]. Tatsächlich wurden in wissenschaftlichen Studien der letzten Jahre eine Vielzahl biologisch aktiver Exopolysaccharide und Terpenoide in Kulturen des Pilzes gefunden. Diese zeigten immunmodulierende Eigenschaften, inhibierten *in vitro* unter anderem das Wachstum humaner Krebszellen und besaßen eine anti-mikrobielle Wirkung [32, 33].

1.2 Oxidierende Aktivitäten in Holzfäulepilzen

1.2.1 Oxidoreduktasen

Redoxreaktionen in lebenden Organismen sind grundlegend für die Bereitstellung von Energie und Biosynthese von Naturstoffen. Der Metabolismus eines jeden Lebewesens ist somit geprägt von oxidativen und reduktiven Vorgängen.

Unter dem Begriff "oxidierende Aktivitäten" kann eine enorme Vielzahl verschiedener Reaktionsmechanismen zusammengefasst werden, die einen Austausch von Elektronen oder Redoxäquivalenten zwischen einem Donor und einem Akzeptor beinhalten. Es können Elektronen transferiert werden, Protonen, Wasserstoff oder Hydridionen abstrahiert oder Sauerstoff in ein Substrat insertiert werden [34]. In der Biochemie werden diese Vorgänge durch Enzyme katalysiert. Alle Enzyme, die Redoxaktivitäten besitzen, sind in der Klasse „Oxidoreduktasen“ mit der EC-Nummer 1.x.x.x zusammengefasst [35]. Die weiteren Ziffern der EC-Nummern grenzen Unterklassen anhand von Substraten, übertragenen Molekülen und Cosubstraten weiter ab [36], sodass 22 EC-Unterklassen der Oxidoreduktasen existieren. Die Elektronendonoren und -akzeptoren der Redoxreaktion werden zur Eingrenzung herangezogen. So nutzen zum Beispiel Enzyme der Klasse 1.11 Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor (Cosubstrat) und produzieren Wasser. Enzyme der Unterklasse 1.11.1 (Peroxidasen) übertragen nur die Elektronen auf das Wasserstoffperoxid, während Enzyme der Unterklasse 1.11.2 (Peroxygenasen) zusätzlich ein Sauerstoffatom des Peroxids in das Substrat einbauen [35, 37]. Mit jeder Ziffer der EC-Nummer kommt es somit zu einer genaueren Spezifizierung der Enzymreaktion. Dennoch ist die Klassifizierung nicht immer eindeutig, da Enzyme oft mehr als ein Substrat nutzen können.

Um ihre biochemische Funktion ausüben zu können, haben Oxidoreduktasen sehr unterschiedliche aktive Zentren entwickelt. Oft sind Metallionen (Cu, Fe, Mo, Fe-S-Cluster) oder Cofaktoren (FAD, FMN, NAD⁺, Pyrrolochinolinchinon) für die Reaktion vonnöten [34]. In Cofaktor-unabhängigen Enzymen sind meist aromatische Aminosäurereste direkt an der Katalyse beteiligt [34, 38].

Innerhalb der Oxidoreduktasen lassen sich etwas allgemeiner als mit der EC-Klassifizierung anhand ihrer charakteristischen Reaktionen vier Klassen differenzieren: Dehydrogenasen, Oxidasen, Oxygenasen und Peroxidasen (Abbildung 1.1) [34, 36, 39]. Die letzteren drei genannten Klassen nutzen stets Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Da die Reduktion des

Sauerstoffs eine stark exotherme Reaktion darstellt, handelt es sich hierbei um nahezu irreversible Oxidationsreaktionen [40]. Dehydrogenasen überführen die abstrahierten Elektronen in reversiblen Mechanismen auf andere geeignete Akzeptoren. Biotechnologisch können Dehydrogenasen somit als oxidierende und reduzierende Agentien eingesetzt werden [40]

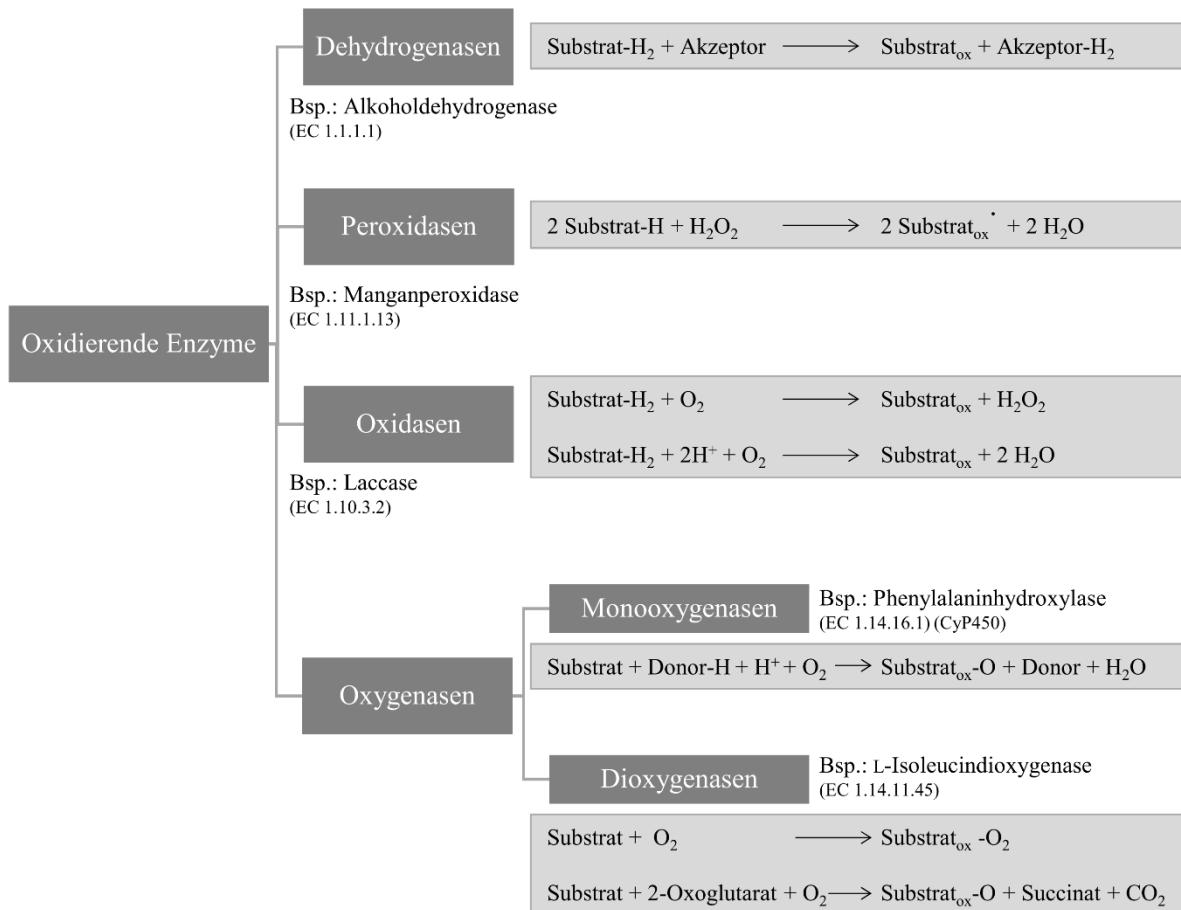


Abbildung 1.1 Oxidierende Enzyme und ihre Reaktionen

Für die in dieser Dissertation untersuchten Enzyme und Reaktionen ist insbesondere eine nähere Betrachtung der Peroxidasen und Oxygenasen von Interesse. Auf Dehydrogenasen und Oxidasen soll aus diesem Grund nicht eingegangen werden.

Peroxidasen

Peroxidasen sind in vielen Organismen zu finden. Oft werden sie anhand ihrer (Co-)Substrate (z.B. Ligninperoxidase) oder anhand ihres Herkunftsorganismus (z. B Meerrettichperoxidase) benannt [37]. Wie bereits erläutert, liegt im Falle dieser Enzyme Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor für die Redoxreaktion vor. Sie produzieren daraus Wasser und überführen

ihre Substrate in Radikale, die chemisch weiter reagieren können. Einige Enzyme können zusätzlich auch organische Alkylperoxide als Akzeptoren nutzen, sodass die korrespondierenden Alkohole und Wasser entstehen [41]. 73 % der bekannten Peroxidasen sind Häm-Proteine [42]. Sie enthalten als prosthetische Gruppe ein Eisen-Porphyrinringsystem (Abbildung 1.2).

Hierbei handelt es sich meistens um Häm B, auch Protoporphyrin IX, genannt oder ein modifiziertes Derivat [37]. Zudem können die katalytischen Zentren mancher Peroxidasen zusätzlich oder alternativ aus weiteren Cofaktoren bestehen, wie Selenium [43], Vanadium [44] oder Mangan [45].

Eine Klassifizierung der Enzyme wurde in den letzten Jahren mehrfach anhand phylogenetischer Daten erneuert. Frühere Einteilungen in Säugetier-, bakterielle oder pflanzliche Peroxidasen [46-48] werden zwar noch oft genutzt, gelten jedoch mittlerweile als überholt [42, 49]. Aufgrund neuester Erkenntnisse können vier Superfamilien unterteilt werden, die in allen Reichen der lebenden Organismen gefunden werden können [49]:

Die (1) Peroxidase-Katalase Superfamilie, (2) Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie, (3) Peroxidase-Chlorit-Dismutase Superfamilie und die (4) Peroxidase-Peroxygenase Superfamilie [49]. Extrazelluläre Peroxidasen der Basidiomyceten, die im späteren Verlauf dieser Dissertation näher besprochen werden sollen, sind Teil der Superfamilie 1 (Mangan- und Ligninperoxidasen).

Der katalytische Mechanismus der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) wurde sehr intensiv erforscht und wird als Modell des Reaktionszyklus für Häm-Peroxidasen herangezogen, die ein proximales Histidin als axialen Liganden des Häm-Eisens tragen [50]. Die oxidierende Reaktion verläuft bei diesen Häm-Peroxidasen stets über die gleichen Intermediate (Abbildung 1.3). Im nativen Ruhezustand liegt die Hämgruppe als Eisen-III-Spezies im Zentrum des Proteins vor. Bei Anlagerung von Wasserstoffperoxid kommt es vermutlich zu einem instabilen Eisen-Hydroperoxid-Zwischenzustand [50, 51]. Die Existenz

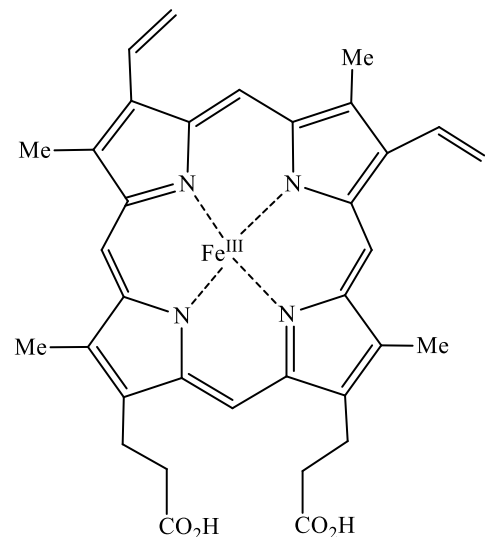


Abbildung 1.2 Struktur des Eisen-Protoporphyrin IX, Vorläufer für die prosthetische Gruppe von Häm-Peroxidasen.[37]

der Verbindung 0 ist noch umstritten und von sehr kurzer Dauer [50, 52]. Ein konservierter distaler Histidinrest wirkt vermutlich als Protonenakzeptor bei der Bindung des Peroxids an den Eisenkern der Hämgruppe. Bei diesen Vorgängen wird das Proton kurzfristig auf den distalen Histidinrest übertragen.

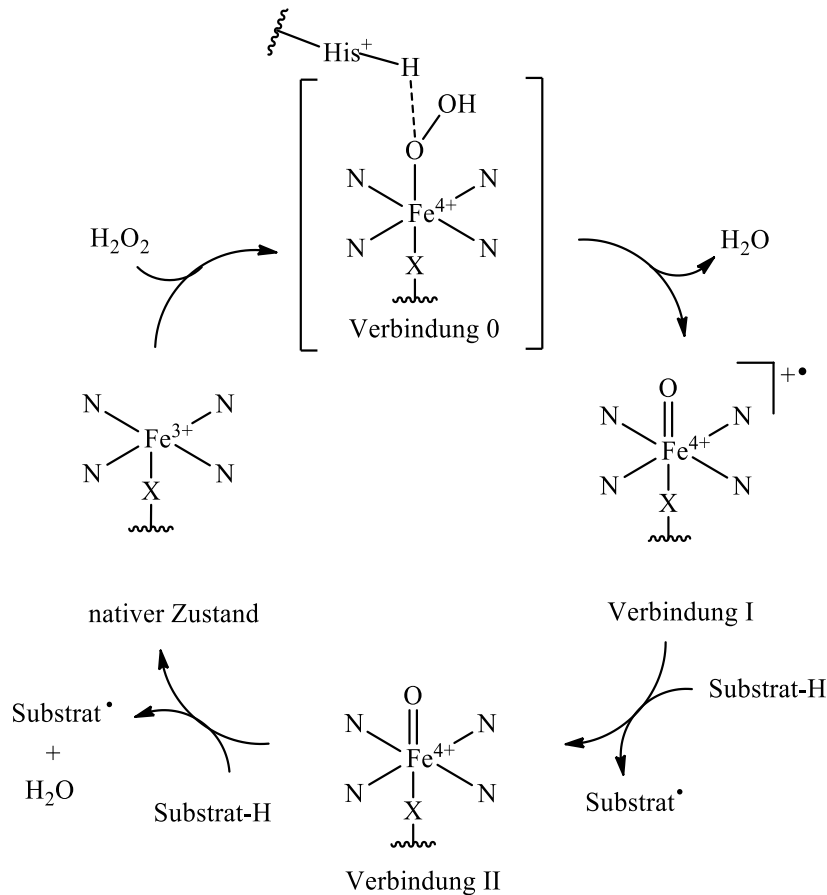


Abbildung 1.3 Katalytischer Zyklus der Peroxidase-Reaktion einer HRP (nach [50])

Auf diese Weise erhält er eine positive Ladung und wirkt anschließend direkt als Protonendonator für das distale Sauerstoffatom des Hydroperoxids. Es wird in Form von Wasser eliminiert, sodass die Verbindung I entsteht [50, 53]. Ein Argininrest (nicht eingezeichnet) unterstützt diese Vorgänge über Wasserstoffbrückenbindungen. Die Verbindung I ist in den meisten Peroxidasen eine Eisen-IV-Spezies mit einem Porphyrin- π -Radikalkation [37, 53, 54]. Manche Peroxidasen transferieren das Radikal jedoch vom Porphyrinring direkt auf einen Tryptophanrest, sodass ein aromatisches Radikal im Protein entsteht [50, 53]. Aus diesem Intermediat entsteht in zwei Ein-Elektronen-Schritten über die Verbindung II wieder der native Ruhezustand des Proteins. Dabei wird ein weiteres Substratmolekül oxidiert und Wasser aus dem Hämkomplex abgespalten [37, 50].

Für die meisten Peroxidasen kann dieses allgemeine Reaktionsmodell herangezogen werden. Eine Ausnahme stellen unter anderem Haloperoxidasen dar. Sie können eine Halogenierung organischer Substanzen durchführen und agieren entsprechend nach anderen Reaktionsmechanismen [44, 55]. Generell werden Haloperoxidasen der Peroxidase-Peroxygenase-Superfamilie zugeordnet und stellen funktionale Hybride zwischen den klassischen Häm-Peroxidasen und den Cytochrom-P450-Monooxygenasen dar [49].

Neben der oben beschriebenen Bildung von Substratradikalen können Häm-Peroxidasen auch Sauerstoff in das Substrat einbauen. Haloperoxidasen nutzen hierfür direkt Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonor [54], sodass es sich um eine Peroxygenasereaktion handelt [37, 49]. Im Falle anderer Peroxidasen, wie der HRP, ist hingegen die Hämgruppe schwerer zugänglich, was eine direkte Sauerstoffübertragung von dem dort gebundenen Wasserstoffperoxid auf ein Substrat verhindert [54]. Hier erfolgt eine Hydroxylierung oder Epoxidierung von Substraten durch Cooxidation eines Cosubstrates, z.B. eines Phenols. Dieses wird durch die Peroxidase oxidiert und formt Peroxyradikale durch Inkorporation molekularen Sauerstoffs. Solche reaktive Spezies können Doppelbindungen angreifen und so Sauerstoff auf das eigentliche Substrat übertragen [54, 56]. Phenole oder andere Cosubstrate dienen somit als Mediatoren für die Oxidationsreaktion.

Durch diese vielseitigen Reaktionen können Peroxidasen ganz unterschiedliche Aufgaben in Zellen übernehmen. Oft dienen sie der Detoxifizierung, indem sie die reaktive Sauerstoffspezies H_2O_2 abbauen [57] oder toxische Xenobiotika oxidieren [58]. Pflanzen und Pilze nutzen sie hingegen zum Auf- bzw. Abbau von Lignin [46]. Peroxidasen aus Basidiomyceten werden in Kapitel 1.2.2 näher betrachtet.

Oxygenasen

Die Enzymklasse der Oxygenasen kann aufgrund der Anzahl an Sauerstoffatomen, die in das Substrat inseriert werden, in Mono- und Dioxygenasen unterteilt werden [40]. Den Namen entsprechend bauen Monooxygenasen ein Sauerstoffatom, Dioxygenasen hingegen beide Atome des molekularen Sauerstoffs ins Substrat ein. Diese Einteilung basiert jedoch einzig auf stöchiometrischen Überlegungen und lässt keinen Schluss auf den Mechanismus zur Aktivierung des molekularen Sauerstoffs zu [59].

Oxygenasen können in den Klassen EC 1.13 und EC 1.14 gefunden werden. Enzyme der Klasse EC 1.13 agieren an einem einzelnen Substrat, in der Klasse EC 1.14 hingegen sind Enzyme

aufgeführt, die an zwei Wasserstoffdonoren gleichzeitig agieren [60]. In beiden Klassen können Mono- und Dioxygenasen gefunden werden [35, 60]. Als Biokatalysatoren erweisen sich Oxygenasen insbesondere zum Einsatz in der organischen Synthese als interessant. Sie vermögen es, nicht aktivierte C-H und C-C-Bindungen zu oxyfunktionalisieren [36] und weisen dabei oft eine gute Regio- und Stereoselektivität auf [61]. Häufig beschriebene Reaktionen der Oxygenasen sind Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Bayer-Villiger-Oxidationen und Dihydroxylierungen (Abbildung 1.4) [39, 61, 62].

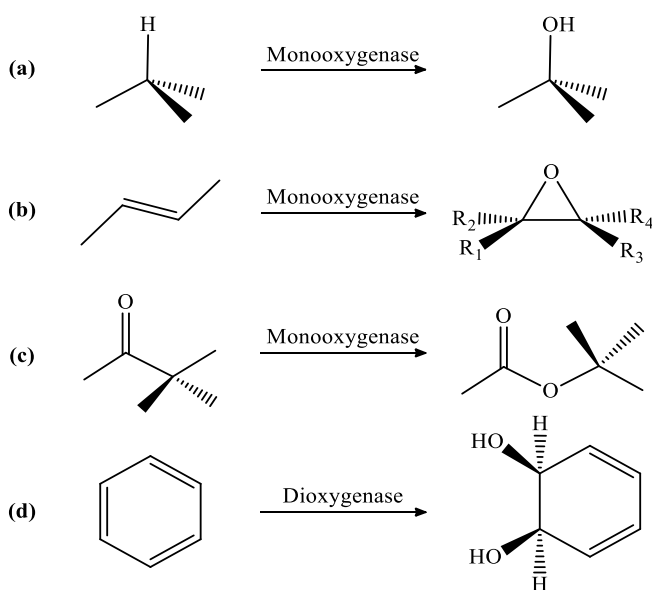


Abbildung 1.4 Typische Reaktionen der Oxygenasen (nach [60])

Das Produktspektrum ist jedoch noch viel umfangreicher und beinhaltet Hydroxylierungen und Dealkylierung von Heteroatomen, sowie Deaminierungs-, Dehalogenierungs- und weitere Reaktionen [40, 59, 63]. Um diese vielseitigen oxidativen Vorgänge zu katalysieren, haben sich sehr unterschiedliche aktive Zentren in den Enzymen entwickelt, anhand derer die Oxygenasen weiter unterteilt werden können. (Abbildung 1.5). Auf einige dieser Enzyme wird im Folgenden näher eingegangen.

Monoxygenasen

Für eine Reaktion mit organischen Molekülen muss molekularer Sauerstoff im Triplett-Grundzustand zunächst aktiviert werden. Aufgrund der Spins der Valenzelektronen wären sonst keine Reaktionen möglich [38, 63]. Die Aktivierung erfolgt abhängig von den prosthetischen Gruppen und Cofaktoren im katalytischen Zentrum der Monoxygenase auf unterschiedliche Weise. Stets muss ein Elektron auf molekularen Sauerstoff überführt werden, sodass ein reaktives Sauerstoffintermediat entsteht [38]. Interne Monoxygenasen können direkt vom Substrat Elektronen abstrahieren, externe Monoxygenasen sind hingegen abhängig von einem anderen Elektronendonator, meistens NAD(P)H [38, 40, 61, 63].

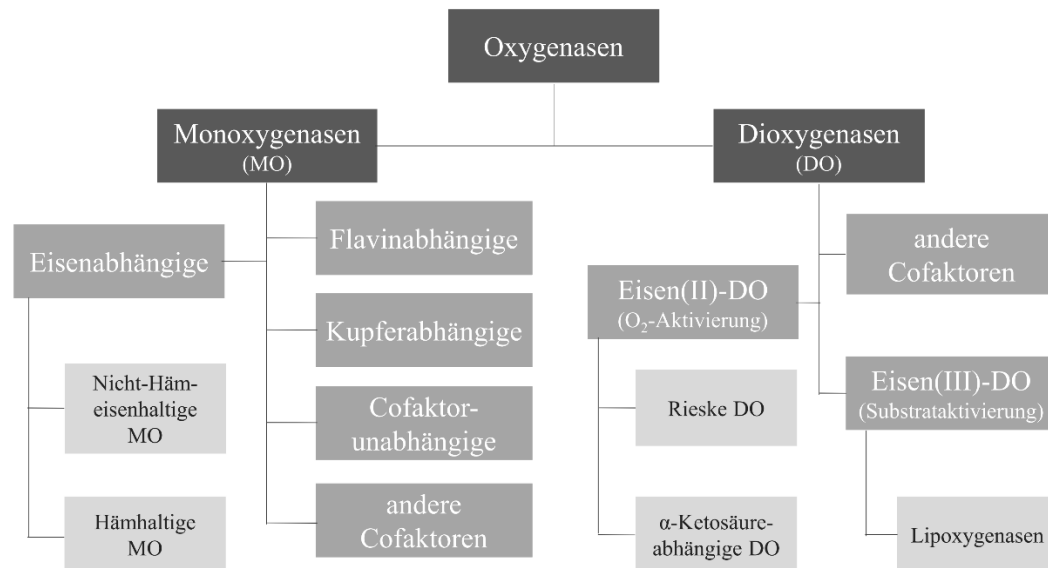


Abbildung 1.5 Klassifizierung von Oxygenasen (nach [40])

Es können hämabhängige, flavinabhängige, kupferabhängige und nicht-häm-eisenhaltige Monoxygenasen unterschieden werden [38, 40, 63]. In selteneren Fällen sind auch andere Cofaktoren, wie Pterin bekannt, oder Enzyme, die eine Oxidation unabhängig von externen Cofaktoren und prosthetischen Gruppen durchführen können [38, 64]. Die Klassifizierung soll jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass zusätzlich zu den genannten prosthetischen Gruppen und Metallionen oft weitere Cofaktoren, meist NAD(P)H oder FADH₂, als Donoren für die Katalyse notwendig sind.

Um einen Einblick in die Reaktionsmechanismen von Monoxygenasen zu erlangen und gleichzeitig den Rahmen dieser Arbeit in Maßen zu halten, werden im Folgenden vornehmlich die am besten verstandenen katalytischen Vorgänge ausgewählter Monoxygenasen vorgestellt, die in Pilzen gefunden werden.

Bei sehr vielen Monoxygenasen spielt Eisen im katalytischen Zentrum eine tragende Rolle. Eisenabhängige Enzyme sind die häufigsten und bis heute am besten beschriebenen Oxygenasen [65]. Die hämhaltigen Monoxygenasen werden auch Cytochrom P450 Monoxygenasen (CyPs) genannt [38, 59]. CyPs sind im Metabolismus ubiquitär vorhanden zur Umwandlung endogener und exogener Substanzen. Sie können somit auch in fast allen Lebewesen, vom Bakterium bis zum Säugetier, gefunden werden. Auch filamentöse Pilze nutzen eine Vielzahl an CyPs, um, den Tieren ähnlich, Xenobiotika abzubauen oder, den Pflanzen ähnlich, Sekundärmetabolite zu synthetisieren [66]. Die Proteinsequenzen sind oft sehr unterschiedlich (Identität <20 %, [67]), das aktive Zentrum der Enzyme ist hingegen hoch

konserviert [67, 68]. Die Hämgruppe liegt in einer apolaren Umgebung und ist im Bereich des äußeren Porphyrinringes eher abgeschirmt, um Peroxidase-ähnliche Elektronenübertragungen zu verhindern [54]. Das Eisenzentralatom des Hämkomplexes ist gebunden an ein Cystein-Schwefelatom als fünften Liganden und trägt im Ruhezustand ((1), Abbildung 1.6) an sechster Position ein Wassermolekül.

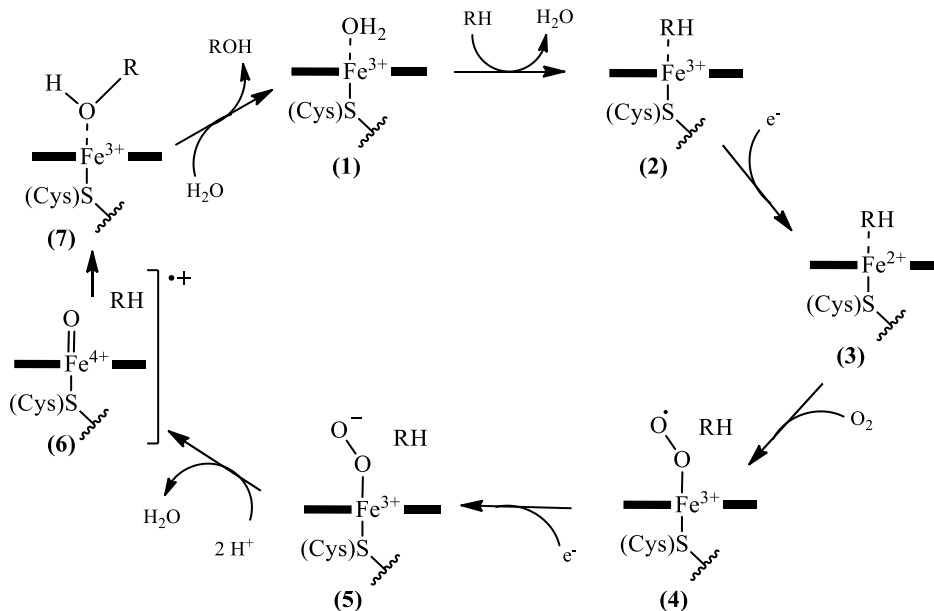


Abbildung 1.6 Katalytischer Mechanismus einer Hydroxylierung durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (nach [36, 38, 40])

Diese Position ist im Gegensatz zum äußeren Porphyrinring freier zugänglich, um von dort einen Sauerstofftransport auf das Substrat zu ermöglichen [40, 54, 67].

Bei der Hydroxylierungsreaktion (Abbildung 1.6) kommt es zunächst zur Bindung des Substrates im katalytischen Zentrum des Enzyms. Das Substrat ersetzt hierbei den Wasserliganden an sechster Position des Eisen-Häm-Komplexes (2). Von der Reduktaseeinheit des Enzyms wird nun für eine erste Aktivierung ein Elektron eingespeist und es entsteht die Fe^{2+} -Zwischenstufe (3). Bei der Anlagerung von molekularem Sauerstoff wird wieder eine Fe^{3+} -Spezies erzeugt (4). Durch ein zweites Elektron wird nun der Sauerstoff weiter aktiviert. Es entsteht ein Peroxoanion (5), das über eine Protonierung zu einem sehr instabilen Hydroperoxo-Intermediat (nicht eingezeichnet) umgewandelt wird. Durch ein zweites Proton kommt es direkt durch Spaltung der O-O-Bindung zur Bildung von Wasser und der Zwischenstufe (6). Bei Letzterem handelt es sich um ein Porphyrin-Radikalkation oder, alternativ postuliert, um eine $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$ -Spezies [69]. Dieses reaktive Intermediat führt zur

eigentlichen Hydroxylierung des Substrates (7), welches anschließend aus dem Enzym freigelassen wird, sodass sich der Ruhezustand (1) zurückbilden kann [40].

Für diesen Oxidationsvorgang benötigen CyPs stets Elektronen von NAD(P)H [59, 67]. Diese Elektronen werden über die Reduktaseuntereinheit der Enzyme mithilfe verschiedener Elektronentransportsysteme zum katalytischen Hämzentrum geleitet [38, 40, 67]. Hierbei sind verschiedene Systeme bekannt, die FAD/FMN, Ferredoxin und andere Hilfsmoleküle nutzen. Anhand dieser Transportsysteme werden Klassen an CyPs untergliedert.

Neben Eisen spielt Kupfer in vielen Proteinen eine wichtige katalytische Rolle. Kupferabhängige Monooxygenasen sind eine recht kleine Enzymfamilie und enthalten oft binukleare Kupferzentren [38, 40]. Die beiden Kupferionen können entweder voneinander entfernt und strukturell nicht äquivalent vorliegen, oder magnetisch gekoppelt sein [70]. Im ersten Falle interagieren die Kupferionen nicht miteinander. Sie werden über Ascorbat reduziert, und nur eines der Kupferatome aktiviert anschließend molekularen Sauerstoff. Es bildet sich eine mononukleare Kupfer(I)-Superoxidspezies, die ein Wasserstoffatom von dem Substrat abstrahiert und anschließend eine Hydroxylierung durchführt [40, 71, 72]. Das zweite Kupferatom dient bei diesen Vorgängen lediglich als Elektronendonator.

Im Falle der zweiten Gruppe binuklearer Kupferenzyme liegen die Kupferionen sehr nah beieinander und magnetisch gekoppelt vor [70]. Bei Aufnahme molekularen Sauerstoffs kommt es im katalytischen Zentrum zur Bildung eines Peroxo-Dikupfer-(II)-Komplexes [38, 40, 70]. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Phenoloxidasen und Tyrosinasen. Oft werden solche Enzyme nicht der Klasse der Monooxygenasen zugeordnet, da sie nicht nur Oxygenierungen durchführen können [65, 73, 74]. Auch Oxidase-, Katalase- und Peroxygenasefunktionen sind bekannt [40, 73, 75]. Tyrosinasen gehören der Typ-3 Familie von Kupferenzymen an und sind auch in Pilzen bekannt. Dort bilden sie eine recht heterogene Gruppe cytosolischer Enzyme [74]. Sie katalysieren sowohl eine Hydroxylierung von Monophenolen, als auch eine 2-Elektronen-Oxidation des entstandenen Diphenols zum Quinon. Mit diesen Enzymen eng verwandt sind die Laccasen aus Pilzen (Kapitel 1.2.2) [40, 76]. Sie zählen jedoch zu den Oxidasen und tragen ein Zentrum aus vier Kupferionen, das unter anderem binukleare Typ-3 Kupferionen enthält.

Eine letzte Gruppe an Monooxygenasen, die hier vorgestellt werden soll, bilden die flavinabhängigen Monooxygenasen. Sie sind eine sehr große Gruppe und kommen ubiquitär vor [63]. Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Monooxygenasen, die Metallionen zur

Katalyse der Oxidation benötigen, handelt es sich bei Flavin um einen rein organischen Cofaktor. Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), die sich einzig an der Restgruppe am Riboflavin unterscheiden, können Teil des aktiven Zentrums sein. Sie werden dort nicht-kovalent gebunden [65].

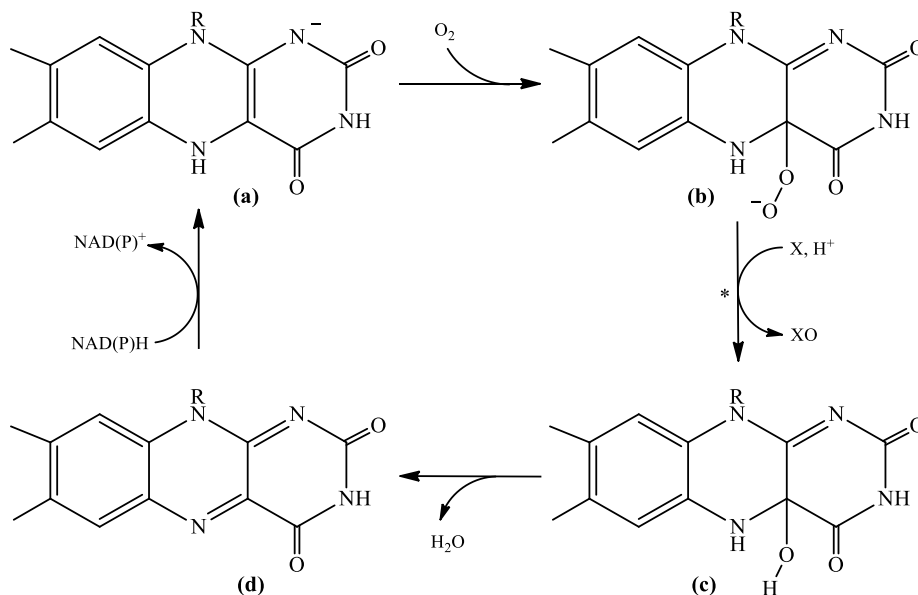


Abbildung 1.7 Katalytischer Mechanismus einer flavinabhängigen Monooxygenase. *Reaktionsschritt kann elektrophil oder nukleophil verlaufen (nach [40, 63])

Die Monooxygenasen katalysieren höchst chemo-, regio- und enantioselektiv und werden insbesondere zur Anwendung als Katalysatoren der Bayer-Villiger-Reaktion, Epoxidierung und Sulfoxidierung als nützlich erachtet [63, 77, 78]. Der Reaktionsmechanismus (Abbildung 1.7) verläuft ausgehend von der reduzierten Flavinform (a) über eine reaktive Peroxoverbindung (b). Derartige Peroxoflavine sind äußerst instabil und werden einzig durch die stabilisierende Umgebung des Enzyms von einem Zerfall in Wasserstoffperoxid und oxidiertes Flavin abgehalten [65]. Abhängig vom Protonierungsstatus dieses Intermediats kann über einen nukleophilen oder elektrophilen Angriff des Substrates eine Oxidation herbeigeführt werden [79]. Das so entstandene C4a-Hydroxyflavin (c) bildet anschließend Wasser und die oxidierte Form des Flavins (d).

Basierend auf Struktur- und Sequenzhomologien können 6 verschiedene Klassen an Flavoprotein Monooxygenasen untergliedert werden [63]. Die Struktur des Proteins um das aktive Zentrum beeinflusst die Art der Reaktionen, die von den Oxygenasen durchgeführt werden können [63, 77, 79]. Enzyme der Klassen A und B (EC 1.14.13.x) bestehen nur aus einer Untereinheit und benötigen externes $NAD(P)H$ als Elektronendonator zur Reduktion des

FAD. Enzyme der Klassen C-F (EC 1.14.14.x) hingegen benötigen ein zweites Reduktase-Partnerprotein um reduziertes Flavin zur Verfügung zu stellen [77]. Flavin bildet hier eine Art Elektronenshuttle zwischen der Reduktase- und Oxygenaseuntereinheit [65]. Mitglieder der Klasse C und H, sowie manche Enzyme der Klasse D nutzen FMN als Cofaktor. Alle anderen dieser Monooxygenasen sind hingegen FAD-abhängig [38, 77].

Ein sehr großer Anteil der flavinabhängigen Monooxygenasen sind externe Oxygenasen, benötigen also Elektronen des Donors NAD(P)H um die reduzierte Flavinform herzustellen. In selteneren Fällen wird das Flavin hingegen vom Substrat selbst reduziert, dies nennt man interne Monooxygenase. Ein Beispiel ist die Lactat-Monooxygenase [63, 80], die Elektronen von Lactat auf oxidiertes Flavin übertragen kann. Auf diese Weise entsteht Pyruvat und das für eine Oxygenierung notwendige reduzierte Flavinmolekül [81]. Interne flavinabhängige Monooxygenasen sind bisher nicht ausführlich beschrieben und nicht Teil der oben genannten Klassen A-F [63, 77].

Dioxygenasen

Dioxygenasen können, ähnlich wie Monooxygenasen, verschiedene Cofaktoren aufweisen, darunter Kupfer, Häm und Eisen [40, 59, 82]. In sehr seltenen Fällen scheinen sogar keine Cofaktoren oder Metallionen benötigt zu werden [64]. Bei weitem die größte Bedeutung haben mononukleare nicht-häm Eisenzentren [40, 82]. Sie werden unterschieden in jene, die Sauerstoff aktivieren und eine Eisen(II)-Spezies tragen, und jene, die zunächst das Substrat mithilfe einer Eisen(III)-Spezies aktivieren (Abbildung 1.5).

Mononukleare Eisen(II)-Oxygenasen können ferner unterteilt werden in Inter- und Intramolekulare Dioxygenasen, abhängig davon, ob die zwei Sauerstoffatome des molekularen Sauerstoffs auf ein oder zwei Substratmoleküle übertragen werden [59]. Im letzteren Fall ist oft 2-Oxoglutarat oder eine andere α -Ketosäure das Cosubstrat (EC 1.14.11.x), welches im Zuge der Reaktion mithilfe des mononuklearen Eisenzentrums oxidativ decarboxyliert wird [65, 83, 84]. α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen bilden die größte und diverseste Gruppe mononuklearer nicht-häm eisenabhängiger Enzyme [40]. Sie sind verantwortlich für bedeutsame biosynthetische Transformationen im Primär- und Sekundärmetabolismus, wie die Hydroxylierung von Aminosäuren [85, 86], und die Bildung von Carbapenemen [87-89]. Die Sequenzidentität der verschiedenen α -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen ist oft sehr gering [40]. Hoch konserviert liegt jedoch die katalytisch aktive Aminosäuretriade aus zwei Histidinen und einer Carboxylgruppe zur Verankerung des prosthetischen Eisens vor [90].

Ein Modell des allgemeinen Reaktionsmechanismus (Abbildung 1.8) dieser Oxygenasen schlägt vor, dass α -Ketoglutarat und ein Substratmolekül die drei Wasserliganden des Eisen(II)-Komplexes (a) zunächst ersetzen (b-c) [84, 90, 91]. Nachdem Sauerstoff im Komplex gebunden hat (d) wird die Ketogruppe des α -Ketoglutarats von einem Sauerstoffatom angegriffen, sodass ein hoch reaktives Intermediat entsteht (e), welches unter Spaltung der O-O-Bindung und Decarboxylierung der Säure eine Eisen(IV)-oxoverbindung bildet (f). Diese kann, ähnlich wie in bereits beschriebenen Mechanismen anderer Eisenenzyme, Substrate oxidieren [90, 91].

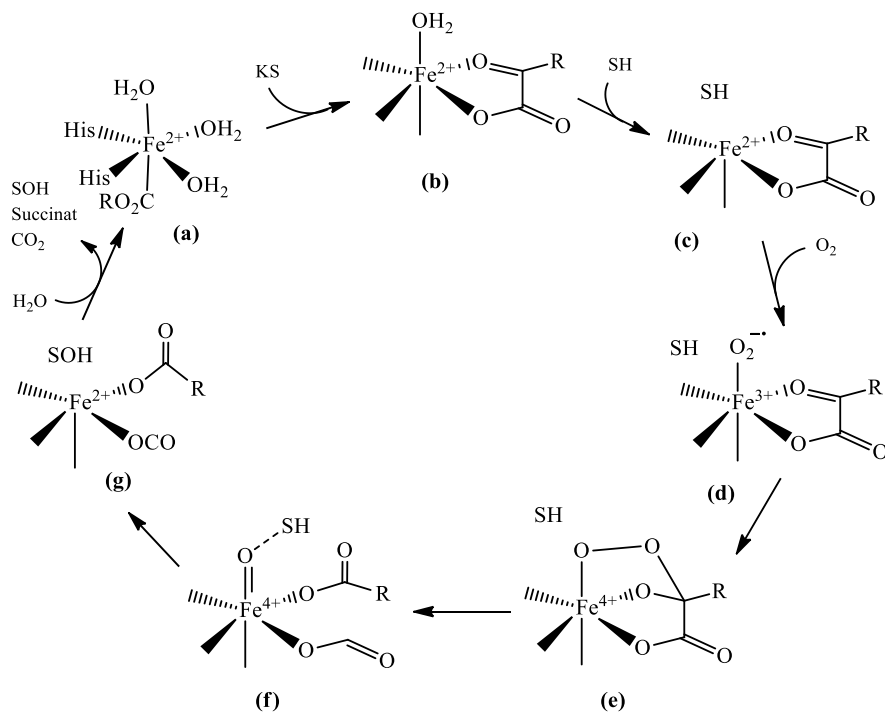


Abbildung 1.8 Modell des katalytischer Mechanismus von α -Ketoglutarat (KS) (nach [40])

Am häufigsten führen diese Dioxygenasen Hydroxylierungen an einem nicht aktivierten C-H durch, doch auch Desaturierungen und Epoxidierungen gehören zum Produktspektrum [83]. Dasselbe Enzym kann hierbei oft multifunktional zwei oder mehr Reaktionen in einer geordnet ablaufenden Sequenz durchführen. Die gleiche 2-His-1-Carboxylat-Triade wird auch in anderen Enzymen mit mononuklearem Eisenzentrum genutzt, die nicht immer Ketosäure als Cosubstrat benötigen. Ein Beispiel sind die extradiol-spaltenden Catecholdioxygenasen [84, 91, 92].

Ein Beispiel für die zweite Gruppe an Dioxygenasen, Eisen(III)-abhängige Oxygenasen, sind Lipxygenasen [91, 93, 94]. Wie bereits erwähnt, agieren Enzyme dieser Gruppe über eine Substrataktivierung. Lipxygenasen abstrahieren hierfür mithilfe eines Histidin-reichen

Fe(III)-Zentrums Wasserstoff an bisallylischer Position ungesättigter Fettsäuren [93]. Auf diese Weise entsteht ein Fettsäureradikal, an welches nach Umlagerungsreaktionen Sauerstoff addiert. Das Peroxoradikal wird anschließend reduziert, sodass ein Fettsäurehydroperoxid als Produkt entsteht, und das aktive Zentrum des Enzyms zurückgebildet wird [93, 94]. Lipoxygenasen sind vornehmlich in Pflanzen und Tieren bekannt, wurden aber auch in Basidiomyceten der Gattung *Pleurotus* identifiziert und charakterisiert [95, 96].

1.2.2 Extrazelluläre oxidierende Enzyme in Holzfäulepilzen

Wie in Pflanzen und Tieren ist auch in holzzersetzenden Basidiomyceten eine Vielzahl intrazellulärer Oxidoreduktasen am Metabolismus beteiligt. Als Produzenten verschiedenster Sekundärmetabolite, darunter Terpene, Polyketide und nicht-ribosomale Peptide [97-99], nutzen Pilze ein extrem großes Spektrum intrazellulärer oxidierender Enzyme. Tatsächlich liegt jedoch eine Besonderheit der Pilze gerade in der Vielfalt extrazellulärer Enzymaktivitäten. Im Falle des Weißfäulepilzes *G. applanatum*, konnte im Zuge dieser Dissertation eine neue extrazelluläre Aktivität charakterisiert werden. Aus diesem Grund soll nun im Folgenden ein Überblick der extrazellulären oxidierenden Enzyme aus Holzfäulepilzen gegeben werden. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, dienen diese Enzyme vor allem dem Abbau des Substrates Holz. Es müssen somit Enzyme zur Degradation verschiedener Polysaccharide (Cellulosen, Hemicellulosen) und zum Abbau des Lignins produziert werden.

Den großen Anteil des Celluloseabbaus in Holzfäuleorganismen führen Endo- und Exoglucanasen, Cellobiohydrolasen und Glucosidasen durch [18, 100]. Hemicellulose wird entsprechend von Xylanasen, Mannasen, Galaktosidase und anderen Enzymen abgebaut. Neben diesen hydrolytischen Aktivitäten gibt es jedoch auch einen oxidativen Angriff auf die Polysaccharidstrukturen zum Beispiel durch Cellobiosedehydrogenasen und Polysaccharidmonooxygenasen [101, 102]. Die Funktion und das Zusammenspiel mit anderen extrazellulären Oxidoreduktasen in den Lignocelluloseabbauwegen sind noch nicht vollständig geklärt.

Zum Abbau von Lignin sekretieren holzzersetzende Basidiomyceten eine große Vielzahl an Oxidoreduktasen, zu denen insbesondere die Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, versatile Peroxidasen und Laccasen zählen. Sie brechen über 1-Elektronenoxidationen die Polymerstruktur des Polyphenols auf [18, 66, 103]. Dabei entstehen aromatische und chinoide Fragmente, die anschließend intrazellulär metabolisiert werden [66]. Oft werden zum gleichen

Zeitpunkt viele Isoenzyme mit unterschiedlichen kinetischen Parametern oder pH-Optima ausgeschüttet, um das Substrat ideal unter variierenden Bedingungen abbauen zu können [7].

Die extrazellulären Lignin abbauenden Peroxidasen gehören der Familie II der Peroxidase-Katalase-Superfamilie an (Kapitel 1.2.1) [48, 49, 104]. Weißfäulepilze enthalten zwischen fünf und 26 Gene lignolytischer Peroxidasen (durchschnittlich 14), von denen oft mehrere zum gleichen Zeitpunkt exprimiert werden [105, 106]. In Genomen von Braunfäulepilzen wurden solche Gene hingegen nicht identifiziert [105]. Peroxidasen dieser Familie tragen eine typische distale Aminosäuretriade aus Arginin, Tryptophan/Phenylalanin und Histidin (Sequenz –X-R-XX-W/F-H-X) und die proximale Triade aus Histidin, Tryptophan/Phenylalanin und Asparaginsäure, deren Aminosäuren in der Proteinsequenz nicht direkt benachbart sind [49]. Die lignolytischen Peroxidasen ähneln anderen Peroxidasen dieser Superfamilie, zu der ebenfalls die in Kapitel 1.2.1 als Modellenzym herangezogene Meerrettichperoxidase zählt. Besonderheiten lignolytischer Peroxidasen aus Basidiomyceten liegen jedoch in der Entfernung des proximalen Histidins zum zentralen Eisenion der Hämgruppe. Dieser Histidinrest ist weiter entfernt als in anderen Peroxidasen, sodass ein verstärkter Elektronenmangel das Redoxpotential des Proteins erhöht [20, 107]. Zudem liegen für diese Peroxidasen spezifische Substratbindestellen vor. Als Beispiel für extrazelluläre Peroxidaseaktivitäten aus Basidiomyceten werden im Folgenden die Manganperoxidasen intensiver beschrieben. Eine Manganperoxidaseaktivität aus *G. applanatum* wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert (Kapitel 5).

Manganperoxidasen (MnP, EC 1.11.1.13) katalysieren hochspezifisch die Umsetzung von Mn^{2+} zu Mn^{3+} und bieten damit eine einzigartige oxidierende Aktivität aus Pilzen [108-110]. Das gebildete Mn^{3+} wird von organischen Säuren, wie Oxalat, Malonat oder Lactat, stabilisiert, sodass das aktive Intermediat ins Holz diffundieren und entfernt vom Enzym bzw. Pilzmyzel oxidativ wirken kann [111, 112]. Der katalytische Mechanismus der MnP unterscheidet sich somit von dem klassischen Modell der HRP (Kapitel 1.2.1) durch das Substrat Mn^{2+} (Abbildung 1.9), die Intermediate des katalytischen Mechanismus entsprechen jedoch dem Modell (vgl. Abbildung 1.3).

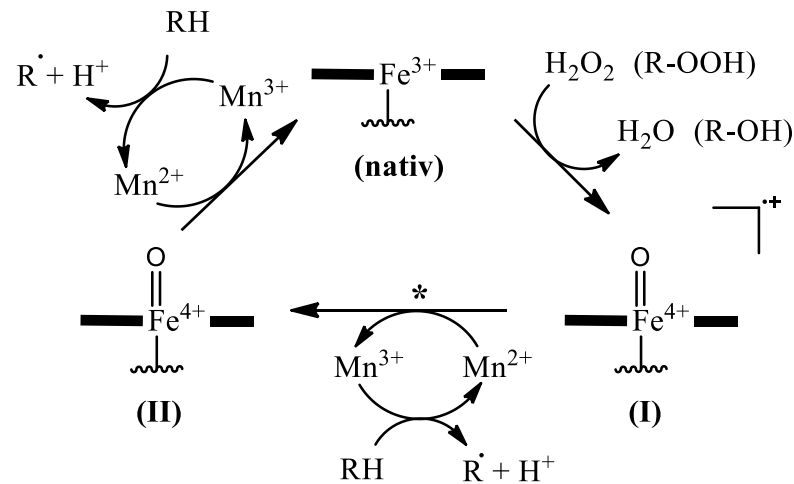


Abbildung 1.9 Katalytischer Mechanismus der Manganperoxidasen (nach [45]). *Reaktion kann auch durch die direkte Oxidation eines Substratmoleküls erfolgen

Neben H_2O_2 können von MnPs auch organische Peroxide als Elektronenakzeptoren herangezogen werden [112]. Die Verbindung I kann entweder von einem Substratmolekül oder durch Mn^{2+} zur Verbindung II reduziert werden. Die Rückbildung des nativen Zustandes aus der Verbindung II kann jedoch fast ausschließlich durch Mn^{2+} erfolgen [45, 111, 113]. Die Manganbindestelle besteht aus zwei oder drei Aminosäureresten, (2x Glu, 1x Asp, [105, 114]) und einer Propanoatgruppe des prosthetischen Häms im Inneren des Enzyms. Elektronen von Mn^{2+} werden dort direkt auf den Cofaktor überführt. Damit Mn^{2+} und andere Substrate an das aktive Zentrum gelangen können, sind ein größerer Häm-Zugangskanal und ein kleinerer Manganbindestelle-Zugangskanal in der Proteinstruktur vorhanden [115, 116]. Strukturveränderungen des Proteins während der Reaktion, vornehmlich durch Umlagerung der manganbindenden Glutaminsäurereste, führen entweder zu einer „open gate“ oder „closed gate“ Konformation des Proteins [115, 117]. Auf diese Weise wird die Bindung von Mn^{2+} oder eine Abkopplung und Diffusion des Mn^{3+} aus dem aktiven Zentrum unterstützt [117].

Nach neuesten Erkenntnissen können Manganperoxidasen anhand der Länge ihres C-Terminus unterschieden werden [116, 118]. Kurze, lange und extralange Manganperoxidasen gehören zu unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen und differieren auch in anderen Bereichen der Sequenzen. Längere C-Termini liegen auf der Außenseite des Enzyms und interagieren dort mit den Zugängen der Kanäle [116]. Manganperoxidasen mit längerem C-Terminus weisen eine verbesserte pH-Stabilität und eine deutlich höhere Aktivität der Mn^{2+} -Oxidation auf. Kurze Manganperoxidasen oxidieren Mn^{2+} zwar langsamer, können jedoch auch alternative Substrate, wie Phenole oder ABTS in einer Mn^{2+} -unabhängigen Reaktion oxidieren [116]. Diese

Klassifizierung der Manganperoxidasen ist jedoch noch recht neu und bedarf weiterer Untersuchungen.

Das natürliche Substratspektrum der Manganperoxidasen ist sehr groß. Monomere und dimere Phenole des Lignins können direkt von Mn^{3+} -Chelaten oxidiert werden, sodass es zur C_{α} - C_{β} Spaltung, C_{α} -Oxidation und weiteren Folgereaktionen kommt [119, 120]. Die häufiger vorkommenden nicht-phenolischen Strukturen des Lignins können hingegen nicht direkt angegriffen werden, sondern müssen über Cooxidationsreaktionen umgesetzt werden. Ungesättigte Fettsäuren wurden als solche Mediatoren identifiziert [45, 121, 122]. Aus ihnen werden über die Zwischenstufe eines Alkylradikals durch Sauerstoffaddition hoch reaktive Peroxylradikale gebildet, die nicht-phenolische Verbindungen angreifen können. Zudem wurde berichtet, dass Mn^{3+} -Carbonsäurechelate miteinander reagieren und ebenfalls Alkylradikale erzeugen können [109, 123, 124]. Diese werden mit der Bildung von Superoxiden in Verbindung gebracht, die wiederum eine Quelle zur Peroxidbildung darstellen. Die vielseitigen Reaktionen von Manganperoxidasen ermöglichen somit einen sehr guten Abbau verschiedenster Substrate, was sie zu interessanten Enzymen für einen biotechnologischen Einsatz macht.

Im Gegensatz zu Manganperoxidasen greifen Ligninperoxidasen (LiP, EC 1.11.1.14) direkt aromatische phenolische und nicht-phenolische Komponenten an [107]. Sogenannte versatile Peroxidasen (VP, EC 1.11.1.16) bilden eine Hybridform der Lignin- und Manganperoxidasen und kombinieren die katalytischen Mechanismen beider Enzyme [100, 107]. Neben Peroxidasen sekretieren Basidiomyceten insbesondere Laccasen (EC 1.10.3.2). Hierbei handelt es sich um kupferhaltige Phenoloxidasen, die eine 1-Elektronenoxidation von Substraten mit einer 4-Elektronenreduktion molekularen Sauerstoffs verbinden [125].

Extrazelluläre Redoxvorgänge der Basidiomyceten sind ein komplexes System gekoppelter Reaktionen, in denen Enzyme aus verschiedenen Unterklassen der Oxidoreduktasen (Kapitel 1.2.1) synergetisch genutzt werden: So stellen unter anderem Arylalkoholoxidasen und Glyoxaloxidasen Wasserstoffperoxid für die Peroxidasereaktionen bereit und nutzen gleichzeitig die Ligninabbauprodukte der Peroxidasen, wie Veratrylalkohol, als Substrate [20, 112]. Phenolische Abbauprodukte des Lignins können außerdem als Mediatoren für Ligninperoxidase- oder Laccasereaktionen dienen und so den Angriff von nicht-phenolischen Komponenten herbeiführen. Diese Mediator-gekoppelten Reaktionen ermöglichen den Umsatz eines großen Substratspektrums und sind für einen biotechnologischen Einsatz interessant

(Kapitel 1.3). Auch der Polysaccharidabbau ist enzymatisch direkt an den Ligninabbau gekoppelt: Glucoseoxidasen stellen Wasserstoffperoxid für Peroxidasereaktionen zur Verfügung und Cellobiosedehydrogenasen können während der Oxidation von Cellobiose eine Vielzahl verschiedener Elektronenakzeptoren reduzieren – darunter Phenole aus dem Ligninabbau, oder Fe^{3+} (vgl. Kapitel 1.2.3) [126]. Die genannten oxidierenden Aktivitäten der holzersetzenen Basidiomyceten sind nur einige Beispiele. Tatsächlich sind bei diesen Vorgängen viele weitere Oxidoreduktasen und Hydrolasen aktiv. Die Komplexität des natürlichen Substrats der Pilze, Holz, führte zur Entstehung dieser Vielfalt enzymatischer Abbaureaktionen, deren großes Potential für einen biotechnologischen Einsatz noch nicht ausgeschöpft wird (Kapitel 1.3).

1.2.3 Niedermolekulare oxidierende Aktivitäten

Holzersetzende Pilze bringen eine weitere besondere Oxidationsmöglichkeit mit sich, um das Problem der Substratverfügbarkeit in Holz zu überwinden. Derartige Vorgänge wurden zwar in der vorliegenden Dissertation nicht näher untersucht, sie werden in diesem Abschnitt jedoch kurz beschrieben, um die vielseitigen Möglichkeiten oxidierender Aktivitäten aus Basidiomyceten darzustellen.

Enzyme können aufgrund ihrer Größe nicht in die enge Struktur des Holzes eindringen, wenn dieses nicht bereits chemisch aufgeschlossen wurde [127-129]. Der erste nicht-enzymatische Abbau der schwer zugänglichen Elemente des Lignocellulosesystems erfolgt somit durch deutlich kleinere Verbindungen. Daraufhin können Enzyme an die Lignin- und Cellulose-reichen Zellwandkompartimente gelangen [130]. Beim chemischen Aufschluss des Holzes erzeugen niedermolekulare Substanzen reaktive Sauerstoffspezies, welche einen unspezifischen, oxidativen Angriff durchführen. Vermutlich kommt es durch Chelatoren zur Reduktion von Eisen oder anderen Metallionen [131, 132]. Die reduzierten Metallionen führen mit Wasserstoffperoxid eine Fenton-ähnliche Reaktion unter Bildung von Hydroxidradikalen durch [132, 133], wie in folgender Gleichung (1) beschrieben.



Neben Wasserstoffperoxid sollen auch organische Peroxide zu einer Fenton-ähnlichen Reaktion führen können [134].

Einige Glycopeptide, Hydrochinone, Hydroxamin- und Phenolderivate wurden bereits als metallreduzierende Agentien aus Pilzen identifiziert [129, 131, 132, 135]. Neben der

metallreduzierenden Aktivität werden diese niedermolekularen Substanzen mit der Umsetzung molekularen Sauerstoffs zu Superoxiden und Hydroperoxiden in Verbindung gebracht. Auf diese Weise können durch sie alle Substrate der Fenton-Reaktion gebildet werden.

Für Braunfäulepilze ist dieses Degradationssystem deutlich häufiger beschrieben. Da ihnen die Fähigkeit zur Produktion der im vorherigen Kapitel beschriebenen Lignin abbauenden Peroxidasen fehlt, scheinen sie diese alternativen Mechanismen für einen Angriff auf das Polyphenol besonders gut ausgebaut zu haben [19]. Dennoch wurden auch in Weißfäulepilzen äquivalente Metabolite gefunden [129, 131, 136, 137]. Für solche Aktivitäten sind insbesondere Weißfäulepilze, die selektiv Lignin abbauen und nicht einen simultanen Abbau aller Holzkomponenten durchführen, bekannt.

Diese komplexen Vorgänge verdeutlichen die Vielseitigkeit oxidierender Aktivitäten aus Basidiomyceten: Sie bieten ein weites Spektrum interessanter enzymatischer und nicht-enzymatischer Aktivitäten, die für eine biotechnologische Applikation großes Potential bieten. Auf einige Applikationsmöglichkeiten wird im kommenden Kapitel eingegangen.

1.3 Biotechnologische Applikation von Pilzen und Enzymen

1.3.1 Oxidierende Enzyme als Biokatalysatoren in der organischen Synthese

Der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren wurde bereits in vielen industriellen Prozessen etabliert. Vor allem Hydrolasen, wie Peptidasen, Glykosidasen und Esterasen werden bereits in großem Maßstab, z.B. in der Waschmittel- und Backwarenindustrie, genutzt [36, 138, 139]. Oxidoreduktasen werden hingegen seltener eingesetzt, sind aber insbesondere für die organische Synthese von großem Interesse [36, 40, 138]. 80 % aller chemischen Prozesse werden von Katalysatoren unterstützt [36]. Enzyme bieten hierbei vielseitige Möglichkeiten, diese Prozesse unter mildereren Bedingungen (pH, Temperatur) und in wässrigen Systemen durchzuführen [36, 39]. Insbesondere die Chemo-, Regio- und Enantioselektivität von Enzymen kann die Anzahl an Syntheseschritten und somit Prozesskosten deutlich verringern, da meist keine Schutzgruppen angebracht und entfernt werden müssen [66]. Durch diese Vorteile können Enzyme sowohl aus umwelttechnologischer Sicht („*Green Chemistry*“) als auch zur Prozessoptimierung und Kostenverringerung eine interessante Alternative zu chemischen Katalysatoren bieten [40, 66, 140].

Bei der Synthese von Naturstoffen ist eine Oxyfunktionalisierung sehr häufig ausschlaggebend für die gewünschte Bioaktivität des Produktes [141]. Oxidoreduktasen vermögen es, Positionen

eines Moleküls zu oxygenieren, die für chemische Synthesen schwer angreifbar sind. Hierfür sind insbesondere Oxygenasen verantwortlich, die in Kapitel 1.2.1 intensiv besprochen wurden. Hydroxylierungen, Sulfoxxygenierungen, Bayer-Villiger Oxidationen und Epoxidierungen gehören zu den am häufigsten technologisch genutzten Reaktionen der Oxygenasen [62].

Ein anschauliches Beispiel ist die Hydroxylierung von L-Isoleucin. Durch eine stereoselektive Einführung von Sauerstoff am C4 der ubiquitär vorkommenden Aminosäure wird ein pharmakologisch hoch interessantes Produkt erzeugt: (2*S*,3*R*,4*S*)-Hydroxyisoleucin, ein Therapeutikum für Diabetespatienten [142]. Chemische Synthesewege aus unterschiedlichen Vorläufern benötigen 6 bzw. 8 Schritte [143, 144], während über eine Dioxygenase aus *B. thuringiensis* aus L-Isoleucin in nur einem Schritt ein enantiomerenreines Produkt erzeugt werden kann (Abbildung 1.10) [142, 145]. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben (vgl. Abbildung 1.8). Zusätzlich zu den Edukten benötigt sie Eisen als Cofaktor, und ein Zusatz von Ascorbinsäure fördert die Reaktion [142].

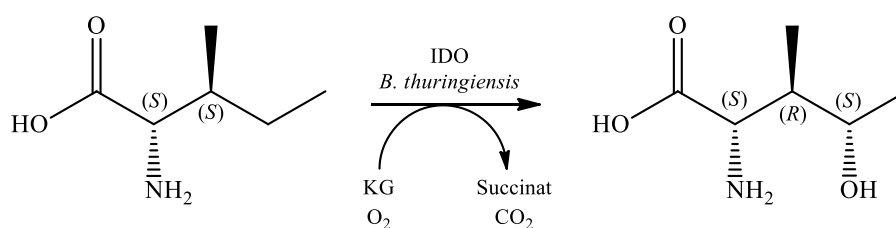


Abbildung 1.10 Stereoselektive Herstellung von 4-Hydroxyisoleucin durch eine α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase aus *B. thuringiensis* (nach [142]).

Häufig ist ein biotechnologischer Einsatz der Oxygenasen bisher jedoch noch limitiert, da viele dieser Enzyme membranständig produziert werden, instabil sind oder teure Cofaktoren in großen Maßstäben benötigen [62, 146]. Ganzzell-Systeme sind eine Möglichkeit, diese Einschränkungen zu umgehen [62, 147]. Ein direkter Einsatz von Enzymen wird jedoch präferiert, sodass in den letzten Jahren intensiv an enzymatischen Prozessen zum Recycling von Cofaktoren geforscht wurde [148]. Dehydrogenasen, wie die Formiatdehydrogenase, können mittlerweile zur kontinuierlichen Regeneration von NAD(P)⁺ durch eine Kopplung der Enzymreaktionen herangezogen werden [36, 148].

Pilze wurden ausführlich für vielseitige Biotransformationsmöglichkeiten charakterisiert und zeigen ein großes Potential für einen biotechnologischen Einsatz [141]. In der Lebensmittelindustrie werden einige Pilze, die den sogenannten GRAS-Status („Generally

Recognized As Safe“) der *US Food and Drug Administration* erhalten haben, bereits großtechnisch produziert und genutzt [149]. Sowohl ihre Biomasse (Bsp. *Fusarium venetatum*, *Saccharomyces cerevisiae*) als auch Zusatzstoffe aus diesen Pilzen – hauptsächlich hydrolytische Enzyme (Bsp. Amylasen, Cellulasen) und Säuren (Bsp. Citronensäure) – sind von Interesse [149-151]. Durch ihre biochemischen Abwehrmechanismen gegen pflanzliche Sekundärmetabolite besitzen Pilze außerdem vielseitige Möglichkeiten, stereoselektive Oxygenierungsreaktionen durchzuführen [141, 152]. Hierzu zählen unter anderem die 11 β -Hydroxylierung von Steroiden für die pharmazeutische Industrie, oder eine Oxygenierung von Terpenen zur Produktion von Aromakomponenten für die Lebensmittelchemie (siehe Kapitel 1.3.3) [141]. Allerdings handelt es sich bei den für solche Biotransformationen industriell genutzten Pilzen bisher fast ausschließlich um Hefen und Schimmelpilze [141, 150]. Holzzersetzende Basidiomyceten rückten erst im Laufe der letzten Jahre intensiver in den Fokus biotechnologischer Forschung und wurden vornehmlich für einen Einsatz zum Abbau organischer Substanzen charakterisiert [153, 154] (Kapitel 1.3.2). Im Rahmen eines von der Europäischen Union geförderten Projektes „*PEROXICATS*“ zeigte sich jedoch auch ein sehr hohes Potential von Enzymen der Basidiomyceten für den Einsatz als spezifische Redox-Biokatalysatoren in der organischen Synthese [138]. Peroxygenasen, vornehmlich aus dem Pilz *Agrocybe aegerita*, wurden für eine spezifische Hydroxylierung von Aromaten und Aliphaten herangezogen [155, 156]. Sie haben große Vorteile gegenüber anderen Oxygenasen, da sie in den Extrazellulärraum sekretiert werden, keine Flavin-Untereinheit und andere Cofaktoren benötigen und somit autark arbeiten können [138]. Um das Potential der holzzersetzenden Pilze für die Synthese von Naturstoffen ausschöpfen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

1.3.2 Biotechnologische Applikation lignolytischer Enzyme aus Basidiomyceten zum Abbau organischer Substanzen

Durch die vielen unspezifischen Reaktionen der lignolytischen Enzyme aus Basidiomyceten kann ein breites Spektrum an Substraten umgesetzt werden [157]. Aus diesem Grund wird der Einsatz von Holzfäulepilzen bereits in vielen industriellen Zweigen erforscht, insbesondere unter umwelttechnologischen Aspekten [153, 154, 158].

Die Papierindustrie kann Weißfäulepilze und ihre Enzyme zum Beispiel in zweifacher Hinsicht nutzen [153, 154]. Zum einen können lignolytische Enzyme an ihrem eigentlichen Substrat agieren, denn bei der Vorbereitung des Holzes zur Papierherstellung ist ein Abbau des Lignins

notwendig. Durch einen biologischen Aufschluss der Ligninstrukturen können Weißfäulepilze den Einsatz alkalischer Chemikalien während dieses Prozesses reduzieren [159]. Zum anderen entstehen in der Holzverarbeitenden Industrie große Mengen an Abfallprodukten, wie Harzsäuren, Triglyceride und andere lipophile Komponenten. Sie bilden teerartige Flüssigkeiten, die sowohl technische Probleme (Ablagerung an Maschinen) erzeugen, als auch die Umwelt schädigen können (Toxizität für Wasserorganismen) [154, 160, 161]. Durch Umsetzung des Holzes mit Weißfäulepilzen oder durch gezielten Einsatz eines Laccase-Mediator-Systems können diese Abfallprodukte deutlich reduziert werden [162, 163].

Auf ähnliche Weise können Basidiomyceten bei der Herstellung von Bioethanol eingesetzt werden: Durch einen enzymatischen Abbau der Lignocellulose können kostenaufwändige und umweltschädliche chemische und physikalische Prozesse ersetzt werden [164]. Gleichzeitig entstehen bei der Bioethanolproduktion große Mengen an Vinasse, einer Flüssigkeit, die Melanoidine, Zuckerreste und Metallionen enthält. Durch Reduktion des pH-Wertes und Verminderung des Lichteinfalls kann dieses Abwasser einen schädlichen Einfluss auf das Ökosystem eines Flusses haben und muss entsprechend dekontaminiert werden [165]. Peroxidasen und Laccasen aus Weißfäulepilzen bieten ein hohes Potential als Katalysatoren zum Abbau der Melanoidine und Zuckerreste und somit zur Entfärbung des Abwassers [166].

Die Einsatzmöglichkeiten von Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen und Laccasen gehen weit über die bisher genannten Möglichkeiten hinaus. Sie können zur Umsetzung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe [167], synthetischer Farbstoffe [112, 168, 169], chlorhaltiger Phenole [170, 171] und vieler weiterer Stoffe herangezogen werden und so zur Detoxifikation industrieller Abfälle und Abwässer beitragen [153, 154].

Das Potential zum Abbau organischer Substanzen durch holzzersetzende Basidiomyceten ist somit bekannt. Eine Applikation scheint auch für viele Verbindungen vielversprechend, die nicht dem natürlichen Substratspektrum der Pilze entsprechen. Eine Herausforderung für zukünftige Forschung ist nun, diese Möglichkeiten für die Industrie weiterzuentwickeln und weitere Applikationsmöglichkeiten zu identifizieren [153]. Ferner müssen die Basidiomyceten oder ihre lignolytischen Enzyme effizient kultiviert oder heterolog produziert werden können. Zudem erfordern die Prozesse eine exakte Auswahl und Kombination der Enzyme sowie Optimierung der Enzymeigenschaften, um an Effizienz zu gewinnen und eine industrielle Anwendung kostengünstig zu ermöglichen [138, 154].

1.3.3 Aromaproduktion durch Pilze

Pilze produzieren eine Vielzahl flüchtiger Komponenten, deren biologische Aktivität oft noch nicht genau erforscht ist [172]. Einige flüchtige Verbindungen zeigen jedoch auch intensive Aromaeigenschaften, die schon seit langem das Interesse der Lebensmittel- und Duftstoffindustrie wecken [172, 173]. Pilze besitzen einen Pflanzen-ähnlichen Sekundärmetabolismus, der die *de novo* Synthese von Aromastoffen ermöglicht [174-176]. Aus diesem Grund sind ihre Fruchtkörper oft ein attraktives Lebensmittel mit sehr unterschiedlichen Geschmacks- und Geruchseigenschaften. Zum anderen kann ihr weites Enzymspektrum auch zur Biotransformation von Vorläufermolekülen herangezogen werden [177]. In der Lebensmittelindustrie trägt eine Fermentation durch Pilze zum typischen Aromaeindruck einiger Produkte bei, so zum Beispiel bei Blau- und Weißschimmelkäse [172, 173].

Eine biotechnologische Aromaproduktion, beispielsweise durch Pilze, weist gegenüber der Chemosynthese der Stoffe einige Vorteile auf [141, 177]. Wird ein Aromastoff über physikalische, enzymatische oder mikrobielle Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Ausgangsstoffen produziert und kann in der Natur nachgewiesen werden, gilt er laut Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 der Europäischen Union als „natürlich“ [178]. Auch biotechnologisch erzeugte Aromastoffe aus entsprechenden Vorläufern können somit als „natürlich“ gekennzeichnet werden – eine Eigenschaft, die in einer zunehmend chemophoben Gesellschaft äußerst wichtig ist [177, 179, 180]. Die Ausbeute der gleichen Verbindungen bei einer Extraktion aus ihren natürlichen Quellen ist meist deutlich geringer, sodass eine biotechnologische Produktion die Kosten der Aromastoffe verringert [176, 177]. Insbesondere der Ersatz thermischer Prozesse durch einen kalten Prozess, z.B. zur Bildung von Maillardprodukten, ist von gesundheitlicher Relevanz, da unter Hitzeeinfluss unerwünschte Nebenprodukte wie heterocyclische Amine gebildet werden können [181].

Es sind bereits Verfahren zur Biosynthese von Aromastoffen durch Pilze bekannt [177, 180]. Der Basidiomycet *Nidula niveo-tomentosa* setzt zum Beispiel die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in ein Keton mit Himbeeraroma (4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on) um [182]. In der Himbeere ist diese Verbindung nur in äußerst geringer Konzentration vorhanden, sodass eine biotechnologische Produktion des natürlichen Aromastoffes von großem Vorteil ist [176, 182]. Die oxidative Spaltung von β,β -Carotin durch verschiedene Basidiomyceten kann hingegen zur Bildung von β -Ionon führen, einem Aromastoff mit intensiv blumigem Veilchenduft, der sonst in ätherischen Pflanzenölen gefunden werden kann [183, 184]. Andere

Basidiomyceten verursachen eine Oxyfunktionalisierung von Terpenen, was weitere, interessante Aromastoffe erzeugen kann. Hierzu zählen unter anderem das Citrusaroma Perillen [185], das Minzaroma Verbenol [186] oder die nach Grapefruit riechende Verbindung Nootkaton [187]. All diese Beispiele beruhen auf oxidierenden enzymatischen Aktivitäten (Peroxidasen oder Oxygenasen) der Pilze.

In Kulturen des Basidiomyceten *L. sulphureus* wurden ebenfalls oxidierende Aktivitäten bei der Entstehung des sehr potenten Aromastoffs 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (Sotolon) vermutet [188]. Ein chemischer Geneseweg konnte bisher jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Sotolon verursacht ein intensiv würziges, curry-ähnliches Aroma und wurde unter anderem in Liebstöckel [189] und Bockshornkleesamen [190], aber auch in fermentierten Lebensmitteln, wie Sojasoße [191] und Wein [192] nachgewiesen. Das Hydroxyfuranon trägt am C5-Atom ein Chiralitätszentrum (Abbildung 1.11), das sich auf die Intensität des Geruchs auswirkt: (S)-Sotolon zeigte im Vergleich zu (R)-Sotolon einen 100-fach niedrigeren Schwellenwert in 12 %iger ethanolischer Lösung [193]. Es wurden bereits einige verschiedene Genesewege für Sotolon postuliert, so zum Beispiel aus Ascorbinsäure in Citrusgetränken [194] oder aus Threonin während der Lagerung von Wein und Sake [192]. Im Falle des *L. sulphureus* wurde eine Entstehung über 4-Hydroxyisoleucin mittels enzymatischer Hydroxylierung vermutet

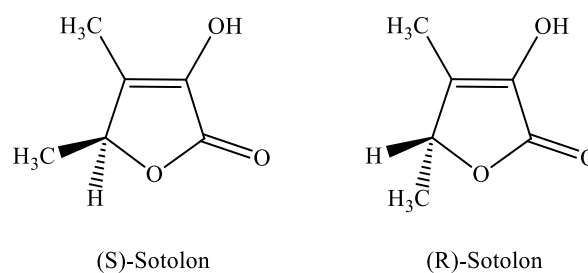


Abbildung 1.11 Enantiomere von 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (Sotolon)

[188], wie in Bockshornklee bereits beschrieben [195]. Die Aufklärung dieses oxidativen Genesewegs ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Dissertation (Kapitel 3).

1.3.4 Enzyme in Waschmitteln

Bereits seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts besteht die Idee, Enzyme in Waschmitteln einzusetzen, um einen textilschonenden Abbau spezifischer Verschmutzungen zu ermöglichen [196, 197]. Heute erfolgen 34 % der Weltenzymproduktion für einen Zusatz in Wasch- und Reinigungsmitteln [197]. Anwendung finden Peptidasen, Amylasen und Lipasen zur Entfernung von protein- oder stärkehaltigen Schmutz bzw. von Fetten [196, 198], sowie Cellulasen zum Abbau von Mikrofasern an Baumwollkleidung und somit zur Glättung des Stoffes [199]. Neuerlich werden außerdem Mannasen eingesetzt, um die Flecken der als Verdickungsmittel in Lebensmitteln und Kosmetika eingesetzten Galactomannane umzusetzen

[200]. Durch die enzymatische Hydrolyse der Schmutzpartikel werden kleinere Stoffe gelöst, die anschließend von den Detergenzien gebunden und aus der Kleidung entfernt werden können.

Enzyme müssen für einen Waschprozess besondere Eigenschaften besitzen: Zum einen sollen sie die Wascheffizienz schon bei geringen Temperaturen ab 15 °C verbessern, aber auch bei Temperaturen bis 60 °C eine hohe Aktivität aufweisen. Ferner ist ein pH-Optimum im alkalischen (pH 9-11), gute Aktivität in anionensidhaltigem Medium und eine Stabilität gegenüber oxidierenden Waschmittelbestandteilen vonnöten [197]. Erst die Möglichkeiten moderner Gentechnik führten zu den heute hoch effizienten und umweltschonenden Waschmitteln. Durch *Protein engineering* können die Stabilität, Aktivität und Substratspezifität der Enzyme gezielt einer Applikation im Waschmittel angepasst werden [197, 198]. Auf diese Weise ermöglicht die Enzymzugabe mittlerweile gleichbleibende Waschqualität bei niedrigeren Temperaturen (ab 20 °C) und Einsatz deutlich geringerer Waschmittelmengen [196, 197].

Oxidierende Enzyme sind bisher (noch) nicht Teil der Waschmittelrezeptur, ihre Applikation befindet sich in der Erforschungsphase [196]. Sie gelten als interessant für eine Unterstützung der Bleichwirkung. Flecken von Farbstoffen, wie Anthocyanen, Chlorophyll und Carotinoiden aus Früchten und Gemüse, oder andere farbige Stoffe mit ausgedehnten Systemen konjugierter Doppelbindungen können nicht allein durch Detergenzien ausgewaschen werden [196]. Sie müssen über oxidative Reaktionen abgebaut werden. Hierfür werden bisher chemische Bleichmittel wie Natriumpercarbonat eingesetzt, welches im Wasser zu Natriumcarbonat und Wasserstoffperoxid zerfällt. H_2O_2 kann unter Hitzeaktivierung Doppelbindungen angreifen und Farbstoffe spalten. Enzyme könnten diese Vorgänge schon bei geringeren Temperaturen durchführen. Auch die in vorigen Kapiteln beschriebenen oxidierenden Aktivitäten aus Basidiomyceten stellen eine vielversprechende potentielle Lösung dar. In Kapitel 5 wird eine im Rahmen dieser Arbeit identifizierte neue Möglichkeit beschrieben.

1.4 Zielsetzung

In den einleitenden Kapiteln wurden umfangreiche Möglichkeiten oxidierender Enzymaktivitäten und ihr Potential für eine biotechnologische Applikation dargelegt. Der Einsatz oxidierender Enzyme aus Basidiomyceten ist noch selten, erscheint jedoch sehr vielversprechend. Die vorliegende Dissertation diene aus diesem Grund der Identifikation neuer Aktivitäten aus diesem vielseitigen Spektrum. Die Forschung stütze sich auf Vorarbeiten zu zwei Holzfäulepilzen:

In Kulturen des *L. sulphureus* wurde Sotolon als Aromastoff identifiziert. Erste Vorversuche führten zu der Vermutung, dass seine Biogenese über eine enzymatische Hydroxylierung der Aminosäure L-Isoleucin verläuft (Kapitel 1.3.3). Eine chemische Genese konnte bisher jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sollte der Biosyntheseweg der Aromakomponente im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Es galt, die Existenz eines hydroxylierenden Enzyms in *L. sulphureus* zu beweisen. Erst eine Antwort auf diese fundamentale Frage ermöglicht zukünftige Arbeiten zur Identifikation des potentiellen Enzyms.

Hinweise auf eine zweite vielversprechende Aktivität wurde im Rahmen eines Screenings entdeckt, das einen Abbau von β -Carotin durch mehrere Basidiomyceten untersuchte (Kapitel 1.3.3). Der Basidiomycet *G. applanatum* verursachte eine deutliche Entfärbung des Carotins. Wie in Kapitel 1.3.4 erläutert, ist der Abbau von Farbstoffen durch oxidierende Enzyme eine wünschenswerte Ergänzung zur Wirkweise von Waschmitteln. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese enzymatische Aktivität des *G. applanatum* identifiziert werden. Das Enzym sollte anschließend hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften und einer möglichen Applikation im Waschmittel charakterisiert werden.

Die vorliegende Dissertation diene somit einer Entschlüsselung dieser zwei interessanten oxidierenden Aktivitäten aus Holzfäulepilzen.

2 Vorwort zur Publikation „Isotope labelling experiments on the formation pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from L-isoleucine in cultures of *Laetiporus sulphureus*”

Im Zuge einer Charakterisierung des Aromaspektrums von Oberflächenkulturen des *L. sulphureus* wurde eine Vielzahl an Furanonen unter den flüchtigen Komponenten nachgewiesen. Zu dieser Gruppe zählte auch Sotolon, ein intensiv würzig riechender Aromastoff mit geringen Schwellenwerten (Kapitel 1.3.3). Zudem konnten Spuren von 4-Hydroxyisoleucin im Kulturmedium detektiert und ein Geneseweg des Stoffes über diese Verbindung postuliert werden. Ein derartiger Biosyntheseweg des Aromastoffs in *L. sulphureus* ist in zweierlei Hinsicht interessant:

Ein kalter Prozess zur Aromaproduktion mithilfe des Pilzes könnte eine zielgerichtete Genese ohne unerwünschte oder sogar gesundheitsschädliche Nebenprodukte ermöglichen und birgt somit potentielle Vorteile gegenüber thermischen Prozessen. Zudem führen enzymatische Reaktionen oft zu einem Enantiomerenüberschuss – die Konfiguration des Sotolons ist ausschlaggebend für den Schwellenwert (Kapitel 1.3.3). Wird der Geneseweg des Stoffes aufgeklärt, könnte er für eine biotechnologische Aromaproduktion optimiert werden und somit eine Alternative für herkömmliche Extraktionen des natürlichen Aromastoffs bieten.

Doch nicht nur der Aromastoff, sondern insbesondere das postulierte Zwischenprodukt 4-Hydroxyisoleucin weckte das Interesse für weitere Forschungen. Bei diesem potentiellen Intermediat handelt es sich um einen Insulinmodulator, der für die Behandlung von Diabetes eingesetzt werden kann (Kapitel 1.3.1). Bisher sind einzig α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen aus wenigen Organismen für diese Reaktion bekannt (vgl. Kapitel 1.2.1 und 1.3.1). Eine neuartige Enzymaktivität, die zur Herstellung der nicht-proteinogenen Aminosäure führen könnte, ist daher für die pharmazeutische Industrie von Bedeutung.

Es galt somit zu klären, ob tatsächlich eine oxidierende enzymatische Aktivität im Verlaufe der Sotolonproduktion in *L. sulphureus* zu einer Hydroxylierungsreaktion führt, über welche Zwischenschritte der Aromastoff generiert wird und ob eine chemische Reaktion als Oxygenierungsschritt ausgeschlossen werden kann. Hierzu wurden markierte Vorläuferstudien mit ^{13}C -Isoleucin und ^{18}O -Wasser herangezogen.

3 Isotope labelling experiments on the formation pathway of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone from L-isoleucine in cultures of *Laetiporus sulphureus*

Reproduced from Flavour and Fragrance Journal, **2014**, 29(4), p. 233-239.

with permission from John Wiley & Sons

© 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

3.1 Abstract

Sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone) imparts a strong seasoning odour reminiscent of meat broth. Previous work indicated a formation via L-4-hydroxyisoleucine in surface cultures of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* grown on wheat gluten, but an enzymatic hydroxylation of L-isoleucine was not proven. ¹³C-Labelled L-leucine, L-isoleucine and ¹⁸O-water were used to elucidate the metabolism of the amino acids and proved the existence of an oxygenase activity in the pathway to sotolon. L-Isoleucine was converted into the corresponding α -keto acid and then oxygenated in the C4-position to give 4-hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoic acid, the direct precursor of sotolon. A similar biotransformation was not observed for L-leucine. The results provide insight into the cold formation of a potent flavour compound previously associated with the thermal processing of food.

Key words: sotolon, *Laetiporus sulphureus*, L-isoleucine-U-¹³C, L-leucine-2-¹³C, biogenesis

3.2 Introduction

Some hydroxyfuranones are powerful odorants which occur ubiquitously in heated and processed foodstuff. In contrast to other furanones, no benzenoid analogues are described for hydroxyfuranones [201], making them unique flavouring materials. The best-known hydroxyfuranone is 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone with a strawberry-like aroma, which can be found in numerous fruits. In contrast, the γ -lactones sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone) and emoxyfuranone (5-ethyl-4-methyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone) impart nutty, meaty and seasoning-like odour impressions. Flavour threshold values of sotolon were often described in wine and vary between 2.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (in model wine solution [202]) and

19 $\mu\text{g l}^{-1}$ (in port wine [203]). The odour intensity of both enantiomers is very different: The perception threshold of (*R*)-sotolon was determined to be 89 $\mu\text{g l}^{-1}$, whereas the threshold of (*S*)-sotolon was significantly lower with 0.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ (both determined in model wine solution [193]). Several precursors of sotolon have already been proposed. In wine and sake, degradation products of L-threonine resulted in the formation of sotolon [192], whereas ascorbic acid and ethanol were found to be the precursors in citrus soft drinks [194]. Besides, plant sources of sotolon, such as fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) and lovage (*Levisticum officinale*) were investigated [189, 204, 205]. In fenugreek seeds, the lactone originated from a rather uncommon metabolite of L-isoleucine, L-4-hydroxyisoleucine, which spontaneously formed sotolon through thermal deamination [195]. The non-proteinogenic amino acid resulted directly from a dioxygenase catalysed hydroxylation of L-isoleucine in the presence of 2-oxoglutarate and Fe(II) [206]. Recently, koji-like cultures of *L. sulphureus* were described as another natural source of sotolon. Trace amounts of L-4-hydroxyisoleucine were also found in the fungal cultures [188]. Therefore, a biogenesis of sotolon *via* bioconversion of L-isoleucine was assumed. Alongside the formation of a natural flavour compound the identification of the respective enzymatic activity forming L-4-hydroxyisoleucine would be of outstanding interest because of the insulin modulating effect of the non-proteinogenic amino acid [207]. Additionally, further O-heterocycles and hydroxylated metabolites were found in cultures of *L. sulphureus*. This study elucidated the formation of sotolon and other O-heterocycles along a putative enzymatic hydroxylation of methyl-branched amino acids using labelled precursors.

3.3 Experimental

3.3.1 Materials

Amino acids were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Steinheim, Germany) or Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone), 3-methyl-2-oxopentanoic acid sodium salt, and cyclopentanol (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Steinheim, Germany) and cyclohexanol (99 %) from Merck (Darmstadt, Germany). 3-Hydroxy-3-methylbutanoic acid was ordered from abcr (Karlsruhe, Germany), L-leucine-2- ^{13}C (>99.8%) from CAMPRO Scientific GmbH (Berlin, Germany), L-isoleucine-U- $^{13}\text{C}_6$ (95%+) and ^{18}O -Water (97%) from Euriso-TOP GmbH (Saarbrücken, Germany). Dichloromethane

(Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was distilled before use. All other chemicals used were of analytical grade.

3.3.2 Cultivation of *Laetiporus sulphureus*

Pre-cultures of *L. sulphureus* were grown in rich standard nutrient medium (rSNL) (30 g l⁻¹ glucose monohydrate, 9 g l⁻¹ yeast extract, 4.5 g l⁻¹ L-asparagine monohydrate, 0.5 g l⁻¹ MgSO₄, 1.5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 ml trace element solution, pH 6.0) at 150 rpm and 28 °C for 10 days. 25 ml of pre-culture was centrifuged (5000 × g, 4 °C) and the inocula for the main cultures washed with 30 ml of sterile water to eliminate an interfering carry-over of amino acids. Cell pellets were re-suspended with 100 ml minimal medium (10-30 mmol l⁻¹ amino acid(s), 10 g l⁻¹ glucose monohydrate; 0.5 g l⁻¹ MgSO₄, 1.5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 20 mg l⁻¹ vitamin B₁, 1 ml trace element solution, pH 6.0) and used for inoculation of the main cultures. To prevent heat degradation, the amino acid solutions were sterile filtered. Other components of the medium were autoclaved (120 °C, 20 min). The fungus was grown with different amino acid supplementation at 28 °C and 150 rpm for 3 weeks. First, different amino acids were tested in triplets (10 mM each; a: L-isoleucine, L-serine, L-arginine; b: L-leucine, L-histidine, L-glutamine; c: L-valine, L-asparagine, L-lysine; d: glycine, L-threonine, L-glutamic acid; e: L-alanine, L-phenylalanine, f: L-tryptophan, L-aspartic acid, L-methionine; g: L-tyrosine, L-cysteine). Afterwards, selective amino acids were supplemented singly (10-30 mM).

3.3.3 HPLC of Amino Acids

Ten microlitres of supernatant (diluted with water) were mixed with 110 µl of borate buffer and 20 µl OPA-Reagent (*ortho*-phthalaldehyde). The reaction was carried out at room temperature for 2 min and stopped with 50 µl acetic acid (1 M). Twenty microlitres of sample were injected into the HPLC system (Shimadzu GmbH, Duisburg, Germany). Amino acids were separated on a Nucleodur C18 Pyramid column (5 µm, 250 cm × 4 mm; Macherey-Nagel, Düren, Germany) at 40 °C using a gradient of methanol (A) and sodium acetate buffer (B; 0.1 M sodium acetate and 0.044% triethylamine, pH 6.5): 10 % A (5 min), 15 % A (5-8 min), 60 % A (8-40 min), 100 % A (45 min), 100 % A (50 min), 10 % A (50-55 min), 10 % A (60 min) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Detection was performed using a RF-10A XL fluorescence detector (excitation 330 nm; emission 460 nm).

3.3.4 HPLC-MS²

In the supernatant L-4-hydroxyisoleucine was identified *via* HPLC-MS as described elsewhere [188]. In brief: A Varian HPLC 212-LC coupled to a 320-MS Triple Quad LC-MS² was used in the ESI-positive mode: capillary, 30 V; needle voltage, 5000 V; nebulizer gas, 379 kPa at 50 °C; drying gas, 124 kPa at 200 °C; and argon at 200 mPa and 15 V collision energy. A Phenomenex 2.6 µRP-18 phase (100 × 4.6 mm), a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ and ammonium acetate instead of sodium acetate was used with the same gradient mentioned above.

3.3.5 GC-FID and GC-MS of Volatiles

After ~3 weeks of cultivation, cells were harvested from supernatant by centrifugation ((5000 × g, 4 °C, 15 min). The supernatant was then extracted with 3 x 30 ml of dichloromethane. The organic phases were combined, dried (Na₂SO₄) and concentrated to ~1 ml using a Vigreux column. One microlitre of sample was injected on column either in the GC-FID or GC-MS device.

GC-FID was performed using an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a cool on-column injection port to avoid thermal formation of flavour compounds, especially sotolon, a 30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness CPWax52 CB column (Varian, Darmstadt, Germany) and hydrogen as carrier gas (2 ml min⁻¹). The oven temperature was held at 40 °C for 3 min, raised at 3 °C min⁻¹ to 230 °C and held for 10 min. Volatiles were detected using flame ionization detection (FID; at 250 °C). For GC-O analysis, the end of the analytical column was split 1:1 and volatiles were detected on an odour detection port (ODP, 220°C) or *via* FID as mentioned above.

GC-MS was carried out on a Fisons GC 8000 gas chromatograph connected to a Fisons MD 800 mass selective detector (interface, 230 °C; ion source, 200 °C; quadrupole, 100 °C; EI ionization (70 eV); scan range, *m/z* 33–300 amu) equipped with a cool on-column injector, a Zebron ZB-WAX (Phenomenex, USA) fused silica capillary column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and helium (38 cm s⁻¹) as the carrier gas and the same temperature programs as for the GC-FID). Mass spectra were compared to those of digital libraries (Wiley 08/NIST08, 2008) or spectra of authentic standard compounds.

3.3.6 ^{18}O -Water Supplementation

Cultivation of *L. sulphureus* in ^{18}O -water was carried out in 4 ml of culture liquid. Two gram of ^{18}O -water and a concentration of 20 mmol l⁻¹ of 3-methyl-2-oxopentanoic acid sodium salt were added to the minimal medium. For extraction of sotolon, cells were removed via centrifugation and the medium extracted with 3 × 3 ml of dichloromethane. The organic phases were combined, dried (Na₂SO₄_{sicc}) and concentrated to ~0.5 ml. One microlitre of sample was analysed via GC-MS as described before.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Cultivation of *L. sulphureus* in Minimal Medium

A screening for volatile compounds, created through the amino acid metabolism of *L. sulphureus*, was carried out. Different amino acids were added to minimal medium. In order to ensure a vital submerged culture, pre-cultures were grown for ten days in rich standard nutrient liquid medium. The growth of the main cultures was improved by the addition of thiamin to the minimal medium at an elevated cultivation temperature of 28 °C (data not shown).

All proteinogenic amino acids except L-proline were included in this screening. For the sake of reducing the number of experiments the amino acids were fed in triplets in a first series. For those triplets which resulted in noticeable sensorial changes, amino acids were then supplemented as a single precursor. Even though several amino acids were effectively degraded by the growing basidiomycete as monitored *via* HPLC (data not shown), cultures supplemented with the branched aliphatic amino acids L-leucine and L-isoleucine imparted a particularly strong odour. Whereas the degradation of L-leucine led to a cheesy-condimental flavour, culture supernatant and the dichloromethane extracts of cultures supplemented with L-isoleucine exhibited the characteristic strong seasoning, curry-like odour of (*S*)-sotolon. Therefore, cultures of *L. sulphureus* were grown in minimal media solely supplemented with L-leucine or L-isoleucine, respectively, and analysed by means of GC-FID, GC-O and GC-MS.

Comparing the overall aroma impression and GC-O/FID data of those cultures with non-supplemented cultures proved that the emerging odour of the cultures originated from direct metabolites of the amino acids added. In cultures supplemented with L-leucine small aliphatic acids such as 3-methylbutanoic, 3-methyl-3-butenic and 3-hydroxy-3-methylbutanoic acid were identified as cheesy, savoury compounds *via* GC-O. Even though some respective acids

were also found in cultures supplemented with L-isoleucine, the intense odour of sotolon superimposed the cheesy olfactory impression. In addition to the aliphatic acids, O-heterocycles were found in both samples, as illustrated in Figure 3.1.

Lactones **1-3** were tentatively identified according to their respective RI and EI mass spectra in all cultures supplemented with different amino acids, indicating a genesis independent of amino acid supplementation. Addition of pantothenic acid (3-(2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutanamido)-propanoic acid) to minimal medium without inoculation confirmed a chemical formation of 3-hydroxy-4,4-dimethyl-dihydro-2(3H)-furanone (pantolactone, 1) after a few days of incubation under cultivation conditions (28 °C, 150 rpm). On the contrary, the formation of heterocycles 4-8 depended on the supplementation of L-leucine and L-isoleucine, respectively. Further investigation of the metabolism leading to the formation of these O-heterocycles was performed using ¹³C-labelled precursors.

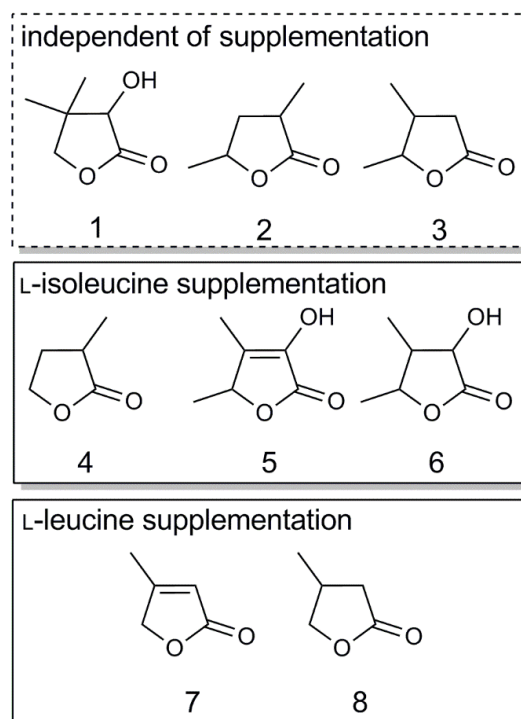


Figure 3.1 O-heterocycles produced in cultures of *L. sulphureus* (1: pantolactone, 2: 3,5-dimethyl-dihydro-2(3H)-furanone, 3: 4,5-dimethyl-dihydro-2(3H)-furanone, 4: 3-methyl-dihydro-2(3H)-furanone, 5: sotolon, 6: 3-hydroxy-4,5-dimethyl-dihydro-2(5H)-furanone, 7: 4-methyl-2(5H)-furanone, 8: 4-methyl-dihydro-2(3H)-furanone)

3.4.2 Metabolism of Aliphatic Amino Acids in Cultures of *L. sulphureus*

2-¹³C-L-leucine was used to confirm direct metabolites of the amino acid in the volatile fractions of cultures supplemented. Metabolites carrying the labelled isotope are highlighted in Table 3.1. They were easily identified according to their respective mass spectra since their molecular and respective fragment ions were shifted in their *m/z* value. Additionally, comparison of the fragmentation patterns of labelled and non-labelled enabled the localisation of the ¹³C incorporation in the respective metabolites. Since the labelled amino acids were supplemented

with a lower concentration of 10 mM, some intermediates of the metabolism could not be detected in these cultures.

Table 3.1 Metabolites of L-leucine and L-isoleucine identified in the volatile fraction of cultures of L. sulphureus.

| Compound | RI (CPwax) | | Concentration [mg l ⁻¹] [°] | Refer- ence | Identification |
|--|------------|------|---|----------------|-----------------|
| | GC- MS | Lit. | | | |
| <u>L-leucine supplementation</u> | | | | | |
| 3-hydroxy-3-methylbutanoic acid methyl ester [#] (9) | 1378 | 1366 | ≤0.1 | [208] | RI, MS* |
| 4-methyl-dihydro-2(3H)-furanone [#] (8) | 1592 | 1592 | ≤29.5 | [188] | RI, MS* |
| 3-methylbutanoic acid [#] (10) | 1676 | 1691 | ≤7.4 | [209] | RI, MS* |
| 3-methyl-2-butenic acid (11) | 1822 | NA | ≤2.1 | - | MS* |
| 4-methyl-2(5H)-furanone [#] (7) | 1859 | 1909 | ≤0.1 | [210] | MS* |
| 3-hydroxy-3-methylbutanoic acid [#] (12) | 2164 | NA | ≤70.5 | - | Ref, MS |
| <u>L-isoleucine supplementation</u> | | | | | |
| 3-methyl-dihydro-2(3H)-furanone [#] (4) | 1568 | 1569 | ≤1.6 | [188] | RI, MS* |
| 2-methylbutanoic acid [#] (13) | 1677 | 1667 | ≤6.4 | [211] | RI, MS* |
| 3-hydroxy-4,5-dimethyl-dihydro-2(5H)-furanone (6) | 2144 | NA | ≤0.1 | - | MS* |
| 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (sotolon) [#] (5) | 2187 | 2182 | ≤2.4 | [212] | RI, MS, OI, Ref |

[°]Maximum concentration of the metabolites that were achieved in the culture supernatant supplemented with L-leucine (30 mM) or L-isoleucine (20 mM). Sotolon concentration was determined using an external sotolon standard. Concentrations of all other metabolites were determined semi-quantitatively according to the standard substance cyclohexanol.

*Tentative identification.

[#] Compounds verified via ¹³C-labelling (using L-leucine-2-¹³C or L-isoleucine-U-¹³C₆), RI and MS.

RI, retention index; MS, mass spectrum; OI, odour impression, NA, not available; Ref, reference substance.

Nonetheless, due to biochemical considerations based on KEGG PATHWAY Database [213] and comparison with data from unlabelled supplemented cultures all compounds mentioned are postulated as direct metabolites. The supplementation of *L. sulphureus* cultures by L-leucine resulted mainly in the formation of 3-methylbutanoic and 3-hydroxy-3-methylbutanoic acid with cheesy and savoury notes. 3-methylbutanoic acid was effectively accumulated in the

culture's supernatant, and high concentrations of this polar metabolite were extracted with dichloromethane: About 0.6 mmol l⁻¹ of the acid accumulated when the culture was supplemented with 30 mmol l⁻¹ unlabelled L-leucine (semi-quantitative evaluation according to the internal standard cyclohexanol (30.6 µg ml⁻¹)). 3-Hydroxy-3-methylbutanoic acid is a L-leucine derived metabolite exhibiting anabolic effects on humans [214].

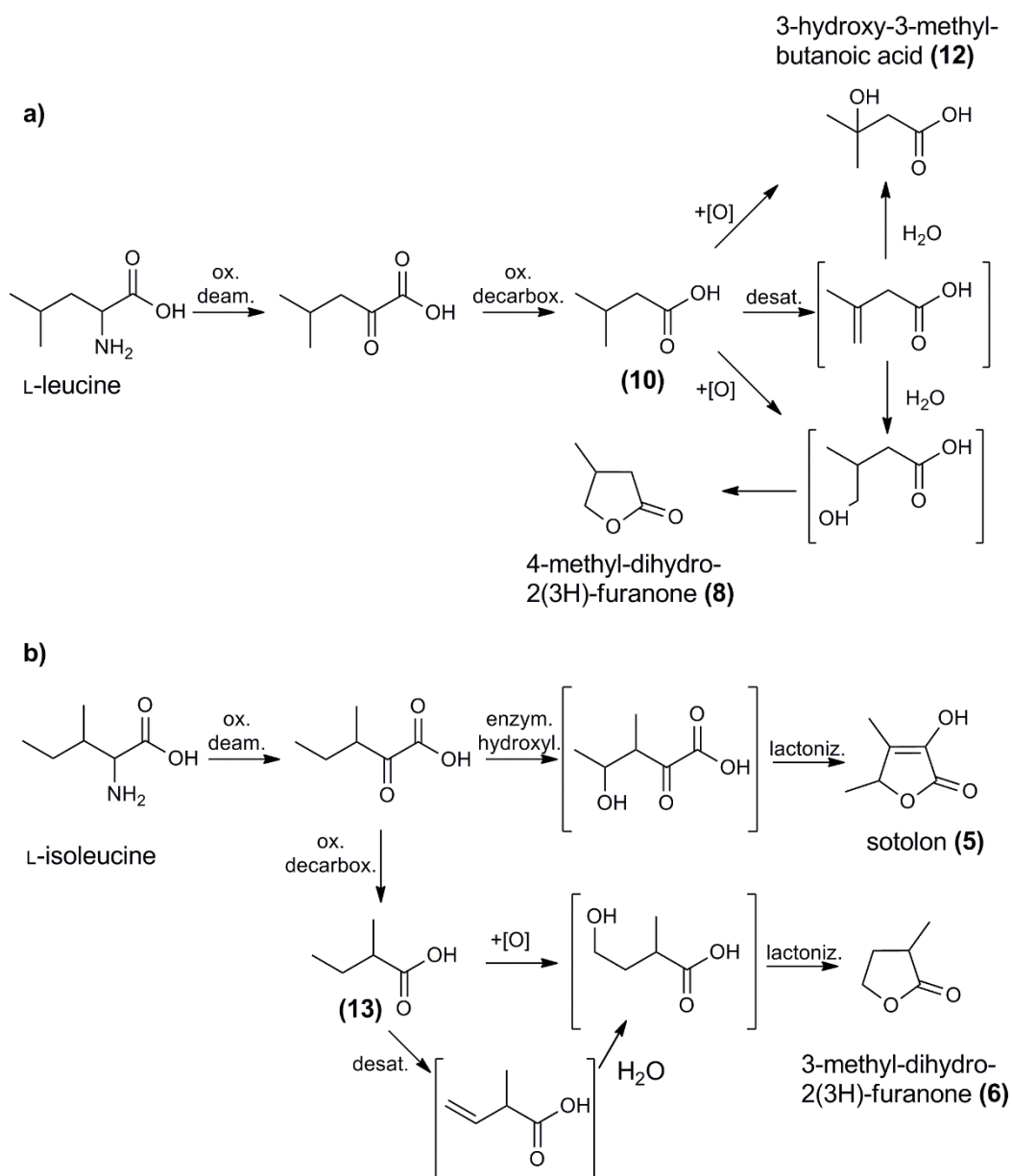


Figure 3.2 Proposed degradation pathways of L-leucine (a) and L-isoleucine (b) in submerged cultures of *L. sulphureus*. Compounds in brackets were neither detected during the ¹³C-labelling experiments nor supplemented to the cultures

This acid is generated along the deamination and decarboxylation of L-leucine and subsequent hydroxylation at the C3-position. This pathway is a part of the catabolism of amino acids in order to introduce metabolites into the citric acid cycle [213]. Another volatile, 4-methyl-dihydro-2(3H)-furanone, must have resulted from a hydroxylation at the terminal position of the same intermediate. 3-Hydroxy-3-methylbutanoic acid and 4-methyl-dihydro-2(3H)-furanone can either arise from an enzymatic introduction of oxygen from O₂ or after dehydrogenation to the corresponding butenoic acid followed by hydration of the just introduced double bond. A metabolic pathway of L-leucine leading to these metabolites is proposed (Figure 3.2a).

Most metabolites of the volatile fractions listed in Table 3.1 indicated that the metabolisms of L-leucine and L-isoleucine run similarly to corresponding butanoic acid derivatives. In both samples, analogous hydroxylated products, such as 3/4-hydroxy-2/3-methylbutanoic acid, and 3/4-methyl-dihydro-2(3H)-furanone made up a major part of the extracted volatiles after supplementation. However, a significant difference was the formation of the C6-metabolite sotolon. In contrast to L-leucine (C6 compounds not detected) the decarboxylation of L-isoleucine must have been retarded, allowing for a competing hydroxylation at the C4-position of the amino acid or its deamination product. This gave access to C6-metabolites and finally resulted in the formation of sotolon. This seems to be a side pathway in the regular amino acid metabolism of *L. sulphureus* to comply with an excess of L-isoleucine. Enzymatic mechanisms for a direct hydroxylation of amino acids in the terminal or other aliphatic positions occur rarely in literature.

3.4.3 L-Isoleucine Metabolism of *L. sulphureus* Leading to Sotolon

Depending on cell age and vitality the concentration of sotolon created in cultures supplemented varied between 1 and 20 μmol l⁻¹ accounting for 0.01 to 0.2 % of L-isoleucine supplemented. Quantitative formation of sotolon and degradation of L-isoleucine did not correlate well. Since L-isoleucine was the only carbon and nitrogen source in the minimal medium, the amino acid was used predominantly a source of energy, fully degraded (as monitored via HPLC) and most likely introduced into the citric cycle. Therefore, only a minor part was directed toward sotolon. Nevertheless, this range of concentration was much higher than the maximum concentrations previously reported in cultures grown on wheat gluten [188]. While the precursor feedings suggested a bioconversion of L-isoleucine while maintaining the C6-carbon backbone,

alternative routes to sotolon, such as the aldolisation of 2-oxobutanonic acid and acetaldehyde as in wine [192, 215], or the formation from *Maillard* products, such as butane-2,3-dione and 2-hydroxyacetaldehyde [216] could not be ruled out in the fungal culture until now. Thus, the minimal medium was supplemented with uniformly ^{13}C -labelled L-isoleucine. Volatiles of the culture liquid were extracted and analysed by means of GC-MS. A shift of the molecular ion of sotolon from m/z 128 to m/z 134 was observed which proved that all six carbon atoms of the precursor amino acid were retained in the sotolon structure (Figure 3.3). The metabolites highlighted in Table 3.1 also inherited the ^{13}C -isoleucine backbone, as was verified by the mass spectra. Therefore, a significant contribution of *de novo* synthesis of sotolon or other pathways was ruled out.

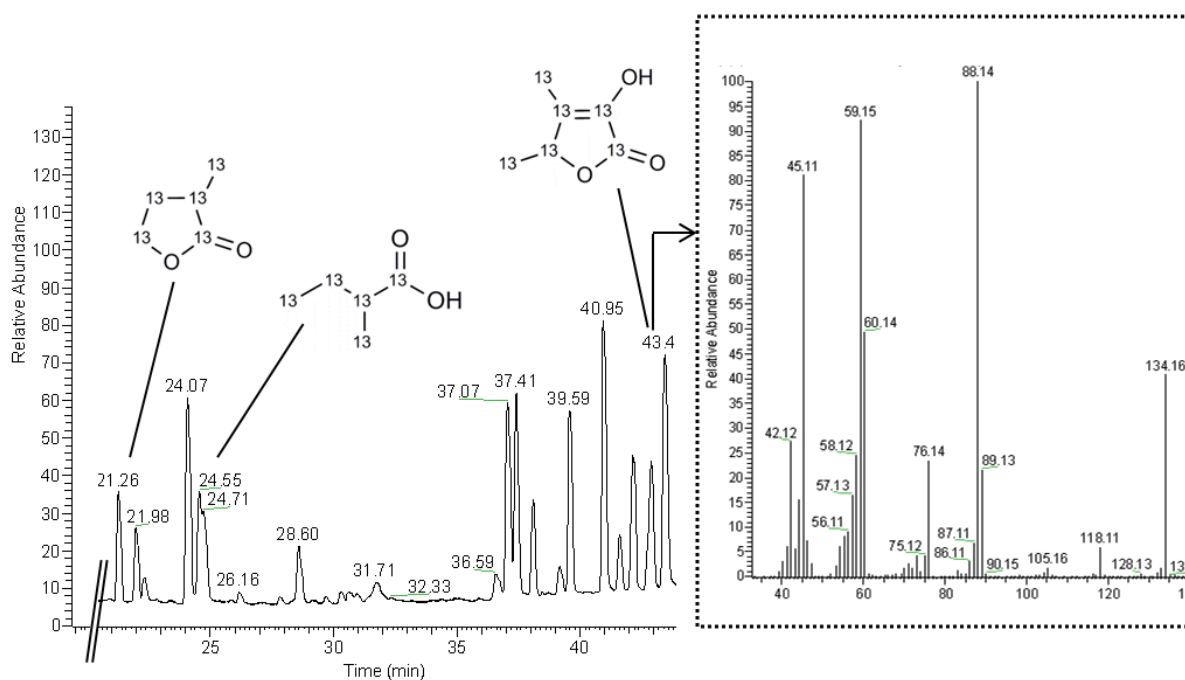


Figure 3.3 GC-MS chromatogram of a dichloromethane-extract of *L. sulphureus* culture supernatant supplemented with L-isoleucine- $^{13}\text{C}_6$ (10 mM) and the MS-spectrum of generated sotolon (dotted frame).

To detect on which level the introduction of oxygen into the precursor molecule took place, a kinetic study was conducted. Either L-isoleucine was hydroxylated resulting in the formation of L-4-hydroxyisoleucine, or deamination of the amino acid took place first, followed by a hydroxylation of the resulting 2-oxoacid. Dioxygenases capable of generating 4-hydroxyisoleucine have been found in different species such as fenugreek [206], *Bacillus thuringiensis* [142] or *Pantoea anantis* [217]. Neither this nor similar activities have been described so far for basidiomycetes. When monitored *via* LC-MS², *L. sulphureus* cultivated

submerged in minimal medium supplemented with L-isoleucine produced only traces of L-4-hydroxyisoleucine (data not shown). This suggested that sotolon genesis proceeded predominantly *via* hydroxylation of the deaminated amino acid. To substantiate this proposition, the formation of sotolon was compared in minimal media supplemented with L-isoleucine or its corresponding α -keto acid, 3-methyl-2-oxopentanoic acid (20 mM each). During 23 days of cultivation 4-ml samples of supernatant were collected every two to three

days and extracted with dichloromethane. All main cultures were inoculated using the same preculture. Since no other organic nitrogen source was available, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 mmol l^{-1}) was added to all cultures to avoid nitrogen starvation. A significantly higher peak concentration of sotolon was achieved in cultures supplemented with 3-methyl-2-oxopentanoic acid compared to L-isoleucine. The formation of sotolon became measurable after one week of cultivation (Figure 3.4), even though, due to its very low threshold, the odour was already perceived after three days. Typical was a decreasing pH during the cultivation. Comparison of Figure 3.4a and 3.4b show that sotolon was formed right after the pH of the culture liquid fell below pH 3. Acidic conditions facilitate the cyclisation of extracellular 4-hydroxy-2-oxoacid to sotolon. Hereby, the final step in the formation of sotolon is most likely a chemical ring closure. Nevertheless, an enzymatic formation of the lactone ring cannot be ruled out.

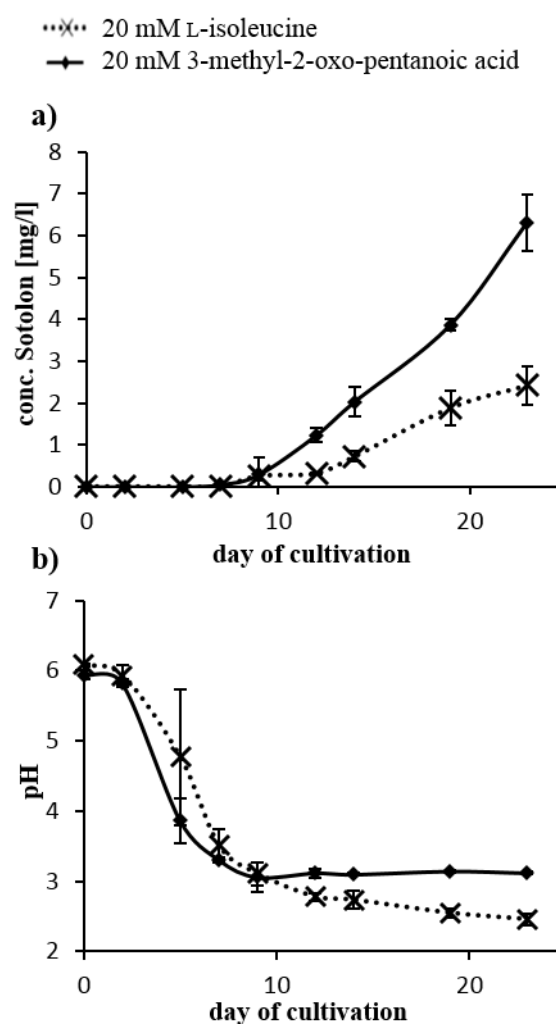


Figure 3.4 Formation of sotolon (a) and decrease of pH (b) during cultivation of *L. sulphureus* with 20 mM isoleucine or 20 mM 3-methyl-2-oxo-pentanoic acid

Results of the building kinetics suggest that 3-methyl-2-oxopentanoic acid is the target of hydroxylation within the pathway of sotolon formation since more than double amount of the

volatile was formed in these cultures. This assumption is underlined by the fact that no significant quantities of 4-hydroxyisoleucine were found using LC-MS²

3.4.4 Hydroxylation of L-Isoleucine Metabolites: Water Addition or Enzymatic Oxygenation?

Beside a direct oxygenation, a desaturase-catalysed reaction yielding a C₃-C₄ double bond followed by addition of water could have led to the formation of a hydroxyl group on the C₄ position of 3-methyl-2-oxopentanoic acid. During the catabolism of L-isoleucine a desaturation commonly occurs after the decarboxylation to C₅-metabolites. A hydratase then creates 3-hydroxy-2-methylbutanoic acid. This mechanism is an intermediate step in a series of reactions destined to channel the metabolite to the citric acid cycle. A similar reaction sequence on the C₆-level would yield the required sotolon precursor. On the other hand, the aliphatic C₄-position could directly be hydroxylated by an oxygenase introducing molecular oxygen (O₂), a reaction not yet described for basidiomycetes.

To clarify the origin of the oxygen atom at the C₄ of the sotolon molecule, the biotransformation of 3-methyl-2-oxo-pentanoic acid (20 mM) was carried out in minimal medium prepared with ¹⁸O-labelled water (50 % label). Sotolon produced by these cultures was analysed by means of GC-MS. Isotopic ratios of the molecular ion of sotolon (Table 3.2) proved that only one labelled oxygen was incorporated. A second label was found in negligible concentrations (<1 %).

Table 3.2 Comparison of isotopic pattern of sotolon, stored in ¹⁸O-water (50 % labelled) and sotolon generated by *Laetiporus. sulphureus*

| | % [M] ⁺ | % [M+2] ⁺ | % [M+4] ⁺ |
|---|--------------------|----------------------|----------------------|
| H ₂ O/H ₂ ¹⁸ O | 50 | 50 | - |
| sotolon, stored | 66.0 | 33.1 | < 1.0 |
| sotolon, generated | 54.9 | 43.1 | < 1.0 |
| 3-methyl-dihydro-2(3H)-furanone | 46.5 | 44.3 | 9.2 |

Sotolon stored in sterile culture medium (50 % labelled ¹⁸O-water) for the same period of time led to similar isotopic ratios (Table 3.2). Therefore, both samples showed the same incorporation of water at position three of the furanone ring, as proven by the ion pattern of the EI-mass spectrum (Figure 3.5). The predominant fragmentation of sotolon was the neutral loss of HCO₂ as indicated by the pattern of ¹³C-labelled sotolon, as *m/z* 88 corresponds to ¹³C₅ (Figure 3.3).

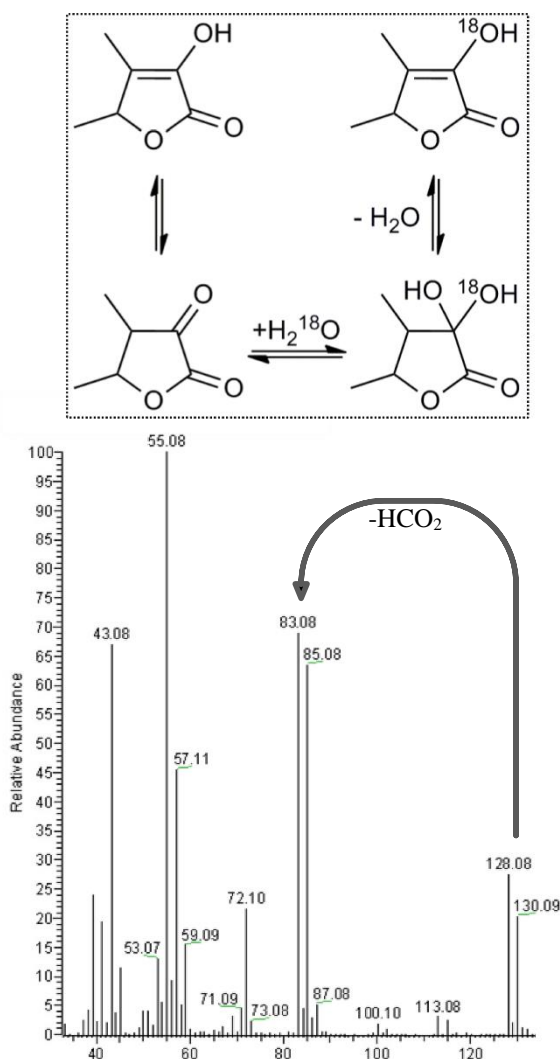


Figure 3.5 EI-MS spectrum of sotolon with ^{18}O -label created in cultures of *L. sulphureus* supplemented with ^{18}O -water (50%), neutral loss of HCO_2^* is highlighted. Insert (dotted frame): mechanism of oxygen exchange leading to incorporation of ^{18}O into sotolon

After HCO_2 was split from the molecule ion of the ^{18}O -labelled sotolon (Figure 3.5: m/z 128 or 130, respectively), the isotopic label was still retained in the daughter ion as indicated by the ion at m/z 85 which did not occur in the same intensity in the mass spectrum of unlabelled sotolon. The ratio between m/z 130/128 was the same as found for m/z 85/83, which would definitely not have been the case, if the ^{18}O -label was located in the ester bond. In this case the label would be lost during the decarboxylation. Only an ^{18}O -label at position three of the furanone ring was congruent with the mass spectrum. The mechanism of oxygen exchange is illustrated in Figure 3.5 (dotted frame). If water was added at the C4 of a desaturated oxoacid, a second ^{18}O -label had to be present at the C4 of sotolon, which would have resulted partially a molecular ion of m/z 132 beside those at m/z 128 and 130, which was not the case. Small differences within the ratios of labelled isotopes of the chemical blank can be explained by the higher amount of sotolon ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) supplemented in the minimal medium.

In conclusion, ^{18}O -labelling proved that hydration of a double bond was not responsible for the incorporation of a hydroxyl group at the C4 position of 2-oxo-3-methylpentanoic acid. Oxygenation must have occurred enzymatically along the incorporation of molecular oxygen (O_2). Further confirmation of an enzyme catalysed hydroxylation could be derived from a chiro-specific analysis of sotolon enantiomers. Especially monooxygenases are known to

introduce hydroxy groups enantio-specifically with high enantiomeric excess. In the present work chiral GC-analysis resulted in almost racemic mixtures (data not shown). However, the instability of sotolon is well known, and racemisation was favoured under acidic conditions in a model wine solution. The racemisation is suggested to occur *via* keto-enol tautomerism along intermediate aromatisation of the lactone which entails the loss of chiral orientation at C4 [193].

In contrast to the formation of sotolon, 3-methyl-dihydro-2(3H)-furanone was at least partially formed *via* water addition to the double bond of 2-methyl-3-butenoic acid, since 9.2 % of doubly labelled ions were found in the mass spectrum of the furanone (Table 3.2). Careful interpretation, however, is required, because the furanone could also have been formed simultaneously along two different ways in the culture (Figure 3.2b).

3.5 Conclusion

Labelling studies elucidated the metabolic pathway of sotolon genesis in cultures of *L. sulphureus* as illustrated in Figure 3.2b. L-isoleucine was transformed into the corresponding 3-methyl-2-oxopentanoic acid. An enzymatic oxygenation took place at the C4, resulting in 4-hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoic acid. Finally, sotolon was formed *via* cyclisation – most likely in a chemical reaction due to the low pH (< 3.0) of the culture broth. No corresponding C6-lactone was found in cultures supplemented with L-leucine, even though results of ¹³C-labelling of both aliphatic amino acids indicated analogue catabolic pathways (Table 3.1).

A retardation of L-isoleucine decarboxylation or a metabolic build-up of the α -keto acid of L-isoleucine as a substrate for an enzymatic hydroxylation are suggested to explain sotolon formation by *L. sulphureus*. A similar mechanism was found in humans suffering from maple syrup urine disease. In urine samples of these patients, sotolon was identified as the major volatile compound contributing to the characteristic curry-like, seasoning smell [218]. The metabolic reason of the disease is the malfunctioning of decarboxylase subunits leading to the accumulation of L-isoleucine.

Fungal cells may not only serve as models to study the origins of volatile metabolites, but also as biotechnological production systems. However, the concentration of sotolon reached (maximum 6.2 mg l⁻¹) indicates that the hydroxylating activity is merely a side reaction. Attempts to isolate the hydroxylating enzyme might still be worthwhile to improve the yield and to additionally get access to the anabolic compound L-4-hydroxyisoleucine.

3.6 Acknowledgements

The authors thank the group at the Nestle Product Technology Centre Lebensmittelforschung GmbH, Singen, Germany, for the fruitful collaboration, and D. Linke for valuable advice.

4 Vorwort zur Publikation „Manganese Peroxidases from *Ganoderma applanatum* Degrade β -Carotene Under Alkaline Conditions“

Im Rahmen von Studien zur Produktion flüchtiger Verbindungen aus dem Pflanzenfarbstoff β -Carotin, darunter insbesondere der Aromastoff β -Ionon (Kapitel 1.3.3), zeigte der Weißfäulepilz *G. applanatum* eine deutliche β -Carotin abbauende Aktivität. Mit zellfreiem Kulturüberstand konnten eine Degradation des Farbstoffes herbeigeführt, jedoch keine flüchtigen Verbindungen erzeugt werden – für einen Einsatz zur Produktion der Aromakomponenten schien der Basidiomycet somit nicht geeignet, sodass die Carotin abbauenden Aktivitäten zunächst nicht näher verfolgt wurden.

In den letzten Jahren vermehrte sich jedoch das Interesse der Waschmittelindustrie, enzymatische Alternativen zu oxidativen Bleichmittel zu etablieren (Kapitel 1.3.4). Das Bestreben, energiesparende und textilschonende Waschvorgänge zu ermöglichen, fordert einen solchen Schritt, da Enzyme oft bereits bei deutlich geringeren Temperaturen effiziente Abbauraten der Substrate erzielen. Bisher können Waschmittel viele pflanzliche Farbstoffe unter diesen Bedingungen noch nicht ausreichend entfärben. Die β -Carotin abbauende Aktivität des *G. applanatum* wurde als potentielle Möglichkeit für einen Einsatz im Waschmittel gesehen und sollte nun näher untersucht werden. Die Ergebnisse der Vorarbeiten deuteten auf eine extrazelluläre Aktivität hin. Weißfäulepilze sekretieren, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, eine Vielzahl hydrolytischer und oxidierender Aktivitäten, darunter insbesondere Laccasen und Peroxidasen. Tatsächlich konnten im Rahmen bisheriger Studien bereits Peroxidasen aus *Marasmius scorodoni* oder *Lepista irina* als Carotin abbauende Enzyme identifiziert werden [183, 219]. Sie zeigten jedoch keine Aktivitäten im Alkalischen, wie für einen Einsatz im Waschmittel erforderlich. Um das Potential zur Degradation pflanzlicher Farbstoffe durch Basidiomyceten für Waschmittel nutzen zu können, bedarf es somit weiterer Forschung. Ein Fokus muss hierbei auf alkalische Aktivitäten gesetzt werden.

Um die Applikationsmöglichkeit der Aktivität aus *G. applanatum* bewerten zu können, galt es nun, die verantwortlichen Enzyme zu identifizieren. Nach einer Aufreinigung wurde insbesondere die Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Aktivität und eine Entfärbung unter simulierten Waschbedingungen getestet.

5 Manganese Peroxidases from *Ganoderma applanatum* Degrade β -Carotene Under Alkaline Conditions

Reproduced from Applied Biochemistry and Biotechnology, **2015**, 175 (8), p. 3800-3812
with permission from Springer, given in the Copyright Transfer Statement (CTS)

© 2015, Springer Science+Business Media New York

5.1 Abstract

A β -carotene-degrading enzyme activity was observed in liquid cultures of the basidiomycete *Ganoderma applanatum*. Supplementing the cultures with β -carotene induced the bleaching activity. Purification via hydrophobic interaction, ion exchange and size exclusion chromatography followed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) resulted in a single protein band. LC-ion-trap-MS analyses and gene amplification identified two manganese peroxidase isoenzymes with 97.8 % identity on the amino acid level. These showed an estimated molecular mass of 48 kDa and an isoelectric point of 2.6. Properties not yet described for other manganese peroxidases were hydrogen-peroxide-independent catalysis and two maxima of the bleaching activity, a distinct one at pH 5 and a lower one at pH 8. During simulated washing studies, the applicability of the isoenzymes for the brightening of carotenoids under alkaline conditions was proven. The new enzymes may replace common bleaching agents to produce environmentally more compatible detergent formulations.

Key words: Biocatalysis; Enzyme activity; Carotene degradation; Manganese peroxidase; Purification; Filamentous fungi; *Ganoderma applanatum*; Washing; Alkaline activity

5.2 Introduction

The first enzymes were introduced into the detergent industry one century ago. The application of enzymes for washing offers energy saving by lower temperatures and less mechanical input. Moreover, stains are bleached by enzymes selectively, whereas the colour and texture of the fabrics remain unaffected [220]. Lipases and proteases are extensively used to specifically hydrolyse proteins and triglycerides, thereby supporting the washing performance of surfactants

[198, 221]. Carotenoid stains, however, still represent a challenge. Carotenes and xanthophylls are present in many vegetables and fruits, and carotene-rich extracts are also used as food colourants [222]. Some enzymes capable of degrading carotene have been reported for different biotechnological applications, such as the bleaching of dough [223] or the production of flavour compounds [184].

In their natural habitats, basidiomycetes degrade the most diverse organic compounds, making them promising producers of peroxidases. Lignolytic fungal enzymes are utilised in the food, paper or pharmaceutical industries, as reviewed by Mendonça Maciel et al. (2010) [153]. Textile dyes can be degraded using laccases or manganese and lignin peroxidases to clean the wastewater [168, 224, 225]. However, an application for the degradation of carotenoids on fabrics has not yet been established.

Some basidiomycetous enzymes, such as MsP1 and MsP2 of *Mycetinis scorodonius* [226] or the versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus* [227], possess efficient carotene-cleaving properties [184, 219, 228]. Nevertheless, the presence of detergents, alkaline conditions and partial absorption of colours into the textile fibre present particular challenges. An activity at temperatures up to 60 °C has to be provided, and the catalytic activity must not be inhibited by detergent components [229]. Previous results during a screening on the formation of flavour compounds through carotene cleaving by basidiomycetes indicated that *Ganoderma applanatum* produced a possibly suitable carotene-degrading activity [184]. In this study, the responsible enzymes were identified, biochemically characterised and tested under alkaline washing conditions.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Chemicals

Chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), Carl Roth (Karlsruhe, Germany) or Merck (Darmstadt, Germany) and PCR Primers from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

5.3.2 Cultivation of *G. applanatum*

The *G. applanatum* (Gap) strain was purchased from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Netherlands). Cultures were grown and stored on standard nutrient medium (SNL) agar plates containing 30 g l⁻¹ glucose monohydrate, 9 g l⁻¹ yeast extract, 4.5 g l⁻¹ L-asparagine monohydrate, 0.5 g l⁻¹ MgSO₄, 1.5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 ml trace element solution (0.005 g l⁻¹ CuSO₄ × 5 H₂O, 0.08 g l⁻¹ FeCl₃ × 6 H₂O, 0.09 g l⁻¹ ZnSO₄ × 7 H₂O, 0.03 g l⁻¹ MnSO₄ × H₂O, and 0.4 g l⁻¹ EDTA) and 15 g l⁻¹ agar agar. Media were adjusted to pH 6.0 using 1 M NaOH.

For the preparation of precultures, an agar piece of 1 cm² with fully grown stock culture was cut from the agar plate, transferred into a 250-ml Erlenmeyer flask filled with 100 ml SNL (without agar) and homogenised. Precultures were grown at 150 rpm and 24 °C for 7 days. Twenty-five millilitres of preculture was then used for inoculation of the main cultures (250 ml media). Those were cultivated in SNL with an addition of 3 ml β -carotene emulsion (freshly prepared and sterile-filtered) at 24 °C and 150 rpm until the day of maximum extracellular β -carotene-degrading activity (CD-activity). The culture was then harvested, centrifuged at 5000 rpm and 4 °C (Rotina 380R, Hettich), and cells were discarded. The active supernatant was then used for further purification.

5.3.3 β -Carotene Emulsion

Twenty milligrams β -carotene and 1 g Tween 80 were solved in 20 ml dichloromethane. The solvent was then removed (40 °C, 800 mbar) using a rotary evaporator, and the emulsion was carefully mixed with 30 ml 40 °C warm distilled water. Residual dichloromethane was removed at 40 °C, reducing the pressure stepwise to 200 mbar. The emulsion was filtered (0.45 μ m) in a 50-ml Erlenmeyer flask and filled up with warm water. The emulsion was stored for a maximum of 2 weeks at 4 °C in the dark.

5.3.4 Enzyme Activity Assay

β -Carotene emulsion was mixed with buffer solution and distilled water to a concentration of 100 mM sodium acetate (pH 4.5) or sodium phosphate (pH 8.0) and an optical density (OD) of 1 at 450 nm. Two hundred seventy microlitres of this substrate solution was pipetted in a 96-well plate, and the reaction was started by adding 30 μ l of enzyme sample. The decrease of the

extinction at 450 nm ($-\text{mAbs min}^{-1}$) was measured over 20 min at 30 °C in a BioTek Synergy 2™ microplate reader.

To examine the pH dependency of the enzyme, Britton-Robinson buffer [230] (phosphoric, acetic and boric acid, 0.04 M each were titrated with 1 M NaOH to different pH) was used in the range between pH 3 and 11.

The temperature dependency was measured in the range of 25 to 80 °C with a Shimadzu UV/VIS Spectrophotometer (UV1650PC) equipped with a B. Braun thermomixer (FRI60MIX). Seven hundred twenty microlitres of substrate solution was therefore warmed in a tempered cuvette for 5 min. Eighty microlitres of enzyme sample was added to start the reaction. All biochemical characterisations were done in duplicate. For each different assay condition tested, blank values were measured containing buffer instead of purified enzyme.

5.3.5 Application Under Alkaline Conditions

The enzymatic brightening effect on β -carotene and tomato extract was examined under simulated washing conditions. Therefore, the tomato extract was prepared from 150 g tomato puree (3x concentrated, from supermarket), mixed with 300 ml water and extracted with 400 ml dichloromethane. The solvent was drawn off via rotary evaporator. One gram of Tween 80 was added to 50 mg of the remaining natural colourants and dissolved in 20 ml dichloromethane. Again, the solvent was removed (40 °C, 800 mbar), and the emulsion was then carefully mixed with 30 ml distilled water. Residual dichloromethane was removed at 40 °C and 200 mbar. The emulsion was then filtered (0.45 μm) into a 50-ml Erlenmeyer flask and filled up with distilled water.

Washing conditions were simulated using pH 8.0, 30 °C and continuous shaking (220 rpm) in the dark for 1 h. If mentioned, 0.44 % enzyme-free washing detergent (Henkel, Düsseldorf, Germany) was added to the sample. The substrate solutions were prepared according to “*Enzyme Activity Assay*” with an end concentration of 100 mM sodium phosphate (pH 8.0) and an OD of 1.2. Additionally, the brightening effect was monitored at acidic conditions (pH 4.5) and with the addition of 4 mM MnSO_4 for comparison. The purified manganese peroxidases of *G. applanatum* were used with an activity of 20 mAbs min^{-1} ($90 \mu\text{U}$, $\epsilon = 0.095 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [184]) determined under optimum conditions (pH 4.5 with 4 mM MnSO_4 at 30 °C). After zero, 30 and 60 minutes of incubation, an UV/VIS spectrum (360-560 nm) was measured in a BioTek

Synergy 2TM microplate reader. The enzymatic brightening effect was evaluated at the wavelength of maximum absorption (OD_{max}) of the substrate emulsion and calculated as the percental difference between blank (buffer instead of enzyme added to the substrate emulsion and incubated under the same conditions) and enzyme sample at the time (t).

$$\text{enzymatic brightening } (t) \text{ [\%]} = \left(1 - \frac{OD_{enzyme}(t)}{OD_{blank}(t)} \right) \cdot 100 \%$$

5.3.6 Purification of the β -Carotene Degrading Manganese Peroxidases

A multistep purification sequence was required to isolate the β -carotene-degrading activity from other enzymes. The active supernatant of the basidiomycete was carefully mixed 1:1 with a high-salt buffer until a concentration of 2 M $(NH_4)_2SO_4$ (in 50 mM sodium phosphate, pH 6.5) was achieved. The precipitate was centrifuged (5000 rpm, 10 min), and the active supernatant was separated on a conditioned Phenyl Sepharose fast flow column (20 ml, GE Healthcare, Solingen, Germany). The sample was loaded onto the column at a flow rate of 2 ml min^{-1} and the active enzyme eluted by directly changing to 100 % elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.5). Desalting and concentration of active fractions was performed via ultrafiltration. Afterwards, an anion exchange chromatography was performed. A Q-Sepharose column (1 ml, GE Healthcare, Solingen, Germany) and 20 mM sodium acetate buffer pH 4.0 ($\pm 1 \text{ M}$ sodium chloride) were used. One millilitre of sample (pooled, desalted and concentrated CD-active HIC fractions) was mixed with 10 ml of salt-free running buffer and loaded onto the column. The separation was performed at 1 ml min^{-1} with a 3 % step (12 ml), followed by a linear gradient elution to 30 % of salt-containing buffer. The active fractions ($\sim 10 \%$ NaCl-containing buffer) were again concentrated by ultrafiltration and then applied on a Superdex 75 size exclusion chromatography column (GE Healthcare, Solingen, Germany) and separated with buffer containing 100 mM sodium phosphate and 100 mM sodium chloride (pH 6.5) at 0.5 ml min^{-1} .

5.3.7 Electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with 6 % (w/v) polyacrylamide for stacking and 12 % (w/v) for resolving gels. For a denaturing PAGE, samples were mixed 1:1 with SDS loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 1 M DTT, 2 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and incubated at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min.

Electrophoresis was run with 15 mA per gel at room temperature. Semi-native PAGE was performed under non-denaturing conditions using 20 % glycerol for loading the samples and 10 mA per gel at 8 °C. Denatured gels were Coomassie or silver stained. Semi-native gels were washed with double-distilled water and incubated with a β -carotene overlay gel. For the overlay gel, a 1 % agarose gel plus β -carotene solution (pH 4.5, 6.5 or 8.0) was casted directly onto the SDS gel and incubated in the dark at 30 °C overnight. For determination of molecular mass, the All Blue Precision Plus pre-stained protein marker (Bio-Rad) was used.

For analytical isoelectric focusing (IEF) Servalyte precotes pH 3-6 and a protein standard (Low pI Kit, pH 2.5-6.5, GE Healthcare, Solingen, Germany) were used. Electrophoresis was performed according to the standard manual (3500 Vh, 2000 V, 6 mA), and samples were desalted and concentrated via ultrafiltration before application. After electrophoresis, the IEF gels were Coomassie, silver or 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) activity stained (5 mM ABTS, 0.2 mM H₂O₂) or incubated with a β -carotene overlay gel as mentioned above.

5.3.8 ESI Tandem MS Analysis

The protein band identified in the active size exclusion chromatography (SEC) fraction was cut out from the SDS polyacrylamide gel and dried in a desiccator. After digestion of the protein with trypsin, peptides were extracted from the gel and purified using standard protocols. Peptide sequence analyses were performed using an Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) and nanospray ion source with gold-coated capillaries for electrospray ionisation (ESI). For collision-induced dissociation experiments, multiple charged parent ions were selectively retained in the linear ion trap, then transferred to the external collision cell and the obtained fragment ions detected in the orbitrap analyser. The resulting daughter ion spectra were used for manual *de novo* peptide sequencing, and the deduced amino acid sequences were used for blast searches in public protein primary sequence databases (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>).

5.3.9 cDNA Synthesis and Gene Amplification

RNA was prepared from 150 mg mycelium using the innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena, Germany). First-strand synthesis was carried out with a SMARTScribe reverse transcriptase (Clontech) using 2-3 μ g RNA and oligo-dT-primers. The samples were incubated at 42 °C

(60 min), 50 °C (10 min) and 70 °C (10 min). The single-stranded DNA (ssDNA) was directly used as template for the following PCRs.

Primers for gene amplification were designed on the background of the homologous manganese peroxidase BAA88392.1 and the JGI genome of *Ganoderma sp.* 10597 (protein ID 116446).

All PCRs were carried out using 5 μ l of 10 \times Pfu buffer with MgSO₄, 1 μ l dNTPs (2.5 mM ea.), 2.5 μ l of each primer, 1 μ l of ssDNA template, 1 μ l of Pfu polymerase (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) and 37 μ l ddH₂O. PCR was always carried out using an annealing temperature of 52 °C and an elongation step at 72 °C and 2 min kb⁻¹ in a Master Cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Repeated approaches were required to amplify the full coding sequences of the two isoenzymes. *gapMnP1* was eventually amplified using primers pairing in the 5'- and 3'-UTR regions (Fw_5'_UTR: 5'-ACTAGCATCGGCAGCACTTT-3', Rev_3'_UTR: 5'-CCCGAATTGAACATATGAACG-3'). *gapMnP2*, in contrast, could only be amplified using primers complementary to the start- and stop regions of the gene (Fw_Start: 5'-CATGTTCTCAAAGTCTTCCTC-3', Rev_Stop: 5'-CCCCTCATTTCAGGAGTTCAA-3'). The missing ends of the genes were fished in two steps. The 5'-end could be amplified using the 5'-UTR-primer (mentioned above) against a gene-specific reverse primer (*gapMnP2_SP_rev*: 5'-TGCTCGGATCGACCGTGTTCCTG-3'). The 3'-end was fished via 3'-RACE. Complementary DNA (cDNA) was synthesised with an oligo-dT-anchor primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3', from: 5'/3'RACE Kit 2nd Generation, Roche, Germany), and PCR was performed using a gene-specific forward primer (*gapMnP2_SP_fw*: 5'-CAACGACGGCCTGGATGAAATC-3') against the anchor primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3').

PCR products were separated with 1.5 % agarose gels and fragments of expected size extracted from the gel using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Purified amplicates were then ligated into a linearised pUC57 vector using a T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) and the respective 10 \times buffer. After incubation at 6 °C overnight, a transformation into *Escherichia coli* Top 10 cells was carried out via heat shock. One millilitre of liquid broth (LB) medium was added to the sample and incubated at 37 °C and 200 rpm for 1 h. Cells were then plated on LB-agar plates with ampicillin (50 μ g ml⁻¹) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal,

30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). If positive cloning was verified via blue-white screening and colony-PCR, plasmids were prepared from over-night cultures of the respective clones using the innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Germany) and sequenced (SEQLAB Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Germany).

Translation into protein sequences was carried out using the ExPASy translate tool [231]. Sequence homology analyses and prediction of conserved domains were performed using NCBI blastp and GenBank database searches [232, 233]. Alignments were created using ClustalW2 [234] and prediction of glycosylation sites via NetNGlyc 1.0 [235] and NetOGlyc 4.0 [236].

5.4 Results and Discussion

5.4.1 Carotene-Degrading Activity of *G. applanatum* Submerged Cultures

A carotene-degrading activity of *Ganoderma applanatum* was published in the context of flavour formation [184]. In those studies, the basidiomycete was cultivated on standard nutrition medium (SNL) agar plates containing aliquots of a β -carotene emulsion. Since the carotene supplementation might have induced the expression of potential carotene-degrading enzymes, similar conditions were used for liquid cultures in this study. The carotene-degrading activity (CD-activity) of submerged main cultures of the basidiomycete was monitored over three weeks using SNL with 3 ml β -carotene emulsion and compared with cultures in carotene-free SNL medium. Figure 5.1 illustrates the kinetics of enzyme formation during cultivation, measured in the alkaline range (pH 8.0) without the addition of H_2O_2 to ensure the efficiency of the enzyme under real washing conditions.

Supplementation of the submerged cultures with β -carotene induced the expression of carotene-degrading enzymes. A maximum activity was found after 11-12 days of cultivation. These culture conditions were chosen for further experiments, and culture supernatant was harvested on the day of maximum activity.

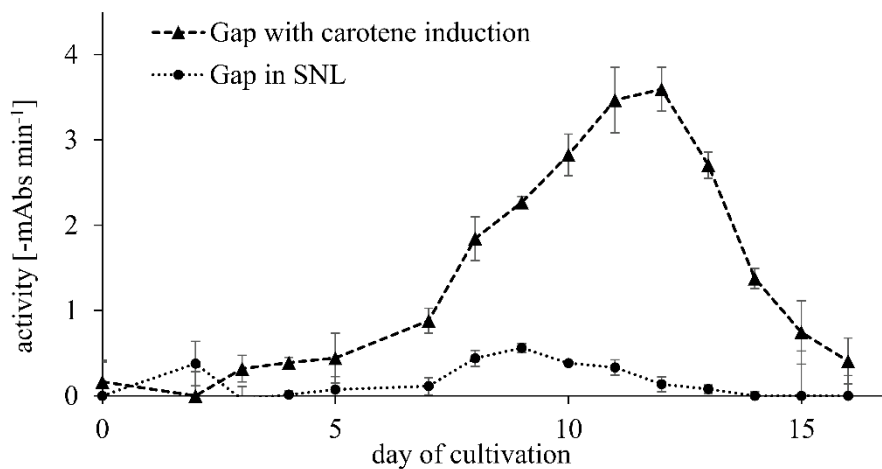


Figure 5.1 β -carotene-degrading activity of *G. applanatum* submerged cultures in SNL medium supplemented with 3 ml of carotene emulsion compared to non-supplemented cultures. Activity assay was performed at pH 8.0

5.4.2 Purification and Identification of Manganese Peroxidases Responsible for β -Carotene Degradation

To identify the enzyme capable of degrading β -carotene, a purification scheme was developed to isolate the enzyme from contaminating proteins. Due to a high viscosity of the culture supernatant, an ammonium sulphate precipitation with an end concentration of 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was performed. After centrifugation and filtration (0.45 μm), the supernatant was directly applied on the hydrophobic interaction chromatography column, and purification was performed using three different chromatographic steps, as summarised in Table 5.1. After all, 9 % of the activity was retrieved in the SEC fractions, leading to an electrophoretically pure protein band in the SDS-PAGE at an estimated molecular mass of 48 kDa (Figure 5.2a), which was cut out and used for peptide sequencing. A semi-native PAGE with a β -carotene overlay led to a visible brightened but diffuse zone in the same size range (data not shown).

To characterise the enzyme, an analytical IEF was performed. ABTS staining and a carotene overlay (pH 4.5, diffuse band, data not shown) revealed one ABTS- and CD-active band at pI 2.6 (Figure 5.2b). ABTS staining was only successful when adding H_2O_2 , indicating that a peroxidase was responsible for the sought-after activity. Laccase activity was thus ruled out.

The carotene overlay was performed at pH 4.5, 6.5 and 8.0. A visible decolourisation of the agarose gel was only found in the acidic range.

Table 5.1 Purification of manganese peroxidases from supernatants of *G. applanatum* (submerged cultivation with β -carotene induction, eleventh culture day).

| Step | Protein (mg) | Activity | | Purification | |
|-------------------------|--------------|-------------------------|---------------------------------|--------------|--------|
| | | Total (mU) ^a | Specific (mU mg ⁻¹) | Yield (%) | Factor |
| Culture supernatant | 886.1 | 101.0 | 0.11 | 100 | 1 |
| Hydrophobic interaction | 67.3 | 48.7 | 0.72 | 48 | 6 |
| Anion exchange | 2.8 | 27.1 | 9.75 | 27 | 86 |
| Size exclusion | 0.3 | 9.7 | 29.77 | 9 | 261 |

Active fractions were pooled between each FPLC step and concentrated via ultrafiltration. CD-activity was determined at optimum conditions of pH 5 and 45 °C without addition of H₂O₂

^aEnzyme activity calculated with $\epsilon = 0.095 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ according to [184]

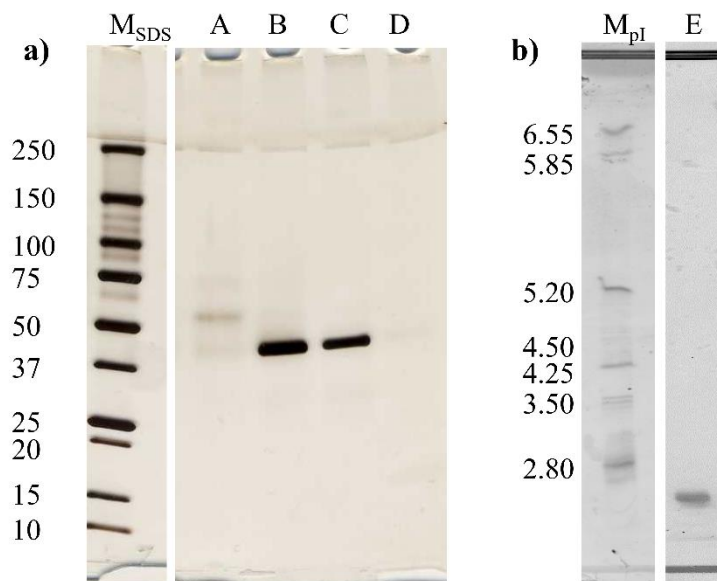


Figure 5.2 a) SDS-PAGE (precast gradient gel 4-25 % Bio-Rad) of SEC fractions (samples A-D from high to smaller size, B and C were active); M_{SDS} = protein marker. b) Analytical IEF pH 3-6. Marker (M_{pI} = low pI marker) was Coomassie stained, the purified enzyme (E) was ABTS-stained.

Three peptides (1: [I/L]QSDFA[I/L]SR, 2: [I/L]QSDFV[I/L]SR, 3: SNDSQPSPPN[I/L]VP[I/L]PSDSADT[I/L][I/L]SR, Figure 5.3) were identified by manual de novo sequence analysis using the MS/MS spectra obtained from the tryptic digest of the protein band from SDS-PAGE. Two peptides (no. 1 and 2) differed only in one amino acid, indicating that two isoenzymes, not separable by the multistep protocol, were present in the same protein band. Basic local alignment searches (Blastp) against public databases identified the purified enzyme as the manganese peroxidase of *G. applanatum*, published by Maeda et al. [237]. Peptide 1 was identical to the published sequence, whereas peptides 2 and 3 each showed one amino acid exchange. To identify the whole sequences of both isoenzymes, the genes were amplified as described below.

5.4.3 Biochemical Characterisation of Manganese Peroxidases of *G. applanatum*

The nucleotide sequence of the *Ea.mnp1* gene published by Maeda et al. [237] was used to design primers to find the coding sequences of the two isoenzymes identified by peptide sequencing. As described in “cDNA Synthesis and Gene Amplification”, different approaches had to be used to amplify the coding sequences of both isoenzymes. Difficulties finding the ends of the *gapMnP2* gene were sorted out using gene-specific primers in regions with several base exchanges between the isoenzymes.

The coding sequences of both isoenzymes were amplified, translated into the corresponding amino acid sequences and aligned (Figure 5.3). Both sequences contained 1095 base pairs, coding for 364 amino acids with a calculated molecular mass of 38.30 (Gap MnP 1, Acc. No. CEG62472) and 38.37 kDa (Gap MnP 2, Acc. No. CEG62473). Differences of the calculated molecular mass and the protein band in the SDS-PAGE suggested a high level of glycosylation leading to a decreased mobility during electrophoresis. Glycosylation has already been described for other fungal peroxidases, such as the lignin peroxidases of *P. chrysosporium* [238]. The amino acid sequences of both isoenzymes contain four potential *N*-glycosylation sites (N X S/T). Three of these were predicted positive using NetNGlyc 1.0 [235], as highlighted grey in Figure 5.3, and at least one [SNDSQPSPPNLVPLPSDSADTLLSR] was found to be occupied by high mannose type *N*-glycans (Man₅GlcNAc₂ (10%), Man₆GlcNAc₂ (70%) and Man₇GlcNAc₂ (20%)) as indicated by mass spectrometric analysis of the tryptic peptides and confirmed by MS/MS analysis of the corresponding parent ions (data not shown). The pIs

calculated for the isoenzymes (4.27 for Gap MnP 1 and 4.25 for Gap MnP 2) differed from the apparent, native pI (2.6) of the active protein illustrated in Figure 5.2b, most probably due to adsorption of tensides to the protein or posttranscriptional modifications.

```

gapMnP1:  M F S K V F L S L V V L A S S V A A A V P T V S R R A T C T N G K T T A N D A C  40
gapMnP2:  M F S K V F L S L V V L A S S V A A A V P T V S R R A T C T N G K T T A N D A C  40

gapMnP1:  C V W F D V L D D I Q E N L F H G G Q C G E D A H E S L R L T F H D A I A F S P  80
gapMnP2:  C V W F D V L D D I Q E N L F H G G Q C G E D A H E S L R L T F H D A I A F S P  80
                #      o o#  o o      o

gapMnP1:  A L T V A G Q F G G G G A D G S I I A H S D V E L T Y P V N D G L D E I I E A S  120
gapMnP2:  A L T A A G Q F G G G G A D G S I I A H S D V E L T Y P V N D G L D E I V E A S  120

gapMnP1:  R P F A I K H N V S F G D F I Q F A G A V G V A N C N G G P Q L S F F A G R S N  160
gapMnP2:  R P F A I K H N V S F G D F I Q F A G A V G V A N C N G G P Q L S F F A G R S N  160

gapMnP1:  D S Q P S P P N L V P L P S D S A D T I L S R F S D A G F D A L E V V W L L V S  200
gapMnP2:  D S Q P S P P N L V P L P S D S A D T I L S R F S D A G F D A L E V V W L L V S  200
                o o o                o                o o o

gapMnP1:  H T V G S Q N T V D P S I A G A P F D S T P S D F D A Q F F V E T M L N G T L V  240
gapMnP2:  H T V G S Q N T V D P S I E G A P F D S T P S D F D A Q F F V E T M L N G T L V  240
                o o o o# o o                o

gapMnP1:  P G D G L H D G Q V N S P Y P G E F R L Q S D F A L S R D S R T T C E W Q K M I  280
gapMnP2:  P G D A L H D G E V N S P Y P G E F R L Q S D F V L S R D S R T T C E W Q K M I  280
                o o

gapMnP1:  A D R A N M L Q K F E V T M L K M S L L G F N Q S A L T D C S D V I P T A T G T  320
gapMnP2:  A D R A N M L Q K F E V T M L K M S L L G F N Q S A L T D C S D V I P T A T G T  320
                o

gapMnP1:  V Q D P F I P A G L T V D D L Q P A C S S S A F P T V T T V A G A A T S I P A V  360
gapMnP2:  V Q D P F I P A G L T V D D L Q P A C S S S A F P T V T I V A G T A T S I P A V  360

gapMnP1:  P L N S *  364
gapMnP2:  P L N S *  364
    
```

Figure 5.3 Amino acid sequences of two manganese peroxidase isoenzymes from *G. applanatum* (Gap MnP 1, Acc. No. CEG62472, and Gap MnP 2, Acc. No. CEG62473). Peptides identified via LC-MS are underlined, framed: differences in amino acid sequences between isoenzymes; circle: heme-binding amino acids; rhomb: manganese-binding amino acids, grey: potentially N-glycosylated asparagines.

The identity of the isoenzymes was 94 % on the DNA level, whereas only eight amino acid exchanges occurred in the translated amino acid sequences resulting in 97.8 % identity on this level (ClustalW, [234]). No differences of the isoenzymes appeared in the heme-binding, Ca-binding, Mn-binding or potentially N-glycosylated regions, as highlighted in Figure 5.3.

However, the *O*-glycosylation pattern of the isoenzymes could be different. The exchange of Thr349 (Gap MnP 1) to Ile349 (Gap MnP 2) or the exchange of Ala353 (Gap MnP 1) to Thr353 (Gap MnP 2) could result in different *O*-glycosylations. Both threonines were identified as potential glycosylation sites using NetOGlyc 4.0 [236]. *O*-glycosylation was proven to play a crucial role in the thermal stability of some fungal lignin and manganese peroxidases, for example from the basidiomycete *P. chrysosporium* [238]. The two peroxidase isoenzymes identified in the expressome of the dikaryotic cells of the basidiomycete *G. applanatum* resisted all attempts of separation, obviously because of the minor differences in the amino acid sequences. Accordingly, it was assumed that both isoenzymes possessed very similar biochemical characteristics. The analytical data given below refer to a mixture of both purified isoenzymes.

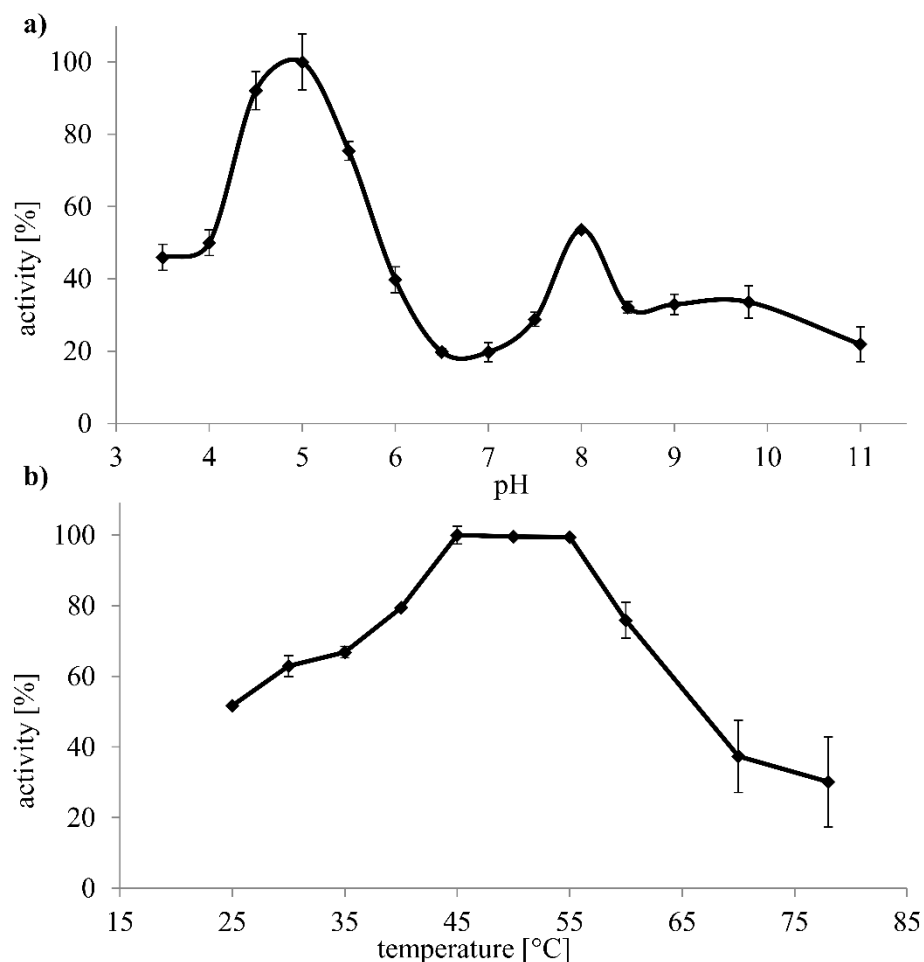


Figure 5.4 a) pH (30 °C, Britton-Robinson buffer) and b) temperature optima (pH 5.0, sodium acetate buffer) of the purified manganese peroxidases (both isoenzyme in one sample) from *G. applanatum*

A maximum β -carotene-degrading activity of the manganese peroxidases was determined in the absence of H_2O_2 at pH 4.5-5.0 (Figure 5.4a) and 45-55 °C (Figure 5.4b). A second and lower optimum was found at pH 8.0 with around 50 % residual activity. Since commercial washing agents for textiles are alkaline, the enzyme activity at pH 8.0 is of outstanding interest. So far, no manganese peroxidases with a β -carotene-degrading activity in the alkaline range were reported. A comparison with other enzymes is thus not possible. It cannot be ruled out yet that the second optimum was caused by only one of the isoenzymes. To examine the pH dependencies of the isoenzymes separately, a heterologous expression will be required.

Apart from the pH and temperature optima, the Mn^{2+} and H_2O_2 dependencies of the β -carotene-degrading activity were examined (Figures 5.5 and 5.6). Increasing the amounts of MnSO_4 up to 4 mM led to significantly higher activities. As reviewed by Hofrichter [45], manganese peroxidases form reactive Mn(III)-species which non-specifically attack organic molecules. Usually, manganese peroxidases require H_2O_2 or organic peroxides for the initiation of the reaction. The H_2O_2 dependency of the CD-activity (Figure 5.6), however, showed a significant decrease of the enzyme activity upon the addition. Even low concentrations (10 μM H_2O_2) led to a distinct decrease of the activity.

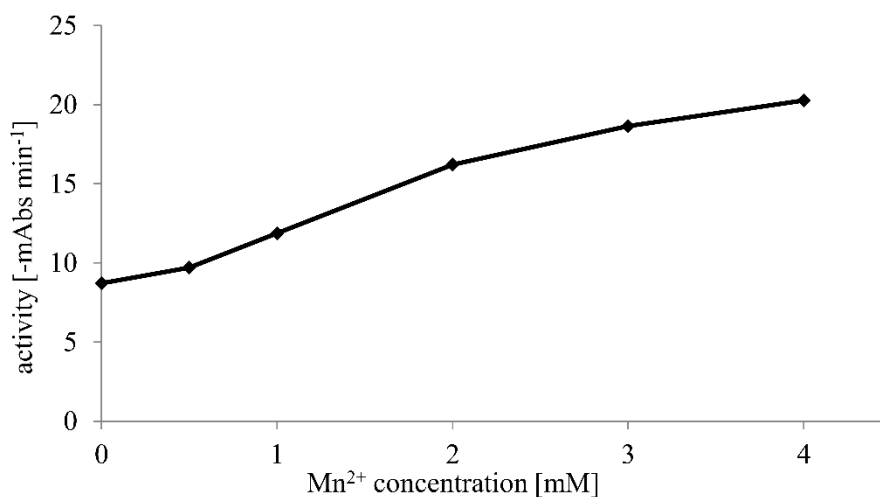


Figure 5.5 Mn^{2+} dependency of β -carotene-degrading manganese peroxidases from *G. applanatum* (pH 5.0, 30 °C, sodium acetate buffer, 4 mM MnSO_4)

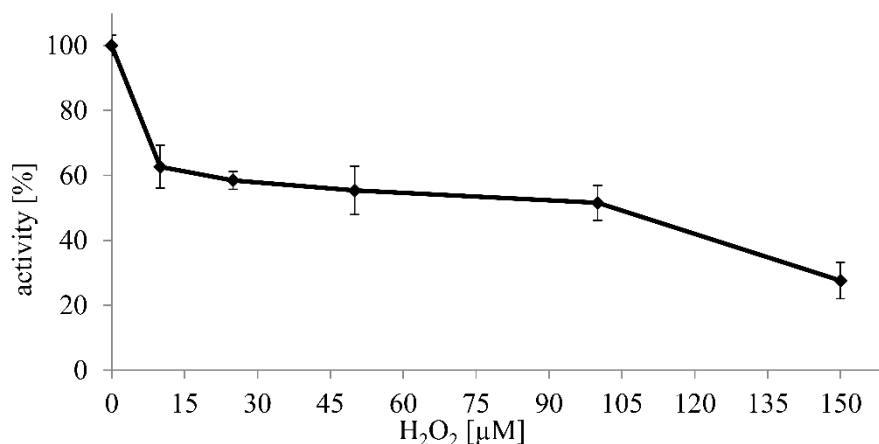


Figure 5.6 H_2O_2 dependency of carotene-degrading manganese peroxidases from *G. applanatum* (pH 5.0, 30 °C, sodium acetate buffer, 4 mM $MnSO_4$)

Higher concentrations of H_2O_2 can diminish the peroxidase function due to suicide inhibition [239] and formation of an inactive oxidative state (compound III) [111]. Nevertheless, an ABTS assay demonstrated that the peroxidase function of the enzymes was dependent on the addition of H_2O_2 , since no activity was detected in H_2O_2 -free media: ABTS turnover was only measurable after addition of H_2O_2 (50 μM). Adding the same amount of β -carotene emulsion to the ABTS assay as applied for the CD-activity assay ruled out that organic peroxides contaminating the carotene emulsion triggered the activity without addition of H_2O_2 ; no oxidised ABTS was detected. Again, ABTS activity was only perceptible after addition of 50 μM H_2O_2 . As a result, it is suggested that the oxidation of ABTS and of β -carotene proceed along different mechanisms. Other authors reported a cleavage of β -carotene by other enzymes in media free of peroxides, too, but no reaction mechanism has been identified yet [219, 223].

5.4.4 Brightening Effect of Manganese Peroxidases of *G. applanatum* on Carotenoid Emulsions Under Alkaline Washing Conditions

To evaluate a possible applicability of the manganese peroxidases in a washing process, experiments under alkaline conditions were performed. Tomato extract was used as a complex substrate containing different carotenoids that can typically be found in laundry stains and compared to the enzymatic effects on pure β -carotene. pH 8.0, continuous shaking (200 rpm) and a temperature of 30 °C were used to simulate alkaline/short time/low temperature washing conditions. UV/VIS spectra of 360-560 nm showed a maximum absorption (OD_{max}) at 480 nm for the tomato extract emulsion and 460 nm for the carotene emulsion. A high brightening

potential of the purified manganese peroxidases of *G. applanatum* was determined for the substrate β -carotene at pH 4.5 with 4 mM MnSO_4 and used as the reference (Figure 5.7a). An intense enzymatic decolourisation of β -carotene, equivalent to a brightening of 88 %, was observed after one hour of incubation at 30 °C (220 rpm). As expected by the pH optimum of the manganese peroxidases (Figure 5.4a), smaller effects were achieved under simulated alkaline washing conditions (Figure 5.7b). Nevertheless, a significant brightening effect of the enzyme was determined. After 1 h, β -carotene samples were 12 % brighter and the tomato extract samples were 20 % brighter than blank values. A brightening activity was also observed in the presence of detergent (11 % enzymatic brightening of tomato extract after 1 h at pH 8.0; 0.44 % enzyme-free premium detergent, Henkel, Düsseldorf, Germany). The results indicate that the enzymes did not only effectively cleave β -carotene, but also related compounds, such as lycopene, the main carotenoid of the tomato fruit [240] and therefore may be effective on different, complex carotenoid laundry stains.

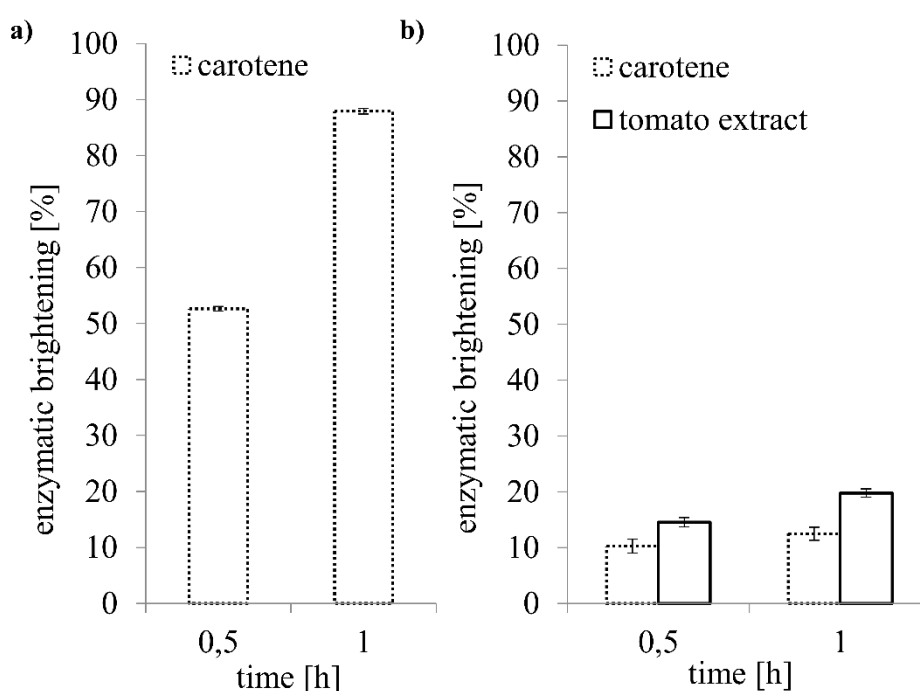


Figure 5.7 a) Brightening of β -carotene under pH-optimum conditions (pH 4.5, 220rpm, 4 mM MnSO_4 , 30 °C), and b) Brightening of tomato extract and β -carotene by the manganese peroxidase of *G. applanatum* under alkaline washing conditions (pH 8.0, 220 rpm, 30 °C), calculated as percental difference between OD_{blank} and OD_{enzyme} ($n = 3$) at the OD_{max} of the substrate emulsions

Results of the application assay underline the potential of the *G. applanatum* manganese peroxidases for an application in washing processes even though no complete brightening of the carotenoid samples was achieved. Alkaline activity was not reported for purified manganese peroxidases until now. Improvement of the enzymes may be accomplished *via* protein engineering and heterologous expression. Enzyme engineering is a common procedure to improve enzyme performance for detergent applications [198, 241]. Thus, a heterologous expression system for the two genes has to be implemented now to provide higher yields of the enzymes and both isoenzymes should be characterised individually.

5.5 Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the essential support from Henkel AG & Co. KGaA, 328 Düsseldorf, Germany. Furthermore, we wish to thank R. H. Leonhardt for his valuable assistance in molecular biology.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu oxidierenden Aktivitäten aus zwei Holzfäulepilzen gewonnen, deren biotechnologische Applikation von Interesse ist. Um die Perspektiven eines *Upscalings* und industrieller Anwendungen endgültig zu evaluieren, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Im Falle des Braunfäulepilzes *L. sulphureus* ist es mittels Markierungsversuchen gelungen, die Existenz eines hydroxylierenden Enzyms in dem Biogeneseweg von Sotolon nachzuweisen. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, werden Hydroxylierungen vornehmlich durch Oxygenasen, meist Monooxygenasen, katalysiert. Die Umsetzungsreaktion wurde bisher ausschließlich im Ganzzellsystem erfolgreich durchgeführt. Dies deutet auf eine intrazelluläre oder membranständige Enzymaktivität hin, die es in Folgearbeiten zu entschlüsseln gilt. Eine Cofaktorabhängigkeit ist in Oxygenasereaktionen sehr wahrscheinlich (vgl. Kapitel 1.2.1) und muss für die Bewertung der Applikationsmöglichkeit im Zuge einer Isolierung des Enzyms charakterisiert werden.

Flüssigkulturen des Basidiomyceten erzeugten eine recht geringe Konzentration an Sotolon. Eine Aromaproduktion in *L. sulphureus*-Kulturen scheint aus diesem Grund für großtechnische Maßstäbe ungeeignet. Wird das Enzym jedoch isoliert und charakterisiert, ergeben sich Optimierungsmöglichkeiten für einen biotechnologischen Prozess. Prozesstechnisch bietet es sich an, das Gen des Enzyms in einem schnellwachsenden Organismus heterolog zu exprimieren. Auf diese Weise ist es denkbar, im Ganzzellsystem gezielt in den Aminosäurestoffwechsel einzugreifen, so die Produktion des Aromastoffs zu fördern und größere Mengen an Sotolon zu produzieren. Allerdings ist die rechtliche Situation noch nicht vollständig geklärt, ob ein in gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) produzierter Aromastoff als „natürlich“ bezeichnet werden darf (vgl. Kapitel 1.3.3). Zudem muss die Verbraucherakzeptanz des Einsatzes von GMOs evaluiert werden.

Von besonderem wissenschaftlichem Interesse ist neben der Aromaproduktion nach wie vor das Potential zur Hydroxylierung der Aminosäure L-Isoleucin. Im Verlaufe der Arbeit wurde ausschließlich die Umsetzung der Ketosäure von Isoleucin beobachtet. Eine Nebenaktivität des Enzyms, die zur Hydroxylierung von Isoleucin führt, ist jedoch nicht auszuschließen und eine nähere Untersuchung bietet sich an. In Anschlussarbeiten sollte deshalb die Aufreinigung des Enzyms mit einer Charakterisierung des Substratspektrums einhergehen. Diese potentielle

biotechnologische Alternative zu bisherigen Produktionswegen für das Diabetesmedikament 4-Hydroxyisoleucin ist von pharmakologischer Bedeutung und sollte weiter verfolgt werden.

Im Falle des Weißfäulepilzes *G. applanatum* wurden zwei Manganperoxidase-Isoenzyme identifiziert und ihr Potential für die Entfärbung von β -Carotin im Waschprozess ermittelt. Die im Flüssigansatz durchgeführten Waschttests dienten als erste Applikationsstudie. Um die Wascheffizienz der Enzyme genauer zu untersuchen, sind nun größere Studien direkt auf Textiloberflächen und unter Maschinenwaschbedingungen notwendig. Hierfür ist eine Enzymproduktion in größerem Maßstab erforderlich.

Für eine großtechnische Nutzung der Enzyme bietet sich die Etablierung eines heterologen Expressionssystems an. Da die Glykosylierung der Manganperoxidasen oft Einfluss auf die Stabilität der Enzyme hat, ist eine Produktion in eukaryotischen Organismen sinnvoll. Die Hefen *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae* oder verschiedene Arten des Schimmelpilzes *Aspergillus* wurden in der Literatur als Expressionssysteme für fungale Enzyme herangezogen. Die Gene der Isoenzyme sollten heterolog exprimiert und die entsprechenden Manganperoxidasen einzeln für eine Applikation im Waschmittelprozess getestet werden. Bisherige Untersuchungen schließen nicht aus, dass nur eines der Isoenzyme für die alkalische Aktivität verantwortlich ist.

Ferner ermöglichen *Protein engineering*-Methoden die Enzyme für den Einsatz im Waschmittel zu optimieren. Die kürzlich von Fernández-Fuevo [116] publizierten Erkenntnisse über Manganperoxidasen dienen als erste Anhaltspunkte für eine Verbesserung: Die Aktivität und die pH-Stabilität der Enzyme sind laut der Forschungsergebnisse abhängig von der Länge ihres C-Terminus (Kapitel 1.2.2). Die Manganperoxidasen aus *G. applanatum* sind Enzyme mit einem kurzen C-Terminus. Eine Verlängerung der Enden mittels *Protein engineering* könnte somit gezielt die Stabilität im alkalischen Waschmilieu erhöhen. Doch auch Optimierungen mittels Zufallsmutagenese sind denkbar. Eine *Directed Evolution* ist für andere lignolytische Peroxidasen in dem Wirtsorganismus *S. cerevisiae* bereits durchgeführt worden [138] und sollte zur Verbesserung der Temperatur-, pH- und Lagerungsstabilität herangezogen werden. Auf diese Weise bietet sich die Perspektive, aus den Manganperoxidase-Isoenzymen effizientere Proteine für einen Einsatz im Waschmittel herzustellen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Dissertation zeigen deutlich die Vielseitigkeit an Reaktionen und Anwendungsmöglichkeiten oxidierender Aktivitäten aus Basidiomyceten. Aus

diesem Grund sollte stets nach weiteren vielversprechenden und spannenden Enzymaktivitäten in diesen Organismen gesucht werden.

7 Literatur

- [1] Hawksworth, D. L., *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. Mycological Research, **2001**. 105(12): p. 1422-1432.
- [2] Bruns, T., *Evolutionary biology: A kingdom revised*. Nature, **2006**. 443(7113): p. 758-761.
- [3] O'Brien, H. E., Parrent, J. L., et al., *Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples*. Applied and Environmental Microbiology, **2005**. 71(9): p. 5544-5550.
- [4] Blackwell, M., *The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?* American Journal of Botany, **2011**. 98(3): p. 426-438.
- [5] Dix, N. J. and Webster, J., *Fungal ecology*. 1st ed. **1995**, Chapman & Hall: London.
- [6] Webster, J. and Weber, R. W. S., *Introduction to Fungi*. 3rd ed. **2007**, Cambridge University Press: Cambridge.
- [7] Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M., *Introductory Mycology*. 4th ed. **1996**, John Wiley & Sons: New York.
- [8] Weber, R. W. S. and Pitt, D., *Filamentous fungi — growth and physiology*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, George, G. K. and Dilip, K. A., Editors. **2001**, Elsevier. p. 13-54.
- [9] Smith, S. E. and Read, D. J., *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. **1997**, Academic Press: London.
- [10] Simon, L., Bousquet, J., et al., *Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants*. Nature, **1993**. 363(6424): p. 67-69.
- [11] Peberdy, J. F., *Protein secretion in filamentous fungi — trying to understand a highly productive black box*. Trends in Biotechnology, **1994**. 12(2): p. 50-57.
- [12] Peberdy, J. F., Wallis, G. L. F., and Archer, D. B., *Protein secretion by fungi*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, George, G. K. and Dilip, K. A., Editors. **2001**, Elsevier. p. 73-114.
- [13] Griffin, D. H., *Fungal physiology*. 2nd ed. **1994**, Wiley & Sons: New York.
- [14] James, T. Y., Kauff, F., et al., *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny*. Nature, **2006**. 443(7113): p. 818-822.

- [15] Kirk, P. M., Cannon, P. F., et al., *Dictionary of Fungi*. 10th ed. **2008**, CABI Publishing: Wallingford.
- [16] Hibbett, D. S., *A phylogenetic overview of the Agaricomycotina*. *Mycologia*, **2006**. 98(6): p. 917-925.
- [17] Schopfer, P. and Brennicke, A., *Pflanzenphysiologie*. **2010**, Spectrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- [18] Eriksson, K. E., Blanchette, R. A., and Ander, P., *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. **1990**, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- [19] Eastwood, D. C., Floudas, D., et al., *The Plant Cell Wall–Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi*. *Science*, **2011**. 333(6043): p. 762-765.
- [20] Martinez, A. T., Speranza, M., et al., *Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. *Int. Microbiol.*, **2005**. 8: p. 195-204.
- [21] Otjen, L., Blanchette, R., et al., *Assessment of 30 White Rot Basidiomycetes for Selective Lignin Degradation*, in *Holzforschung*, **1987**. p. 343.
- [22] Fackler, K., Gradinger, C., et al., *Biotechnological wood modification with selective white-rot fungi and its molecular mechanisms*. *Food Technol. Biotechnol.*, **2007**. 45(3): p. 269-276.
- [23] Daniel, G., *Microview of Wood under Degradation by Bacteria and Fungi*, in *Wood Deterioration and Preservation*, Goodell, B., Nicholas, D. D., and Schultz, T. P., Editors. **2003**, American Chemical Society: New York. p. 34-72.
- [24] Schilling, J. S., Ai, J., et al., *Lignocellulose modifications by brown rot fungi and their effects, as pretreatments, on cellulolysis*. *Bioresource Technology*, **2012**. 116(0): p. 147-154.
- [25] Filley, T. R., Cody, G. D., et al., *Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi*. *Organic Geochemistry*, **2002**. 33(2): p. 111-124.
- [26] Irbe, I., Andersons, B., et al., *On the changes of pinewood (Pinus sylvestris L.) Chemical composition and ultrastructure during the attack by brown-rot fungi Postia placenta and Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2006**. 57(2): p. 99-106.
- [27] Klug, P. and Lewald-Brudi, M., *Holzzersetzende Pilze*. 1st ed. **2012**, Arbus-Verlag: Bad Boll.

-
- [28] Weber, R. W. S., Mucci, A., and Davoli, P., *Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete Laetiporus sulphureus (Polyporales, Fungi)*. Tetrahedron Letters, **2004**. 45(5): p. 1075-1078.
- [29] Davoli, P., Mucci, A., et al., *Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of Laetiporus sulphureus (Polyporales, Fungi)*. Phytochemistry, **2005**. 66(7): p. 817-823.
- [30] Petrovic, J., Stojkovic, D., et al., *Study on chemical, bioactive and food preserving properties of Laetiporus sulphureus (Bull.: Fr.) Murr.* Food & Function, **2014**. 5(7): p. 1441-1451.
- [31] Turkoglu, A., Duru, M. E., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill*. Food Chemistry, **2007**. 101(1): p. 267-273.
- [32] Paterson, R. R. M., *Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory*. Phytochemistry, **2006**. 67(18): p. 1985-2001.
- [33] Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., et al., *Exopolysaccharide from Ganoderma applanatum as a Promising Bioactive Compound with Cytostatic and Antibacterial Properties*. BioMed Research International, **2014**. (2014): p. 10, DOI: 10.1155/2014/743812.
- [34] Xu, F., *Applications of oxidoreductases: Recent progress*. Industrial Biotechnology, **2005**. 1(1): p. 38-50.
- [35] Moss, G. P. *Enzyme Nomenclature*. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [cited 13. February 2015]. Available from: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- [36] Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th ed. **2011**, Springer Verlag: Heidelberg.
- [37] Adam, W., Lazarus, M., et al., *Biotransformations with Peroxidases*, in *Biotransformations*, Faber, K., Editor. **1999**, Springer: Berlin Heidelberg. p. 73-108.
- [38] Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., et al., *Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications*. Journal of Biotechnology, **2010**. 146(1-2): p. 9-24.
- [39] Burton, S. G., *Oxidizing enzymes as biocatalysts*. Trends in Biotechnology, **2003**. 21(12): p. 543-549.
- [40] Gamemara, D., Seoane, G. A., et al., *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. 1st ed. **2013**, John Wiley & Sons: Hoboken.
-

- [41] Jaussi, R. and Christen, P., *14 Glykolyse und Citratzyklus*, in *Biochemie, eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. **2005**, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- [42] Zámocký, M. and Obinger, C., *Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases*, in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Torres, E. and Ayala, M., Editors. **2010**, Springer: Berlin Heidelberg. p. 7-35.
- [43] Flohé, L., *Selen im Peroxidstoffwechsel*. Medizinische Klinik, **1997**. 92(3): p. 5-7.
- [44] de Boer, E. and Wever, R., *The reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis*. Journal of Biological Chemistry, **1988**. 263(25): p. 12326-32.
- [45] Hofrichter, M., *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*. Enzyme and Microbial Technology, **2002**. 30(4): p. 454-466.
- [46] O'Brien, P. J., *Peroxidases*. Chemico-Biological Interactions, **2000**. 129(1-2): p. 113-139.
- [47] Poulos, T. L., *Peroxidases*. Current Opinion in Biotechnology, **1993**. 4(4): p. 484-489.
- [48] Welinder, K. G., *Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases*. Current Opinion in Structural Biology, **1992**. 2(3): p. 388-393.
- [49] Zámocký, M., Hofbauer, S., et al., *Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **2015**. in press: p. 12, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.025>.
- [50] de Montellano, P. R. O., *Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases*, in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Torres, E. and Ayala, M., Editors. **2010**, Springer: Berlin Heidelberg. p. 79-107.
- [51] Baek, H. K. and Van Wart, H. E., *Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum*. Biochemistry, **1989**. 28(14): p. 5714-5719.
- [52] Shintaku, M., Matsuura, K., et al., *Absence of a Detectable Intermediate in the Compound I Formation of Horseradish Peroxidase at Ambient Temperature*. Journal of Biological Chemistry, **2005**. 280(49): p. 40934-40938.
- [53] Poulos, T. L. and Kraut, J., *The stereochemistry of peroxidase catalysis*. Journal of Biological Chemistry, **1980**. 255(17): p. 8199-8205.
- [54] Dawson, J., *Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases*. Science, **1988**. 240(4851): p. 433-439.

-
- [55] Zhang, Y. and Gascón, J. A., *QM/MM investigation of structure and spectroscopic properties of a vanadium-containing peroxidase*. Journal of Inorganic Biochemistry, **2008**. 102(8): p. 1684-1690.
- [56] de Montellano, P. R. O. and Grab, L. A., *Cooxidation of styrene by horseradish peroxidase and phenols: a biochemical model for protein-mediated cooxidation*. Biochemistry, **1987**. 26(17): p. 5310-5314.
- [57] Noctor, G. and Foyer, C. H., *ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **1998**. 49(1): p. 249-279.
- [58] Tafazoli, S. and O'Brien, P. J., *Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs*. Drug Discovery Today, **2005**. 10(9): p. 617-625.
- [59] Sono, M., Roach, M. P., et al., *Heme-Containing Oxygenases*. Chemical Reviews, **1996**. 96(7): p. 2841-2888.
- [60] Ullrich, R. and Hofrichter, M., *Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds*. Cellular and Molecular Life Sciences, **2007**. 64(3): p. 271-293.
- [61] Li, Z., van Beilen, J. B., et al., *Oxidative biotransformations using oxygenases*. Current Opinion in Chemical Biology, **2002**. 6(2): p. 136-144.
- [62] Urlacher, V. B. and Schmid, R. D., *Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations*. Current Opinion in Chemical Biology, **2006**. 10(2): p. 156-161.
- [63] van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., and Fraaije, M. W., *Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts*. Journal of Biotechnology, **2006**. 124(4): p. 670-689.
- [64] Fetzner, S., *Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2002**. 60(3): p. 243-257.
- [65] Blank, L. M., Ebert, B. E., et al., *Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis*. Antioxidants & Redox Signaling, **2010**. 13(3): p. 349-394.
- [66] Ichinose, H., *Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications*. Biotechnology and Applied Biochemistry, **2013**. 60(1): p. 71-81.
- [67] Graham, S. E. and Peterson, J. A., *How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us?* Archives of Biochemistry and Biophysics, **1999**. 369(1): p. 24-29.
- [68] Li, H. and Poulos, T. L., *The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid*. Nat Struct Mol Biol, **1997**. 4(2): p. 140-146.
-

- [69] Bernhardt, R., *Cytochromes P450 as versatile biocatalysts*. Journal of Biotechnology, **2006**. 124(1): p. 128-145.
- [70] Chen, P. and Solomon, E. I., *O₂ activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2004**. 101(36): p. 13105-13110.
- [71] Meliá, C., Ferrer, S., et al., *Investigation of the Hydroxylation Mechanism of Noncoupled Copper Oxygenases by Ab Initio Molecular Dynamics Simulations*. Chemistry – A European Journal, **2013**. 19(51): p. 17328-17337.
- [72] Klinman, J. P., *The Copper-Enzyme Family of Dopamine β -Monooxygenase and Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase: Resolving the Chemical Pathway for Substrate Hydroxylation*. Journal of Biological Chemistry, **2006**. 281(6): p. 3013-3016.
- [73] Yamazaki, S., Morioka, C., and Itoh, S., *Kinetic Evaluation of Catalase and Peroxygenase Activities of Tyrosinase*. Biochemistry, **2004**. 43(36): p. 11546-11553.
- [74] Halaouli, S., Asther, M., et al., *Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications*. Journal of Applied Microbiology, **2006**. 100(2): p. 219-232.
- [75] Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E., *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chemical Reviews, **1996**. 96(7): p. 2563-2606.
- [76] Malmström, B. G. and Leckner, J., *The chemical biology of copper*. Current Opinion in Chemical Biology, **1998**. 2(2): p. 286-292.
- [77] Huijbers, M. M. E., Montersino, S., et al., *Flavin dependent monooxygenases*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **2014**. 544(0): p. 2-17.
- [78] Ceccoli, R. D., Rial, D. V., and Bianchi, D. A., *Flavoprotein monooxygenases for oxidative biocatalysis: recombinant expression in microbial hosts and applications*. Frontiers in Microbiology, **2014**. 5(1): p. 25.
- [79] Massey, V., *Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins*. Journal of Biological Chemistry, **1994**. 269(36): p. 22459-62.
- [80] Sutton, W. B., *Mechanism of action and crystallization of lactic oxidative decarboxylase from Mycobacterium phlei*. Journal of Biological Chemistry, **1957**. 226: p. 395-405.
- [81] Maeda-Yorita, K., Aki, K., et al., *L-lactate oxidase and L-lactate monooxygenase: Mechanistic variations on a common structural theme*. Biochimie, **1995**. 77(7–8): p. 631-642.

-
- [82] Steiner, R. A., Meyer-Klaucke, W., and Dijkstra, B. W., *Functional Analysis of the Copper-Dependent Quercetin 2,3-Dioxygenase. 2. X-ray Absorption Studies of Native Enzyme and Anaerobic Complexes with the Substrates Quercetin and Myricetin*. *Biochemistry*, **2002**. 41(25): p. 7963-7968.
- [83] Cochrane, R. V. K. and Vederas, J. C., *Highly Selective but Multifunctional Oxygenases in Secondary Metabolism*. *Accounts of Chemical Research*, **2014**. 47(10): p. 3148-3161.
- [84] Solomon, E. I., Brunold, T. C., et al., *Geometric and Electronic Structure/Function Correlations in Non-Heme Iron Enzymes*. *Chemical Reviews*, **2000**. 100(1): p. 235-350.
- [85] Chrispeels, M. J., *Prolyl hydroxylase in plants*, in *Methods in Enzymology*, Finn Wold, K. M., Editor. **1984**, Academic Press. p. 361-369.
- [86] Hibi, M. and Ogawa, J., *Characteristics and biotechnology applications of aliphatic amino acid hydroxylases belonging to the Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2014**. 98(9): p. 3869-3876.
- [87] Stapon, A., Li, R., and Townsend, C. A., *Synthesis of (3S,5R)-Carbapenam-3-carboxylic Acid and Its Role in Carbapenam Biosynthesis and the Stereo-inversion Problem*. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**. 125(51): p. 15746-15747.
- [88] Stapon, A., Li, R., and Townsend, C. A., *Carbapenam Biosynthesis: Confirmation of Stereochemical Assignments and the Role of CarC in the Ring Stereo-inversion Process from L-Proline*. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**. 125(28): p. 8486-8493.
- [89] Phelan, R. M. and Townsend, C. A., *Mechanistic Insights into the Bifunctional Non-Heme Iron Oxygenase Carbapenam Synthase by Active Site Saturation Mutagenesis*. *Journal of the American Chemical Society*, **2013**. 135(20): p. 7496-7502.
- [90] Hegg, E. L. and Que, L., Jr., *The 2-His-1-carboxylate facial triad. An emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes*. *European Journal of Biochemistry*, **1997**. 250(3): p. 625-629.
- [91] Costas, M., Mehn, M. P., et al., *Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates*. *Chemical Reviews*, **2004**. 104(2): p. 939-986.
- [92] Bertini, I., Cremonini, M. A., et al., *Arene hydroxylases: metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds*. *Coordination Chemistry Reviews*, **1996**. 151(0): p. 145-160.
- [93] Ivanov, I., Heydeck, D., et al., *Molecular enzymology of lipoxygenases*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2010**. 503(2): p. 161-174.
-

- [94] Andreou, A. and Feussner, I., *Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism*. *Phytochemistry*, **2009**. 70(13–14): p. 1504-1510.
- [95] Plagemann, I., Zelena, K., et al., *LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**. 87(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 99-104.
- [96] Tasaki, Y., Toyama, S., et al., *Molecular characterization of a lipoxygenase from the basidiomycete mushroom *Pleurotus ostreatus**. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2013**. 77(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): p. 38-45.
- [97] Keller, N. P., Turner, G., and Bennett, J. W., *Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics*. *Nature Reviews Microbiology*, **2005**. 3(12): p. 937-947.
- [98] Bradley, E. S., Robinson, S. J., and Kelleher, N. L., *Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis in vitro and in vivo*. *Fungal Genetics and Biology*, **2011**. 48(1): p. 49-61.
- [99] Rohlfs, M. and Churchill, A. C. L., *Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods*. *Fungal Genetics and Biology*, **2011**. 48(1): p. 23-34.
- [100] Manavalan, T., Manavalan, A., and Heese, K., *Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi*. *Current Microbiology*, **2015**. 70(4): p. 485-498.
- [101] Hemsworth, G. R., Davies, G. J., and Walton, P. H., *Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases*. *Current Opinion in Structural Biology*, **2013**. 23(5): p. 660-668.
- [102] Cameron, M. D. and Aust, S. D., *Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2001**. 28(2–3): p. 129-138.
- [103] Kirk, T. K. and Farrell, R. L., *Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin*. *Annual Review of Microbiology*, **1987**. 41(1): p. 465-501.
- [104] Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., and Hildén, K., *Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review*. *Journal of Basic Microbiology*, **2010**. 50(1): p. 5-20.
- [105] Floudas, D., Binder, M., et al., *The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes*. *Science*, **2012**. 336(6089): p. 1715-1719.
- [106] Larrondo, L. F., Lobos, S., et al., *Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium**. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**. 67(5): p. 2070-2075.

-
- [107] Martinez, A. T., *Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**. 30(4): p. 425-444.
- [108] Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H., *Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators*. *Journal of Biological Chemistry*, **1992**. 267(33): p. 23688-95.
- [109] Kuan, I. C., Johnson, K. A., and Tien, M., *Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes*. *Journal of Biological Chemistry*, **1993**. 268(27): p. 20064-70.
- [110] Gold, M. H., Youngs, H. L., and Sollewijn Gelpke, M. D., *Manganese peroxidase. Metal Ions in Biological Systems*, **2000**. 37: p. 559-586.
- [111] Wariishi, H., Akileswaran, L., and Gold, M. H., *Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle*. *Biochemistry*, **1988**. 27(14): p. 5365-5370.
- [112] Shah, V. and Nerud, F., *Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization*. *Canadian Journal of Microbiology*, **2002**. 48(10): p. 857-70.
- [113] Kishi, K., Wariishi, H., et al., *Mechanism of Manganese Peroxidase Compound II Reduction. Effect of Organic Acid Chelators and pH*. *Biochemistry*, **1994**. 33(3): p. 8694-701.
- [114] Johnson, F., Loew, G. H., and Du, P., *Homology models of two isoenzymes of manganese peroxidase: prediction of a Mn(II) binding site*. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **1994**. 20(4): p. 312-19.
- [115] Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F. J., et al., *Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability*. *Biotechnology for Biofuels*, **2014**. 7(2): p. 2/1-2/23.
- [116] Fernández-Fueyo, E., Acebes, S., et al., *Structural implications of the C-terminal tail in the catalytic and stability properties of manganese peroxidases from ligninolytic fungi*. *Acta Crystallographica Section D*, **2014**. 70(12): p. 3253-3265.
- [117] Sundaramoorthy, M., Gold, M. H., and Poulos, T. L., *Ultrahigh (0.93 Å) resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Implications for the catalytic mechanism*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2010**. 104(6): p. 683-690.
- [118] Ruiz-Dueñas, F. J., Lundell, T., et al., *Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes*. *Mycologia*, **2013**. 105(6): p. 1428-1444.
-

- [119] Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H., *Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, **1989**. 28(14): p. 6017-23.
- [120] Tuor, U., Wariishi, H., et al., *Oxidation of phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound*. *Biochemistry*, **1992**. 31(21): p. 4986-95.
- [121] Kapich, A., Hofrichter, M., et al., *Coupling of Manganese Peroxidase-Mediated Lipid Peroxidation with Destruction of Nonphenolic Lignin Model Compounds and ^{14}C -Labeled Lignins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1999**. 259(1): p. 212-219.
- [122] Kapich, A. N., Jensen, K. A., and Hammel, K. E., *Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation*. *FEBS Letters*, **1999**. 461(1-2): p. 115-119.
- [123] Perez, J. and Jeffries, T. W., *Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1992**. 58(8): p. 2402-9.
- [124] Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., et al., *Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide*. *FEBS Letters*, **1998**. 434(3): p. 362-366.
- [125] Claus, H., *Laccases: structure, reactions, distribution*. *Micron*, **2004**. 35(1-2): p. 93-96.
- [126] Teeri, T. and Henriksson, G., *Enzymes Degrading Wood Components*, in *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, Ek, M., Gellerstedt, G., and Henriksson, G., Editors. **2009**, Walter de Gruyter: Berlin, Boston.
- [127] Evans, C., Gallagher, I., et al., *Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose*. *Biodegradation*, **1991**. 2(2): p. 93-106.
- [128] Flournoy, D. S., Paul, J. A., et al., *Changes in the Size and Volume of Pores in Sweetgum Wood During Simultaneous Rot by Phanerochaete chrysosporium Burds*, in *Holzforschung*, **1993**. p. 297.
- [129] Tanaka, H., Itakura, S., et al., *An Extracellular Substance from the White-Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium for Reducing Molecular Oxygen and Ferric Iron*. *Holzforschung*, **1996**. 50(6): p. 541.
- [130] Blanchette, R. A., Krueger, E. W., et al., *Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, Ceriporiopsis subvermispora*. *Journal of Biotechnology*, **1997**. 53(2-3): p. 203-213.

-
- [131] Enoki, A., Itakura, S., and Tanaka, H., *The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi*. Journal of Biotechnology, **1997**. 53(2–3): p. 265-272.
- [132] Hammel, K. E., Kapich, A. N., et al., *Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi*. Enzyme and Microbial Technology, **2002**. 30(4): p. 445-453.
- [133] Tanaka, H., Itakura, S., and Enoki, A., *Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor**. Journal of Biotechnology, **1999**. 75(1): p. 57-70.
- [134] Goldstein, S., Meyerstein, D., and Czapski, G., *The Fenton reagents*. Free Radical Biology and Medicine, **1993**. 15(4): p. 435-445.
- [135] Goodell, B., Jellison, J., et al., *Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood*. Journal of Biotechnology, **1997**. 53(2,3): p. 133-162.
- [136] Faison, B. D. and Kirk, T. K., *Relationship Between Lignin Degradation and Production of Reduced Oxygen Species by *Phanerochaete chrysosporium**. Applied and Environmental Microbiology, **1983**. 46(5): p. 1140-1145.
- [137] Goodell, B., Qian, Y., et al., *Lignocellulose oxidation by low molecular weight metal-binding compounds isolated from wood degrading fungi: A comparison of brown rot and white rot systems and the potential application of chelator-mediated Fenton reactions*, in *Progress in Biotechnology*, Viikari, L. and Lantto, R., Editors. **2002**, Elsevier. p. 37-47.
- [138] Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., et al., *Search, engineering, and applications of new oxidative biocatalysts*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, **2014**. 8(6): p. 819-835.
- [139] Saxena, R. K., Gupta, R., et al., *Role of fungal enzymes in food processing*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, George, G. K. and Dilip, K. A., Editors. **2001**, Elsevier. p. 353-386.
- [140] Anastas, P. and Eghbali, N., *Green Chemistry: Principles and Practice*. Chemical Society Reviews, **2010**. 39(1): p. 301-312.
- [141] Borges, K. B., Borges, W. d. S., et al., *Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts*. Tetrahedron: Asymmetry, **2009**. 20(4): p. 385-397.
- [142] Kodera, T., Smirnov, S. V., et al., *A novel *L*-isoleucine hydroxylating enzyme, *L*-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **2009**. 390(3): p. 506-510.
-

- [143] Wang, Q., Ouazzani, J., et al., *A practical synthesis of (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potent insulinotropic α -amino acid from fenugreek*. Eur. J. Org. Chem., **2002**(5): p. 834-839.
- [144] Rolland-Fulcrand, V., Rolland, M., et al., *Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, an insulinotropic amino acid isolated from fenugreek seeds*. Eur. J. Org. Chem., **2004**(4): p. 873-877.
- [145] Ogawa, J., Kodera, T., et al., *A novel l-isoleucine metabolism in Bacillus thuringiensis generating (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2011**. 89(6): p. 1929-1938.
- [146] Buchholz, K., Kasche, V., and Bornscheuer, U. T., *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2nd ed. **2012**, Wiley-Blackwell: Weinheim.
- [147] Carballeira, J. D., Quezada, M. A., et al., *Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions*. Biotechnology Advances, **2009**. 27(6): p. 686-714.
- [148] Torrelo, G., Hanefeld, U., and Hollmann, F., *Biocatalysis*. Catalysis Letters, **2015**. 145(1): p. 309-345.
- [149] Ghorai, S., Banik, S. P., et al., *Fungal biotechnology in food and feed processing*. Food Research International, **2009**. 42(5-6): p. 577-587.
- [150] Adrio, J. L. and Demain, A. L., *Fungal biotechnology*. International Microbiology, **2003**. 6(3): p. 191-199.
- [151] Archer, D. B., *Filamentous fungi as microbial cell factories for food use*. Current Opinion in Biotechnology, **2000**. 11(5): p. 478-483.
- [152] Holland, H. L. and Weber, H. K., *Enzymatic hydroxylation reactions*. Current Opinion in Biotechnology, **2000**. 11(6): p. 547-553.
- [153] Maciel, M. J. M., Silva, A. C., and Ribeiro, H. C. T., *Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review*. Electronic Journal of Biotechnology, **2010**. 13(6): p., DOI: <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>.
- [154] Singh, A. P. and Singh, T., *Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review*. Biomass and Bioenergy, **2014**. 62(0): p. 198-206.
- [155] Kluge, M., Ullrich, R., et al., *Formation of naphthalene hydrates in the enzymatic conversion of 1,2-dihydronaphthalene by two fungal peroxygenases and subsequent naphthalene formation*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2014**. 103: p. 56-60.
- [156] Karich, A., Kluge, M., et al., *Benzene oxygenation and oxidation by the peroxygenase of Agroclybe aegerita*. AMB Express, **2013**. 3(1): p. 1-8.

-
- [157] Bazanella, G. C. d. S., Araujo, C. A. V., et al., *Ligninolytic enzymes from white-rot fungi and application in the removal of synthetic dyes*, in *Fungal Enzymes*, Polizeli, M. d. L. T. M. and Rai, M., Editors. **2013**, CRC Press: Boca Raton. p. 258-279.
- [158] Wainwright, M., *Biotechnologie mit Pilzen - eine Einführung*. **1995**, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- [159] Mardones, L., Gomide, J. L., et al., *Kraft pulping of Eucalyptus nitens wood chips biotreated by Ceriporiopsis subvermisporea*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **2006**. 81(4): p. 608-613.
- [160] Hillis, W. E. and Sumimoto, M., *Effect of Extractives on Pulping*, in *Natural Products of Woody Plants*, Rowe, J., Editor. **1989**, Springer Berlin Heidelberg. p. 880-920.
- [161] del Río, J. C., Gutiérrez, A., et al., *Application of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry to the analysis of pitch deposits and synthetic polymers in pulp and pulp mills*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **1999**. 49(1-2): p. 165-177.
- [162] Gutiérrez, A., del Río, J. C., et al., *Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase–mediator system*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2006**. 72(4): p. 845-851.
- [163] Dorado, J., van Beek, T. A., et al., *Degradation of lipophilic wood extractive constituents in Pinus sylvestris by the white-rot fungi Bjerkandera sp. and Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology*, **2001**. 35(1-2): p. 117-125.
- [164] Taherzadeh, M. and Karimi, K., *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review*. *International Journal of Molecular Sciences*, **2008**. 9(9): p. 1621-1651.
- [165] Ferreira, L., Aguiar, M., et al., *Selection of vinasse degrading microorganisms*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2010**. 26(9): p. 1613-1621.
- [166] Ferreira, L. F. R., Lopez, A. M. Q., et al., *Biodegradation of vinasse: fungal lignolytic enzymes and their application in the bioethanol industry*, in *Fungal Enzymes*, Polizeli, M. d. L. T. M. and Rai, M., Editors. **2013**, CRC Press: Boca Raton. p. 65-93.
- [167] Bamforth, S. M. and Singleton, I., *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **2005**. 80(7): p. 723-736.
- [168] Ma, L., Zhuo, R., et al., *Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus Ganoderma sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China*. *Biochemical Engineering Journal*, **2014**. 82(0): p. 1-9.
-

- [169] Hamid, M. and Khalil ur, R., *Potential applications of peroxidases*. Food Chemistry, **2009**. 115(4): p. 1177-1186.
- [170] Ehlers, G. A. and Rose, P. D., *Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation*. Bioresource Technology, **2005**. 96(11): p. 1264-1275.
- [171] Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S., and Gold, M. H., *Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Phanerochaete chrysosporium: Involvement of reductive dechlorination*. Journal of Bacteriology, **1998**. 180(19): p. 5159-5164.
- [172] Hung, R., Lee, S., and Bennett, J., *Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2015**. in press: p. 1-11, DOI: 10.1007/s00253-015-6494-4.
- [173] Berger, R. G., *Aroma Biotechnology*. **1995**, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- [174] Abraham, B. G. and Berger, R. G., *Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1994**. 42(10): p. 2344-2348.
- [175] Lomascolo, A., Stentelaire, C., et al., *Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry*. Trends in Biotechnology, **1999**. 17(7): p. 282-289.
- [176] Vandamme, E. J. and Soetaert, W., *Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, **2002**. 77(12): p. 1323-1332.
- [177] Berger, R., *Biotechnology of flavours—the next generation*. Biotechnology Letters, **2009**. 31(11): p. 1651-1659.
- [178] EU, *VERORDNUNG (EG) Nr. 1334/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln*. **2008**
- [179] Guentert, M., *The Flavour and Fragrance Industry—Past, Present, and Future*, in *Flavours and Fragrances*, Berger, R., Editor. **2007**, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 1-14.
- [180] Bosse, A. K., Fraatz, M. A., and Zorn, H., *Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes*. Food Chemistry, **2013**. 141(3): p. 2952-2959.
- [181] Weisburger, J. H., *Specific Maillard reactions yield powerful mutagens and carcinogens*. Special Publication - Royal Society of Chemistry, **1994**. 151(Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health): p. 335-40.

-
- [182] Boeker, A., Fischer, M., and Berger, R. G., *Raspberry Ketone from Submerged Cultured Cells of the Basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa**. *Biotechnology Progress*, **2001**. 17(3): p. 568-572.
- [183] Zelena, K., Hardebusch, B., et al., *Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(21): p. 9951-9955.
- [184] Zorn, H., Langhoff, S., et al., *Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2003**. 62(4): p. 331-336.
- [185] Kruegener, S., Schaper, C., et al., *Pleurotus species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides*. *Bioresource Technology*, **2009**. 100(11): p. 2855-2860.
- [186] Krings, U., Lehnert, N., et al., *Autoxidation versus Biotransformation of α -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of α -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(21): p. 9944-9950.
- [187] Fraatz, M. A., Riemer, S. J. L., et al., *A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**. 61(3-4): p. 202-207.
- [188] Krings, U., Grimrath, A., et al., *Volatiles responsible for the seasoning-like flavour of cell cultures of *Laetiporus sulphureus**. *Flavour and Fragrance Journal*, **2011**. 26(3): p. 174-179.
- [189] Blank, I. and Schieberle, P., *Analysis of the seasoning-like flavour substances of a commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.)*. *Flavour and Fragrance Journal*, **1993**. 8(4): p. 191-195.
- [190] Shankaracharya, N. B., Anandaraman, S., and Natarajan, C. P., *Chemical composition of raw and roasted fenugreek seeds*. *Journal of Food Science and Technology*, **1973**. 10(4): p. 179-81.
- [191] Steinhaus, P. and Schieberle, P., *Characterization of the Key Aroma Compounds in Soy Sauce Using Approaches of Molecular Sensory Science*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(15): p. 6262-6269.
- [192] Takahashi, K., Tadenuma, M., and Sato, S., *3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, a Burnt Flavoring Compound from Aged Sake*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1976**. 40(2): p. 325-330.
- [193] Pons, A., Lavigne, V., et al., *Distribution and Organoleptic Impact of Sotolon Enantiomers in Dry White Wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(5): p. 1606-1610.
-

- [194] König, T., Gutsche, B., et al., *3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (Sotolon) Causing an Off-Flavor: Elucidation of Its Formation Pathways during Storage of Citrus Soft Drinks*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1999**. 47(8): p. 3288-3291.
- [195] Blank, I., Lin, J., et al., *Formation of 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (Sotolone) from 4-Hydroxy-L-isoleucine and 3-Amino-4,5-dimethyl-3,4-dihydro-2(5H)-furanone*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1996**. 44(7): p. 1851-1856.
- [196] Wagner, G., *Waschmittel - Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit*. 4th ed. **2010**, Wiley-VCH: Weinheim.
- [197] Rähse, W., *Enzyme für Waschmittel / Enzymes for Detergents*. Chemie Ingenieur Technik, **2012**. 84(12): p. 2152-2163.
- [198] Gupta, R., Beg, Q., and Lorenz, P., *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2002**. 59(1): p. 15-32.
- [199] Husum, T. L. and Friis-Jensen, S., *Wash the gray away: ultimate whiteness with a new cellulose*. SOFW Journal, **2007**. 133(11): p. 40-44.
- [200] Westdijk, Q., Richter, G., et al., *Mannanase - enzyme functionality for stain removal*. SOFW Journal, **2004**. 130(6): p. 37-40.
- [201] Rowe, D., *Fun with Furans*. Chemistry & Biodiversity, **2004**. 1(12): p. 2034-2041.
- [202] Masuda, M., Okawa, E., et al., *Identification of 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and Ethyl 9-Hydroxynonanoate in Botrytised Wine and Evaluation of the Roles of Compounds Characteristic of It*. Agricultural and Biological Chemistry, **1984**. 48(11): p. 2707-2710.
- [203] Barbe, J.-C., Pineau, B., and Ferreira, A. C. S., *Instrumental and Sensory Approaches for the Characterization of Compounds Responsible for Wine Aroma*. Chemistry & Biodiversity, **2008**. 5(6): p. 1170-1183.
- [204] Mebazaa, R., Mahmoudi, A., et al., *Characterisation of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds*. Food Chemistry, **2009**. 115(4): p. 1326-1336.
- [205] Mazza, G., Di Tommaso, D., and Foti, S., *Volatile constituents of sicilian fenugreek (Trigonella foenum graecum L.) seeds*. Sciences des Aliments, **2002**. 22(3): p. 249-264.
- [206] Haefelé, C., Bonfils, C., and Sauvaire, Y., *Characterization of a dioxygenase from Trigonella foenum-graecum involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis*. Phytochemistry, **1997**. 44(4): p. 563-566.
- [207] Sauvaire, Y., Petit, P., et al., *4-Hydroxyisoleucine: A Novel Amino Acid Potentiator of Insulin Secretion*. Diabetes, **1998**. 47(2): p. 206-210.

-
- [208] Umamo, K., Hagi, Y., et al., *Volatile constituents of green and ripened pineapple (Ananas comosus [L.] Merr.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1992**. 40(4): p. 599-603.
- [209] Culleré, L., Escudero, A., et al., *Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**. 52(6): p. 1653-1660.
- [210] Supriyadi, Suhardi, et al., *Changes in the Volatile Compounds and in the Chemical and Physical Properties of Snake Fruit (Salacca edulis Reinw) Cv. Pondoh during Maturation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2002**. 50(26): p. 7627-7633.
- [211] Valim, M. F., Rouseff, R. L., and Lin, J., *Gas Chromatographic-Olfactometric Characterization of Aroma Compounds in Two Types of Cashew Apple Nectar*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2003**. 51(4): p. 1010-1015.
- [212] Schnermann, P. and Schieberle, P., *Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1997**. 45(3): p. 867-872.
- [213] *KEGG PATHWAY Database*. [cited 10. September 2013]. Available from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
- [214] Nissen, S., Sharp, R., et al., *Effect of leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training*. Journal of Applied Physiology, **1996**. 81(5): p. 2095-2104.
- [215] Cutzach, I., Chatonnet, P., and Dubourdieu, D., *Rôle du sotolon dans l'arôme des vins doux naturels. Influence des conditions d'élevage et de vieillissement*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, **1998**. 32(2): p. 99-110.
- [216] Hofmann, T. and Schieberle, P., *Flavour science: recent developments*, in *Special publication / Royal Society of Chemistry*, Taylor, A. J. and Mottram, D. S., Editors. **1996**, Royal Society of Chemistry: London. p. 182-187.
- [217] Smirnov, S. V., Sokolov, P. M., et al., *A novel L-isoleucine-4'-dioxygenase and L-isoleucine dihydroxylation cascade in Pantoea ananatis*. MicrobiologyOpen, **2013**. 2(3): p. 471-481.
- [218] Podebrad, F., Heil, M., et al., *4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone) - The odour of maple syrup urine disease*. Journal of Inherited Metabolic Disease, **1999**. 22(2): p. 107-114.
- [219] Zorn, H., Langhoff, S., et al., *A Peroxidase from Lepista irina Cleaves β,β -Carotene to Flavor Compounds*. Biological Chemistry, **2003**. 384: p. 1049.
-

- [220] Jurado, E., Bravo, V., et al., *Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme-Surfactant Interactions and Washing Tests*. Journal of Surfactants and Detergents, **2007**. 10(1): p. 61-70.
- [221] Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D., *Lipases and their industrial applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology, **2004**. 118(1-3): p. 155-170.
- [222] Borenstein, B. and Bunnell, R. H., *Carotenoids: Properties, Occurrence, and Utilization in Foods*, in *Advances in Food Research*, Chichester, C. O., Mrak, E. M., and Stewart, G. F., Editors. **1966**, Academic Press. p. 195-276.
- [223] Gélinas, P., Poitras, E., et al., *Oxido-reductases and lipases as dough-bleaching agents*. Cereal Chemistry, **1998**. 75(6): p. 810-814.
- [224] Bibi, I., Bhatti, H. N., and Asgher, M., *Decolourisation of direct dyes with manganese peroxidase from white rot basidiomycete Ganoderma lucidum-IBL-5*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, **2009**. 87(3): p. 435-440.
- [225] Bibi, I. and Bhatti, H., *Enhanced Biodecolorization of Reactive Dyes by Basidiomycetes Under Static Conditions*. Applied Biochemistry and Biotechnology, **2012**. 166(8): p. 2078-2090.
- [226] Scheibner, M., Hülsdau, B., et al., *Novel peroxidases of Marasmius scorodonioides degrade β -carotene*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2008**. 77(6): p. 1241-1250.
- [227] Schüttmann, I., Bouws, H., et al., *Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from Pleurotus sapidus*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2014**. 103(0): p. 79-84.
- [228] Zelena, K., Hardebusch, B., et al., *Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2009**. 57(21): p. 9951-9955.
- [229] Grbavčić, S., Bezbradica, D., et al., *Production of lipase and protease from an indigenous Pseudomonas aeruginosa strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance*. Bioresource Technology, **2011**. 102(24): p. 11226-11233.
- [230] Britton, H. T. S. and Robinson, R. A., *CXCVIII.-Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal*. Journal of the Chemical Society, **1931**: p. 1456-1462.
- [231] Artimo, P., Jonnalagedda, M., et al., *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*. Nucleic Acids Research, **2012**. 40(W1): p. W597-W603.
- [232] Altschul, S. F., Gish, W., et al., *Basic Local Alignment Search Tool*. Journal of Molecular Biology, **1990**. 215(3): p. 403-410.

-
- [233] Marchler-Bauer, A., Lu, S., et al., *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins*. *Nucleic Acids Research*, **2011**. 39(suppl 1): p. D225-D229.
- [234] Larkin, M. A., Blackshields, G., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **2007**. 23(21): p. 2947-2948.
- [235] Gupta, R., Jung, E., and Brunak, S. *NetNGlyc 1.0 Server*. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins [cited 2. October 2013]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/abstract.php>.
- [236] Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., et al., *Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology*. *The EMBO Journal*, **2013**. 32(10): p. 1478-1488.
- [237] Maeda, Y., Kajiwara, S., and Ohtaguchi, K., *Manganese peroxidase gene of the perennial mushroom *Elfvigia applanata*: cloning and evaluation of its relationship with lignin degradation*. *Biotechnology Letters*, **2001**. 23(2): p. 103-109.
- [238] Nie, G., Reading, N. S., and Aust, S. D., *Relative Stability of Recombinant Versus Native Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1999**. 365(2): p. 328-334.
- [239] Arnao, M. B., Acosta, M., et al., *A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1990**. 1041(1): p. 43-47.
- [240] Baranska, M., Schütze, W., and Schulz, H., *Determination of Lycopene and β -Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, **2006**. 78(24): p. 8456-8461.
- [241] Maurer, K.-H. and Flickinger, M. C., *Enzymes, Detergent*, in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. **2009**, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-16.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Laura Isabel Friederike Lanfermann

15.12.1986 in Hannover

STUDIUM & PROMOTION

01/2012-07/2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover & Promotionsstudium

10/2009-12/2011 Masterstudiengang Life Science an der Leibniz Universität Hannover

Titel der Masterarbeit: „*Biotransformation von Aminosäuren zu sensorisch aktiven Verbindungen durch Basidiomyceten*“

10/2006-09/2009 Bachelorstudiengang Life Science an der Leibniz Universität Hannover

Titel der Bachelorarbeit: „*Genese und Stabilität der Schlüsselaromaverbindung 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-furanon (Sotolon)*“

SCHULBILDUNG

06/2006 Abitur

Prüfungsfächer: Biologie, Englisch, Mathematik, Religion

1999-2006 Gymnasium Syke

1997-1999 Orientierungsstufe Syke

1994-1997 Grundschule am Lindhof, Syke

1993-1994 Deutsche Botschaftsschule Teheran