

Biokatalytische Entstehung von Sesquiterpenoiden

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Nils Püth, M. Sc.

2023

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

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 22.06.2023

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas.

Zudem bedanke ich mich herzlich bei apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die freundliche Übernahme des Korreferates sowie bei PD Dr. rer. nat. Ulrich Krings (Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Zudem gilt Uli mein besonderer Dank für die stets offene Tür. Mit dir konnte man über jegliche Probleme und Unklarheiten sprechen. Vor allem bei allen Fragen zum Thema Massenspektrometrie hast du mir tatkräftig zur Seite gestanden.

Weiterhin möchte ich Franzi für alle Tipps, Tricks und Kniffe rund um die heterologe Proteinproduktion danken.

Ich danke außerdem sämtlichen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie, die meine Zeit am Institut so besonders gemacht haben. Mit euch konnte man immer über alles diskutieren und ihr ward immer hilfsbereit. Hier habe ich gute Freunde gefunden.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie. In meinen Eltern habe ich großartige Vorbilder gefunden, die mich in allem unterstützen. Auch meine Schwiegereltern unterstützen mich stets und stehen mir mit Rat und Tat zur Seite. Meine Frau steht mir jeden Tag zur Seite und gibt mir die Kraft immer weiter zu machen. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Aromastoffe spielen eine Schlüsselrolle in der Lebensmittelindustrie und bei der Kaufentscheidung der Verbraucher. Dabei achten Kunden verstärkt auf die Natürlichkeit der Produkte und nachhaltige Herstellungsverfahren. Um diesen Vorgaben nachzukommen, rücken höhere Pilze als Produzenten von natürlichen Aromastoffen sowie als Quelle für lebensmitteltechnologisch relevante Enzyme zur Herstellung und Qualitätsverbesserung von Lebensmitteln in den Fokus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Basidiomycet *Cerrena unicolor* (Cun) als Sesquiterpenproduzent untersucht. Im Genom des Pilzes konnten mit Hilfe von Sequenzvergleichen 14 Sesquiterpensynthesen (STS) identifiziert werden. Zehn von ihnen wurden anschließend erfolgreich heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, die Enzyme produziert und funktionell charakterisiert. Mittels tryptischem Verdau und anschließendem *peptide mass fingerprinting* konnten die vorhergesagten Proteinsequenzen bestätigt werden. Die Sequenzvergleiche zeigten STS-typische konservierte Motive sowie möglicherweise für Cun spezifische Homologien. Für die Untersuchung der Metallionenabhängigkeit wurden zwei STS aus Cun gewählt, die sich sowohl in der Anzahl der Produkte, als auch den produzierten Sesquiterpenen selbst unterschieden. Setzte man andere bivalente Metallionen als Mg^{2+} für die Zyklisierungsreaktion ein, zeigte sich, dass die ausgewählte Multiprodukt-Cyclase promiskuitiver als die Cyclase mit nur einem Sesquiterpen als Produkt reagierte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass agro-industrielle Nebenströme für die Kultivierung von Cun verwendet werden können und diese Einfluss auf die Sesquiterpenbiosynthese hatten. Eher kohlenhydratreiche Nebenströme wie Kartoffelstärke oder Weizenkleie hatten keinen positiven Einfluss auf die Produktausbeute. Für den lipidhaltigen Rapspresskuchen konnte jedoch eine deutliche Erhöhung der Produktausbeute nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass durch β -Oxidation der Lipide ein Überfluss an Acetyl-CoA die Sesquiterpenproduktion boostet, konnte mittels ^{13}C -markiertem Acetat als Medienzusatz experimentell bestätigt werden.

Schlagnworte: *Cerrena unicolor*; Sesquiterpene; Sesquiterpencyclasen; heterologe Expression; Metallionenabhängigkeit; agro-industrielle Nebenströme; ^{13}C -markiertes Substrat

Abstract

Aroma compounds play a key role in the food industry, with customers paying increasing attention to sustainability and naturalness. In order to achieve this, focus was put on higher fungi as a source of aroma compounds and enzymes for production and quality improvements of foods.

In this study, *Cerrena unicolor* (Cun) was investigated as a producer of sesquiterpenes. Using sequence alignments, 14 sesquiterpene synthases (STS) were identified in the fungal genome. Ten of them were successfully expressed in *Escherichia coli*, the enzymes produced and functionally characterized. Using tryptic digestion followed by peptide mass fingerprinting, the predicted protein sequences were confirmed. Sequence alignments revealed STS-type conserved motifs, as well as homologies possibly specific for Cun. To investigate metal ion dependence, two STS were selected, which differed in the total number of products and in the products it self. Using other divalent metal ions than Mg^{2+} for the cyclization reaction showed that the chosen multiproduct cyclase was more promiscuous than the cyclase producing only one single sesquiterpene.

Furthermore, it was shown that agro-industrial side streams can be used for the cultivation of Cun and influence sesquiterpene biosynthesis. Carbohydrate-containing side streams such as potato starch and wheat bran did not have a positive influence on the product yield. However, a significant increase in product yield was demonstrated for the lipid-containing rapeseed press cake. An excess of acetyl-CoA caused by the β -oxidation of respective lipids boosted sesquiterpene production, which was confirmed by the incorporation of ^{13}C -labeled acetate supplemented to the nutrient medium.

Keywords: *Cerrena unicolor*; sesquiterpenes; sesquiterpene cyclases; heterologous expression; metal ion dependency; agro-industrial side-streams; ^{13}C -labeled substrate

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur	1
1.1 Aromastoffe	1
1.2 Basidiomyceten als Aromastoffproduzenten	2
1.3 Sesquiterpencyclasen und ihre Produkte	3
1.3.1 Biosynthese von Terpenen	4
1.3.2 Klassifizierung von Sesquiterpencyclasen.....	5
1.3.3 Metallionenabhängigkeit.....	6
1.4 Nebenströme der Agro- und Lebensmittelindustrie.....	11
1.4.1 Rapspresskuchen.....	12
1.4.2 Ahornholz	13
1.4.3 Kartoffelstärke	14
1.4.4 Weizenkleie.....	14
1.4.5 Zitrusfruchtschalen	15
1.4.6 Traubentrester	15
2 Problemstellung und Zielsetzung	17
3 Vorwort zur Publikation „Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete <i>Cerrena unicolor</i>“	18
4 Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete <i>Cerrena unicolor</i>	19
4.1 Abstract.....	19
4.2 Introduction.....	21
4.3 Results and Discussion	22
4.3.1 Identification of genes.....	22
4.3.2 Heterologous Production and Functional Characterization	25
4.3.3 Phylogenetic Determination.....	27
4.3.4 Temperature Optimum and Metal Ion Dependence of Cun3157 and Cun7050	28
4.4 Materials and Methods.....	31
4.4.1 Chemicals, Reagents, and Strains	31
4.4.2 Gene Identification.....	31
4.4.3 Cloning of pCOLD I_STS Constructs	31

4.4.4 Cultivation and Expression	32
4.4.5 Enzyme Purification.....	32
4.4.6 Biocatalysis	32
4.4.7 Product Analysis	33
4.4.8 Phylogenetic Analysis.....	33
4.4.9 Semi-Native PAGE.....	33
4.4.10 Peptide Mass Fingerprinting.....	33
4.5 Author Contributions, Funding, Acknowledgments and Conflicts of Interest	34
5 Vorwort zur Publikation „Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured <i>Cerrena unicolor</i>”	35
6 Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured <i>Cerrena unicolor</i>	36
6.1 Abstract.....	36
6.2 Introduction.....	38
6.3 Materials and Methods.....	39
6.3.1 Chemicals.....	39
6.3.2 Cultivation Conditions	40
6.3.3 Extraction of Volatiles	40
6.3.4 GOPOD-Assay, Determination of D-Glucose Concentration	41
6.3.5 GC-MS Analysis	41
6.3.6 Lipid Content Determination	41
6.3.7 Fatty Acids Profiling.....	41
6.3.8 Protein Content Determination	41
6.4 Results and Discussion	42
6.4.1 Formation Kinetics in Standard Nutrient Liquid Medium (SNL)	43
6.4.2 Impact of Food and Agro-Industrial Side-Streams.....	45
6.4.3 Impact of Rapeseed Press Cake and Lipidic Supplements	47
6.4.4 Labeling Experiment.....	49
6.5 Conclusions.....	51
6.6 Author Contributions, Funding, Acknowledgments and Conflicts of Interest	52
6.7 Supplementary Material.....	53
7 Ausblick.....	55
8 Literaturverzeichnis	57
9 Anhang.....	75
Lebenslauf	83
Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	84

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
AI	<i>artificial intelligence</i> (künstliche Intelligenz)
amu	<i>atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
APC	<i>article processing charge</i> (Artikelprozessierungsgebühr)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cf	<i>confer</i> (vergleiche)
CIS	<i>cold injection system</i> (Kaltaufgabesystem)
CoA	<i>coenzyme A</i> (Coenzym A)
Cun	<i>Cerrena unicolor</i>
DMAPP	<i>dimethylallyl pyrophosphate</i> (Dimethylallyldiphosphat)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DXP	1-Desoxy- D -xylose-5-phosphat
EC	<i>enzyme commission number</i> (Enzymklassifizierungsnummer)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
EI	<i>electron impact</i>
EIC	<i>extracted ion chromatograms</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
eV	<i>electron volts</i> (Elektronenvolt)
FPP	<i>farnesyl pyrophosphate</i> (Farnesylpyrophosphat)
G-3-P	Glyceraldehyd-3-phosphat
GC	<i>gas chromatography</i> (Gaschromatographie)

GDP	<i>geranyl diphosphate</i> (Geranyldiphosphat)
GGDP	<i>geranylgeranyl diphosphate</i> (Geranylgeranyldiphosphat)
His	<i>histidine</i> (Histidin)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPP	<i>isopentenyl pyrophosphate</i> (Isopentenylpyrophosphat)
IPPS	Isoprenoiddiphosphatsynthasen
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
kDa	<i>kilodalton</i> (atomare Masseneinheit)
L	<i>liter</i> (Liter)
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
m ³	Kubikmeter
mA	<i>milli-Ampere</i>
MEP	2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
μg	<i>mikro-gram</i>
mg	<i>milli-gram</i>
min	<i>minute</i>
Mio.	Millionen
mL	<i>milli-liter</i>
mM	<i>milli-molar</i> (mMol/L)
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propane sulfonic acid</i>
Mrd.	Milliarden
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
MVA	<i>mevalonic acid</i> (Mevalonatsäure)

MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
m/z	<i>mass to charge value</i>
Ni-NTA	<i>nickel nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	<i>nano-Meter</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NPP	<i>nerolidyl diphosphate</i> (Nerolidyldiphosphat)
OD ₆₀₀	<i>optical density at 600 nm</i>
ODP	<i>olfactory detection port</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
QTOF	<i>quadrupole time of flight</i>
RI	<i>retention index</i> (Retentionsindex)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SBSE	<i>stir bar sorptive extraction</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNL	<i>standard nutrient liquid</i> (Standardnährlösung)
STC	<i>sesquiterpene cyclase</i> (Sesquiterpencyclase)
STS	<i>sesquiterpene synthase</i> (Sesquiterpensynthase)
TDS	<i>thermal desorption system</i> (Thermodesorptionssystem)
TPS	<i>terpene synthase</i> (Terpensynthase)
Tris	<i>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propane-1,3-diol</i>
w/o	<i>without</i> (ohne)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Beispiele für Biotransformationen mit Basidiomyceten. Ferulasäure wird mit Hilfe von <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> zu Vanillin umgesetzt (Krings <i>et al.</i> , 2001). Valencen wird mit <i>Funalia trogii</i> zu Nootkaton umgesetzt (Kolwek <i>et al.</i> , 2018). α -Pinen wird mit <i>Trametes elegans</i> zu <i>cis</i> -Verbenol umgesetzt (Jaramillo <i>et al.</i> , 2020).	2
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des MVA- und des MEP-Biosyntheseweges zur Herstellung von Farnesylpyrophosphat. Weitere Abkürzungen: Coenzym A (CoA), Glyceraldehyd-3-phosphat (G-3-P), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG), 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat (DXP). Verändert nach (Daletos & Stephanopoulos, 2020).	5
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Terpencyclasen in die Klassen I und II (verändert nach (Aaron & Christianson, 2010)).	6
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Änderung im initialen Zyklisierungsmechanismus von STS Stehi73029 bei der Zugabe von Ca^{2+}	9
Figure 4-1: Graphical abstract	20
Figure 4-2: Sequence homology modeling of putative TPS of Cun. Conserved motifs are framed in red. Asterisks indicate conserved residues, colons equivalent residues and dots partial residue conservation.	24
Figure 4-3: Phylogenetic determination of sesquiterpene synthases from basidiomycota. Unrooted neighbor-joining phylogram of 37 experimental characterized STS. Included are STS protein sequences from <i>Antrodia cinnamomea</i> (AcTPS) (Lin <i>et al.</i> , 2017), <i>Armillaria gallica</i> (ArmGa) (Engels <i>et al.</i> , 2011), <i>Boreostereum vibrans</i> (BvCS) (Zhou <i>et al.</i> , 2016), <i>Coprinopsis cinereus</i> (Cop) (Agger <i>et al.</i> , 2009), <i>Coniophora puteana</i> (Copu) (Mischko <i>et al.</i> , 2018), <i>Formitopsis pinicola</i> (Fompi) (Wawrzyn <i>et al.</i> , 2012), <i>Lignosus rhinoceros</i> (GME) (Yap <i>et al.</i> , 2017), <i>Stereum hirsutum</i> (Stehi) (Quin <i>et al.</i> , 2013), <i>Omphalotus olearius</i> (Omp) (Wawrzyn <i>et al.</i> , 2012), and <i>Cerrena unicolor</i> (Cun). Different cyclisation mechanisms were found for the clades. Clades 1 and 2 follow an initial 1,10-cyclization, clade 3 follows a 1,6-cyclization, and clade 4 follows a 1,11-cyclisation. Modified after (Mischko <i>et al.</i> , 2018).	27
Figure 4-4: Temperature optimum of Cun3157 and Cun7050.	29
Figure 4-5: Metal cation dependency of Cun3157 and Cun7050. Peak areas are plotted against the used metal ions. Blank reactions without STS (w/o enzyme) and without any metal ion solution (w/o cation) were used as control reactions.	30
Figure 6-1: Graphical abstract.	37

Figure 6-2: D-Glucose concentration and pH during the cultivation of <i>Cerrena unicolor</i> in SNL medium at 150 rpm and 24 °C for 21 days.	44
Figure 6-3: Sesquiterpenoid production over 21 days during the submerged cultivation of <i>Cerrena unicolor</i>	45
Figure 6-4: Sesquiterpenoid production during the submerged cultivation of <i>Cerrena unicolor</i> for eleven days, supplemented with side-streams from the food and agro-industry.	46
Figure 6-5: Lipid (A) and protein content (B) of side-streams used as medium supplements for the cultivation of <i>Cerrena unicolor</i>	47
Figure 6-6: Sesquiterpenoid production of <i>Cerrena unicolor</i> supplemented with 2% lipidic additives after eleven days of cultivation. Products were analyzed using TDS-GC-MS after the liquid–liquid extraction of culture supernatant.	48
Figure 6-7: Mass spectra of α -bisabolol. (A) Spectrum of α -bisabolol (scan m/z from 33 to 300). (B) Spectrum of α -bisabolol after supplementation of ^{13}C -labeled acetate (scan m/z from 33 to 300). m/z range from 200 to 215 is shown superimposed in the upper right corner of the respective spectra.	50
Figure 6-8: Fatty acid distribution of residual oil from rapeseed press cake obtained <i>via</i> Soxhlet extraction.	53

Tabellenverzeichnis

Table 4-1: Results of peptide mass fingerprinting.....	25
Table 4-2: Identified products of heterologous STS from <i>C. unicolor</i> . Product ratios are given to highlight the main products.	26
Table 6-1: Volatile sesquiterpenoids produced by <i>Cerrena unicolor</i>	42
Table 6-2: Odor impressions obtained by GC-O measurement of extracts from cultivation of <i>Cerrena unicolor</i> in SNL and rapeseed oil as media supplement.	53
Table 6-3: Intensities of the sesquiterpenoid molecular ion (204 m/z) and isotopic peaks (205 m/z, 206 m/z) in the supernatant after eleven days of cultivation of <i>Cerrena unicolor</i> in SNL w/wo supplementation of ¹³ C sodium acetate.	54
Tabelle 9-1: Aminosäuresequenzen der in aktiver Form exprimierbaren STS aus <i>Cerrena unicolor</i>	75
Tabelle 9-2: Nukleotidsequenzen der STS aus <i>Cerrena unicolor</i>	77
Tabelle 9-3: Verwendete Primer zur Klonierung von STS aus <i>Cerrena unicolor</i>	82

1 Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur

1.1 Aromastoffe

Unter dem Begriff Aromastoffe lassen sich sowohl Geschmacks- als auch Duftstoffe zusammenfassen. Außerdem handelt es sich um eine rechtliche Einordnung nach EU-Verordnung 1334 (VO (EG) 1334/2008). Des Weiteren regelt diese Verordnung, dass sich das Prädikat „natürlich“ nur bei der physikalischen oder enzymatischen Extraktion oder der biotechnologischen Produktion erhalten lässt. Dem heutigen Kunden wird die Verwendung natürlicher Aromastoffen immer wichtiger (Berger, 2007). Schon vor Jahrhunderten wurde erkannt, dass für die Aromaproduktion Mikroorganismen eingesetzt werden können, etwa in der Herstellung von Wein, Käse, Joghurt oder Wurst. Natürlicherweise kommen Aromastoffe vor allem in Pflanzen vor, werden aber auch von Tieren, Pilzen und Mikroorganismen produziert. In verarbeiteter Form findet man sie vor allem in Form von Extrakten, Essenzen oder Ölen. Typische Stoffgruppen sind Alkohole, Thiole, Aldehyde, Ketone, Ester, Carbonsäuren, Phenole, Pyrazine, Terpene oder auch Thiazole (Longo & Sanromán, 2006). Die Zusammensetzung ist oft hoch komplex und lässt sich nur schwer künstlich nachbilden, wodurch sowohl die Nachfrage als auch die Preise steigen. Die Gewinnung von beispielsweise ätherischen Ölen aus Pflanzenmaterial ist sowohl kosten- als auch zeitintensiv. Außerdem hängt der Anbau von einer Vielzahl Bedingungen wie dem Wetter oder den Möglichkeiten für Schädlingsbekämpfung oder auch der Lagerung ab (Chemat *et al.*, 2012). In der biotechnologischen Produktion von Aromastoffen können diese Umwelteinflüsse umgangen werden. Heterolog produzierte Enzyme können in einer Biotransformation Präkursoren in die gewünschten Aromastoffe umwandeln. In Ganzzell-Fermentationen können Aromastoffe aus einfachen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen hergestellt werden. In beiden Fällen lässt sich eine deutlich höhere Reinheit als bei der Extraktion von Pflanzenmaterial erreichen (Soares-Castro *et al.*, 2020).

Die Fachzeitschrift „Perfumer and Flavorist“ berichtete zuletzt über einen globalen Umsatz der Aromastoff-Industrie von 29 Mrd. US-Dollar für 2021. Bis 2026 soll ein Umsatz von 37,3 Mrd. US-Dollar erreicht werden, was einer jährlichen Wachstumsrate von 5,1 % entspräche (Perfumer & Flavorist, 2022).

1.2 Basidiomyceten als Aromastoffproduzenten

Pilze sind auf der ganzen Welt verbreitet. Heute weiß man, dass es bis zu 5,1 Mio. unterschiedliche Spezies geben könnte. Bisher bekannt sind um die 100.000 (Blackwell, 2011). Mit mehr als 31.000 bisher bekannten Vertretern bilden Basidiomyceten eine der größten Abteilungen im Reich der Pilze. Basidiomyceten sind in der Lage, natürliche Aromastoffe zu produzieren (Abraham & Berger, 1994). Während der Kultivierung von *Agaricus bisporus*, *Pleurotus florida* und *Calocybe indica* konnten beispielsweise 3-Octanol, 2-Octen-1-ol oder Benzylalkohol nachgewiesen werden (Venkateshwarlu *et al.*, 1999). Kultiviert man *Pleurotus ostreatus* in submerser Kultur, sind 4-Methoxybenzaldehyd und 3-Chloro-4-Methoxybenzaldehyde per GC-MS nachweisbar (Okamoto *et al.*, 2002). Während der Kultivierung von *Calvatia gigantea* hingegen lassen sich vor allem phenolische Substanzen, aber auch der Aromastoff Hexanal nachweisen (Kivrak *et al.*, 2016). Auch für die Biotransformation können Basidiomyceten eingesetzt werden (siehe Abbildung 1-1). So gelingt mit *Pycnoporus cinnabarinus* die Umsetzung von Ferulasäure zu Vanillin (Krings *et al.*, 2001), die Produktion von Nootkaton aus Valencen mit *Funalia trogii* (Kolwek *et al.*, 2018) oder die Umsetzung von α -Pinen zu *cis*-Verbenol durch *Trametes elegans* (Jaramillo *et al.*, 2020).

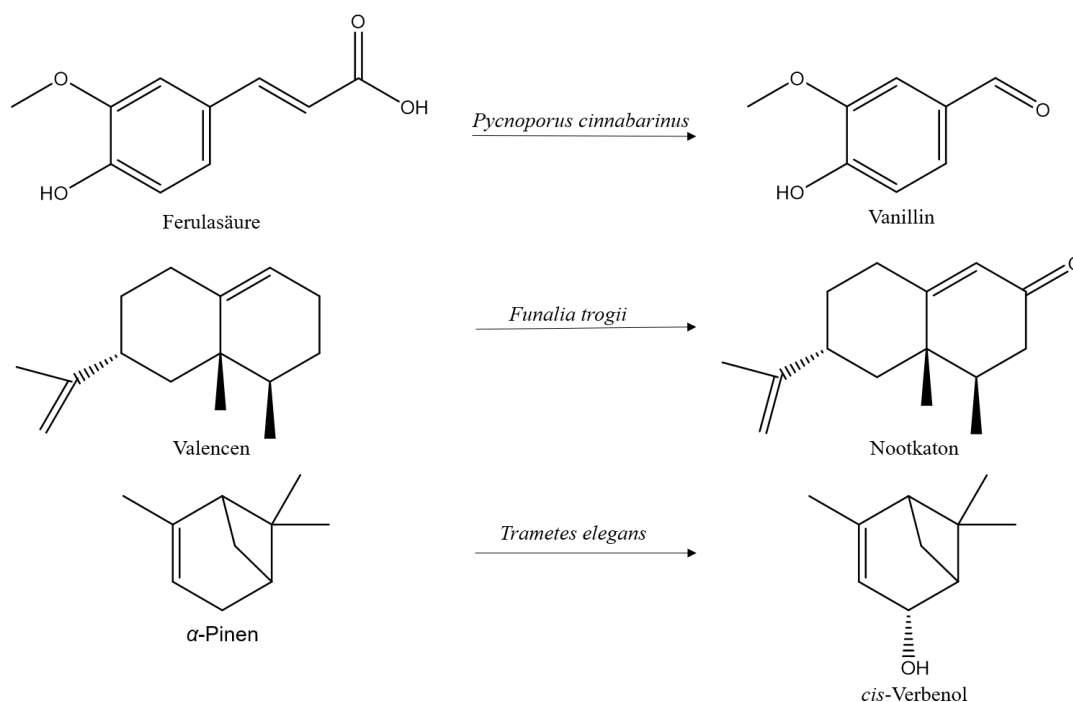


Abbildung 1-1: Beispiele für Biotransformationen mit Basidiomyceten. Ferulasäure wird mit Hilfe von *Pycnoporus cinnabarinus* zu Vanillin umgesetzt (Krings *et al.*, 2001). Valencen wird mit *Funalia trogii* zu Nootkaton umgesetzt (Kolwek *et al.*, 2018). α -Pinen wird mit *Trametes elegans* zu *cis*-Verbenol umgesetzt (Jaramillo *et al.*, 2020).

So haben Basidiomyceten großes Potential, sowohl als direkte Quelle von Aromastoffen, wie auch als Quelle für Enzyme zur biotechnologischen Aromastoffproduktion.

1.3 Sesquiterpencyclasen und ihre Produkte

Es ist eine Vielzahl an Terpensynthasen (TPS) bekannt, die eine Vielzahl an Produkten produziert. Bisher sind sowohl Bakterien, Pflanzen, Pilze, Amöben und rote Algen für das Vorhandensein von Terpencyclase-Genen bekannt. Terpene agieren als Pflanzenhormon, spielen eine wichtige Rolle in der Zellmembran, in der Photosynthese oder sogar im Transfer von Elektronen (Gao *et al.*, 2012). In Organismen wie Ratten, Elefanten oder dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* konnten zwar Terpenoide, aber keine entsprechenden Gene nachgewiesen werden (Goodwin *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008). Für die Industrie spielen Terpene eine wichtige Rolle als Bestandteil von Parfümen, Pigmenten oder in Resinen. Aber auch in der Medizin gewinnen sie immer mehr an Bedeutung, zum Beispiel in der Behandlung von Krebserkrankungen (Gonçalves *et al.*, 2020).

Pflanzen produzieren Sesquiterpene häufig als Schutz. Mais zum Beispiel lockt damit Wespen an; die die Larven des Südwestlichen Maiszünslers fressen. Zudem produziert nahezu jede zweite Mono- bzw. Sesquiterpencyclase aus Pflanzen mehr als ein Produkt (Degenhardt *et al.*, 2009). Immer mehr Arbeiten zeigen, dass auch Pilze Terpene produzieren können, deren Biosynthese bislang nur in Pflanzen bekannt ist (Huang *et al.*, 2021). Basidiomyceten bilden Fruchtkörper und haben deshalb auch Fressfeinde. Zur Verteidigung werden unter anderem Sesquiterpene produziert, die als Repellent und/oder auch toxisch wirken können (Abraham, 2001). Aber auch symbiotische Lebensformen mit Pflanzen werden eingegangen. In diesen Fällen werden häufig Sesquiterpene produziert, die als Phytohormone wirken (Kashiwabara *et al.*, 2006). Bisher bekannt als Sesquiterpenproduzenten sind 79 Vertreter der Basidiomyceten mit bisher ungefähr 1000 verschiedenen Sesquiterpenoiden. Die häufigsten Kohlenstoffgrundgerüste sind Drimane, Protoilludene, Illudene, Hirsutene, Cadinene, and Tremulene (Dai *et al.*, 2021). Nach aktuellem Stand weisen Basidiomyceten im Durchschnitt 12 Gene für STS auf. Das sind ca. viermal mehr als bei Ascomyceten (Schmidt-Dannert, 2015). Tatsächlich funktionell charakterisiert sind allerdings insgesamt nur 122 STS aus Basidiomyceten (Wu *et al.*, 2022). Trotz der geringen Sequenzähnlichkeiten zwischen Terpensynthasen und Isoprenoid-diphosphatsynthasen (IPPS) zeigen beide Enzymfamilien große Ähnlichkeiten in der Faltung

und der Notwendigkeit eines Clusters aus drei Metallionen für die Katalyse. Da IPPS die entsprechenden Substrate für TPS produzieren, wird vermutet, dass sich pilzliche TPS aus den IPPS entwickelt haben (Lee *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2020). Gerade die signifikanten Sequenzunterschiede sprechen für eine Entwicklung noch vor der evolutionären Trennung von Pro- und Eukaryonten. Eine phylogenetische Untersuchung von pilzlichen und bakteriellen TPS bestätigte diese Theorie (Jia *et al.*, 2019). Eine weitere Quelle von TPS-Genen für Pilze ist der horizontale Gentransfer ausgehend von Bakterien. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass im pilzlichen Genom integrierte TPS in ihrer Aktivität mit TPS bakteriellen Ursprungs übereinstimmen. Für die bakterielle Herkunft der TPS-Gene spricht außerdem das Vorhandensein eines DDxxxD-Motivs anstelle des typischen DDxxD-Motivs pflanzlicher TPS. Konkret gezeigt werden konnte dies für Vertreter der Spezies *Metarhizium* und *Cordycepioideus* (Jia *et al.*, 2019). Durch heterologen Transfer übertragene Gene unterliegen in den meisten Fällen einer hohen Selektion und gehen oft wieder verloren (Hao & Golding, 2006). Für die so gewonnenen TPS-Gene der Spezies *Metarhizium* gilt dies nicht. Sie brachten der Spezies offensichtlich Vorteile und finden sich in Genclustern in relativer Nähe zu Transkriptionsfaktoren, welche die Expression optimieren (Jia *et al.*, 2019).

1.3.1 Biosynthese von Terpenen

Enzyme sind einzigartige Katalysatoren, die Reaktionen um ein Vielfaches beschleunigen können. Sie weisen meist eine hohe Substrat- und Wirksamkeit auf und sind verantwortlich für die beeindruckende Chemodiversität in der Natur. Gerade im Falle von Terpenen ist die Anzahl von Präkursoren sehr klein. Sie bestehen im Wesentlichen aus den zwei Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Gebildet werden diese mittels 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP)-Biosyntheseweg oder Mevalonatsäure (mevalonic acid, MVA)-Biosyntheseweg (Daleto & Stephanopoulos, 2020). Aus diesen zwei Stoffwechselwegen gehen Geranylidiphosphat (GDP), Farnesylpyrophosphat (FPP), sowie Geranylgeranylidiphosphat (GGDP) hervor (siehe Abbildung 1-2). Alleine aus diesen drei Vorstufen entstehen durch Terpensynthasen und -cyclasen eine enorme Anzahl zyklischer sowie azyklischer Substanzen. Verglichen mit Monoterpencyclasen ist die Vielfalt an möglichen Kohlenstoffgerüsten bei den Sesquiterpenen alleine durch das größere Substratmolekül deutlich größer.

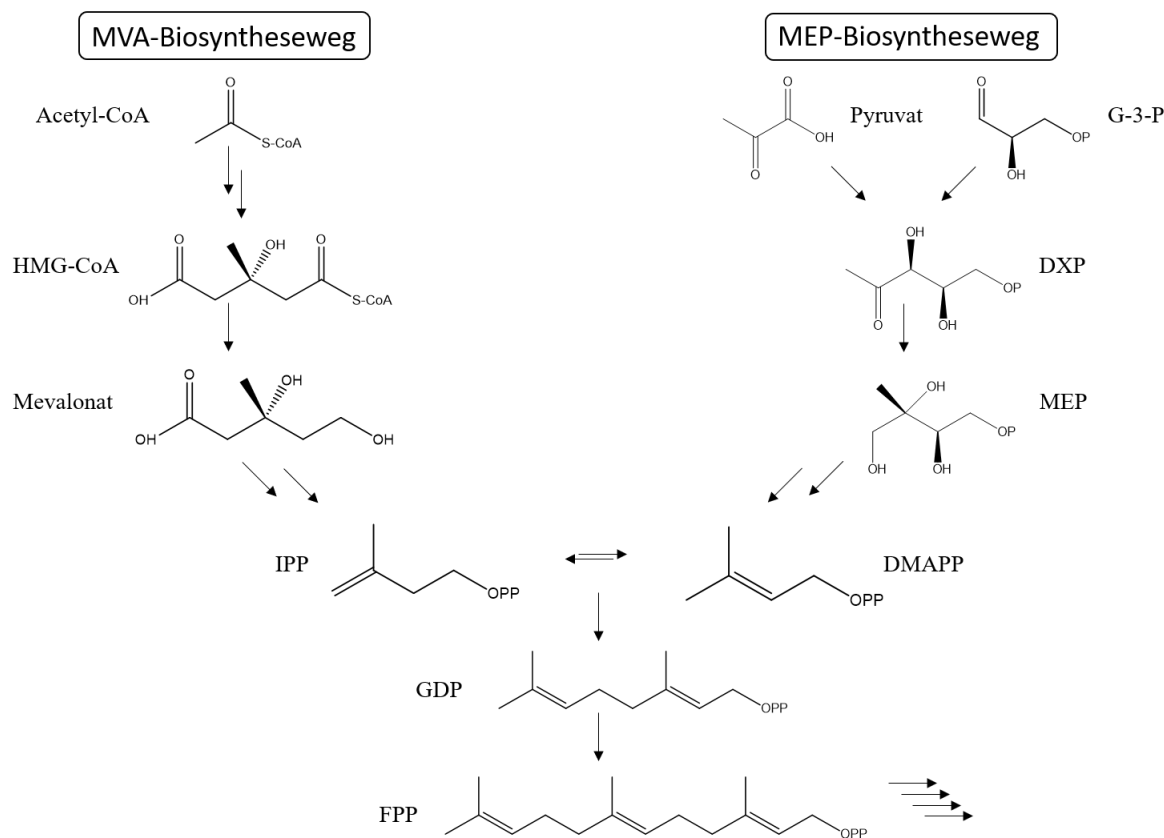


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des MVA- und des MEP-Biosyntheseweges zur Herstellung von Farnesylpyrophosphat. Weitere Abkürzungen: Coenzym A (CoA), Glyceraldehyd-3-phosphat (G-3-P), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG), 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat (DXP). Verändert nach (Daletos & Stephanopoulos, 2020).

Es folgt die Abspaltung des Phosphatrestes. Abhängig von der Position der mit dem allylischen Carbokation in Reaktion gebrachten C-C-Doppelbindung sind initial 1,6; 1,10 bzw. 1,11-Zyklisierungen möglich, die zu der strukturellen Vielfalt an Kohlenstoffgrundgerüsten bei den Sesquiterpenen führt (Cane *et al.*, 1995). Es folgen weitere Reaktionsschritte wie die Verschiebung von Hydridionen oder Methylgruppen, die zum finalen Produkt führen.

1.3.2 Klassifizierung von Sesquiterpencyclasen

Sesquiterpensynthasen (STS) tragen die Enzymklassifizierungsnummern 4.2.3.x. Die vier steht für die Familie der Lyasen, eine Gruppe von Enzymen die auf nicht-hydrolytischem Wege die Addition oder Substitution von Gruppen katalysiert. Die Ziffer 2 differenziert die Klassifizierung und zeigt, dass es sich um Kohlenstoff-Sauerstoff-Lyasen handelt. Die Ziffer drei zeigt, dass die katalysierten Reaktionen mit Phosphat in Zusammenhang stehen.

Allgemein können Terpencyclasen in zwei Klassen eingeteilt werden (siehe Abbildung 1-3). Klasse I Terpencyclasen katalysieren die Metallionen-abhängige Zyklisierung von

Isoprenoiddiphosphatsubstraten. Durch die Abspaltung des Phosphatrestes entsteht ein Carbokation. Charakteristisch sind die metallbindenden Motive DDXXD und (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE. Typische Vertreter dieser Klasse I sind Mono-, Sesqui-, Di- und Sesterterpencyclasen. Klasse II Terpencyclasen katalysieren meist die Protonierung von C-C Doppel-Bindungen, was zu einem Carbokation führt. Di-, Sester- und Triterpencyclasen sind typische Vertreter aus dieser Klasse. Charakteristisch ist das DXDD Motiv (Quin *et al.*, 2014; Wendt & Schulz, 1998).

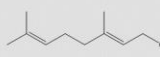
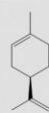
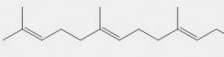
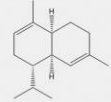
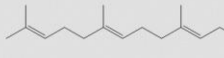
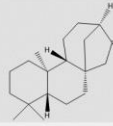
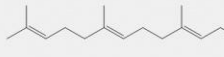
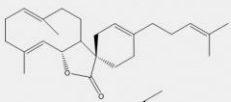
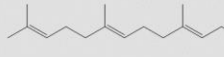
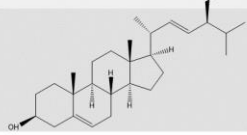
Klasse	-Terpensynthase	Substrat	Produktbeispiel
I	Mono- C ₁₀	 Geranyldiphosphat	 (+)-Limonen
I	Sesqui- C ₁₅	 Farnesyldiphosphat	 α-Muurolen
I, II	Di- C ₂₀	 Geranylgeranyldiphosphat	 ent-Kauren
I, II	Sester- C ₂₅	 Geranyl farnesyldiphosphat	 Genepolid
II	Tri- C ₃₀	 Squalen	 Stigmasterol

Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Terpencyclasen in die Klassen I und II (verändert nach (Aaron & Christianson, 2010)).

In jüngster Zeit werden immer mehr Abweichungen dieser Klassifizierung bekannt. Die STS AstC aus *Aspergillus oryzae* zeigt auf Sequenzebene zwar das für Klasse I-Cyclasen typische DDxxE-Motiv, das zweite Aspartat wurde allerdings durch ein Asparagin substituiert. Daher wurde der Verlust der ionisierungsbasierten Zyklisierung vermutet (Shinohara *et al.*, 2016).

1.3.3 Metallionenabhängigkeit

Hinlänglich bekannt ist, dass die Reaktion von TPS Metallionen-abhängig ist (Robinson & West, 1970). Später konnte unter Verwendung der Röntgenkristallstrukturaufklärung aufgeklärt werden, dass drei bivalente Metallionen an der katalysierten Reaktion beteiligt sind. Außerdem konnte gezeigt werden, welche Motive die Metallionen innerhalb der Enzyme komplexieren und für welche Reaktionsschritte sie benötigt werden, nämlich Bindung und Aktivierung vom Pyrophosphat. Trotz der geringen Sequenzidentität auf

Aminosäureebene sind die Aspartat-reichen Motive DDxxD bei FPP-Synthasen von Menschen, Bakterien und Protozoen hoch konserviert. Im Unterschied dazu werden bei Terpencyclasen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien lediglich zwei Metallionen durch das DDxxD-Motiv komplexiert, die Bindung des dritten Metallions geschieht durch das ebenfalls hoch konservierte NSE/DTE-Motiv. Durch die hohe Konservierung des dreikernigen Metallionen-Clusters in den meisten Reichen der Lebewesen geht man von einem gemeinsamen Ursprung der Terpenyclasen aus (Aaron & Christianson, 2010). Dem entgegen steht die (+)- δ -Cadinene-Synthase aus *Gossypium arboreum*. Diese STS besetzt das typische DDxxD-Motiv. Anstelle des NSE/DTE-Motivs konnte allerdings gezeigt werden, dass ein zusätzliches Aspartat-reiches DDxxE-Motiv an der Metallionenkomplexierung beteiligt ist. Damit ähnelt diese STS strukturell eher den kettenverlängernden Isoprenoidsynthasen. Es wird postuliert, dass sich kettenverlängernde und zyklisierende Synthasen nicht in den spezifischen Motiven, sondern in der 3D-Struktur der entsprechenden aktiven Stelle unterscheiden (Gennadios *et al.*, 2009). Am Beispiel der Terpensynthase TPS4 aus *Zea mays* konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche Vertiefungen in der aktiven Stelle Einfluss auf die konformationellen Änderungen des Carbokation-Intermediats nehmen (Köllner *et al.*, 2006). Bereits 1992 wurde beobachtet, dass sich anstelle von Mg^{2+} auch Mn^{2+} als Kofaktor einsetzen lässt. Dabei konnten sogar höhere Umsatzraten erzielt werden, bereits bei niedrigen Konzentrationen des Metallions trat allerdings ein Verlust an Aktivität auf (Rajaonarivony *et al.*, 1992). Die Wahl der Metallionen beeinflusste bei der IPPS aus dem Käfer *Phaedon cochleariae* sogar die Produktspezifität. Beim Einsatz von Mg^{2+} überwog FPP, beim Einsatz von Co^{2+} überwog GDP (Frick *et al.*, 2013). Eine Monoterpensynthase aus der Minze zeigte Aktivität sowohl mit Mg^{2+} als auch mit Mn^{2+} . In beiden Fällen war die gleiche Kinetik und das gleiche Produktspektrum messbar (Alonso *et al.*, 1992). Eine spätere Studie konnte zeigen, dass beide bivalenten Metallionen für die Kristallisation und die darauffolgende Enzymstrukturaufklärung geeignet waren. Es zeigte sich jedoch, dass die Kristalle mit Mn^{2+} , koordiniert im aktiven Zentrum, von besserer Qualität waren und sich zudem in der Kristallform unterschieden (Hyatt *et al.*, 2007). In 2016 wurden drei Monoterpensynthasen aus *Artemisia annua* isoliert und charakterisiert. Alle drei Enzyme zeigten auch unter der Verwendung von Manganionen Aktivität, wenn auch im Vergleich zu Mg^{2+} stark verringert. Erst bei der Verwendung von Mn^{2+} konnte jedoch für die Synthasen AaTPS2 und AaTPS5 zusätzlich eine Umsetzung von GDP zu Linalool nachgewiesen werden (Ruan *et al.*, 2016). In Kontrast dazu steht die bereits 2005 aus demselben

Organismus isolierte β -Farnesensynthase. Sie zeigte mit Mg^{2+} ihre höchste Aktivität. Genau wie mit Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} war sie auch mit Mn^{2+} kaum aktiv. Allerdings wurde unter Einsatz von Co^{2+} eine Aktivität von ca. einem Drittel im Vergleich zur Aktivität mit Mg^{2+} erzielt (Picaud *et al.*, 2005).

Die STS MtTPS5 aus *Medicago truncatula* ist ein Multiproduktenzym und produzierte 27 unterschiedliche Sesquiterpenoide (Garms *et al.*, 2010). Außerdem ist sie ein weiteres Beispiel für promiskuitive Metallionenabhängigkeit. Wurde Mg^{2+} im Enzymassay eingesetzt, konnte Cubebol als Hauptprodukt identifiziert werden. Nutzte man hingegen Mn^{2+} , war Germacren D das Hauptprodukt. Wurden Kupferionen eingesetzt, zeigte das Enzym nur noch ein Drittel seiner Aktivität verglichen mit Mg^{2+} . Weiterhin konnten auch mit Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} sehr geringe Aktivitäten nachgewiesen werden. Interessanterweise hat auch die Konzentration der Metallionen einen Einfluss auf die Aktivität. Setzte man Mg^{2+} in den Konzentrationen 10 mM und 0,1 mM ein, wurde für die niedrigere Konzentration lediglich ca. ein Drittel der Aktivität nachgewiesen. Bei Manganionen war der Einfluss nicht ganz so drastisch, dafür in umgekehrter Reihenfolge. Die höhere Metallionenkonzentration setzte die Aktivität um ca. ein Fünftel herab (Vattekkatte *et al.*, 2018). Die STS TPS6 aus dem Mais ist ebenfalls ein Multiproduktenzym und produzierte β -Bisabolene und β -Macrocarpene. Untersuchungen mit verschiedenen bivalenten Metallionen zeigten sehr geringe Aktivität mit Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} . Setzte man Mg^{2+} oder Mn^{2+} ein, erhielt man nahezu gleiche Aktivitäten. Interessant war hier das ebenfalls gleiche Verhältnis von Gesamtaktivität und Metallionenkonzentration. Je höher die Konzentration an Metallionen, desto höher war in diesem Fall die Aktivität. Allerdings änderte sich auch hier das Produktverhältnis je nach eingesetztem Metallion. Mit Mg^{2+} überwog β -Macrocarpene mit ca. 85 %, mit Mn^{2+} entstanden beide Produkte zu gleichen Teilen (Köllner *et al.*, 2008).

Exklusiv für Pflanzen konnte gezeigt werden, dass auch monovalente Metallionen eine Rolle bei der Aktivität von TPS spielen können. Die α -Farnesensynthase MsAFS1 aus dem Apfel besitzt einen an der Enzymoberfläche präsentierten H-alpha-loop, der als Kaliumbindestelle fungiert (Green *et al.*, 2009). Dabei sind monovalente Kationen im Zusammenhang mit Enzym-katalysierten Reaktionen dafür bekannt, an der Substratbindung und dem Erreichen des Übergangszustandes, jedoch weniger direkt an der Katalyse, beteiligt zu sein (Page & Di Cera, 2006). Da MsAFS1 ohne das Vorhandensein von K^+ -Ionen eine Restaktivität von 12 %

zeigte und die Anwesenheit von K^+ -Ionen keinen Einfluss auf das erhaltene Produkt nahm, wurde postuliert, dass sie lediglich die Substratbindung unterstützten (Green *et al.*, 2009).

Das Bakterium *Streptomyces griseus* produzierte das Sesquiterpenoid (+)-Epicubenol, wobei Mg^{2+} als Kofaktor bevorzugt wurde. Mit Mn^{2+} konnte lediglich eine Aktivität von 12 % nachgewiesen werden. Setzte man Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} oder Cu^{2+} als Kofaktor ein, war keine Aktivität nachweisbar (Nakano *et al.*, 2012).

Auch zu STS isoliert aus Vertretern des Reiches der Pilze gibt es Untersuchungen zur Metallionenabhängigkeit. Die Aristolochensynthase aus dem filamentösen Pilz *Penicillium roqueforti*, verwendet für die Herstellung von Blauschimmelkäse, zeigte sowohl mit Mg^{2+} als auch Mn^{2+} Aktivität. Wurde jedoch eine Konzentration von 0,01 mM Mn^{2+} überschritten, inhibierte dies die Reaktion (Hohn & Plattner, 1989). Die STS Omp6 und Omp7 aus *Omphalotus olearius*, sowie Stehi25180, Stehi64702 and Stehi73029 aus *Stereum hirsutum* produzierten alle das aus einer 1,11-Zyklisierung hervorgehende Δ^6 -Protoilluden und wiesen mit über 50 % eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (Quin *et al.*, 2013; Wawrzyn *et al.*, 2012). Für Omp6 und Omp7 konnte gezeigt werden, dass sie sehr spezifisch sind und sich das Produktspektrum durch den Einsatz von Mn^{2+} statt Mg^{2+} nicht ändert (Quin *et al.*, 2015). Ersetzte man für Stehi73029 Mg^{2+} durch Ca^{2+} im Reaktionsmedium, änderte sich dadurch das Produktspektrum erheblich (siehe Abbildung 1-4).

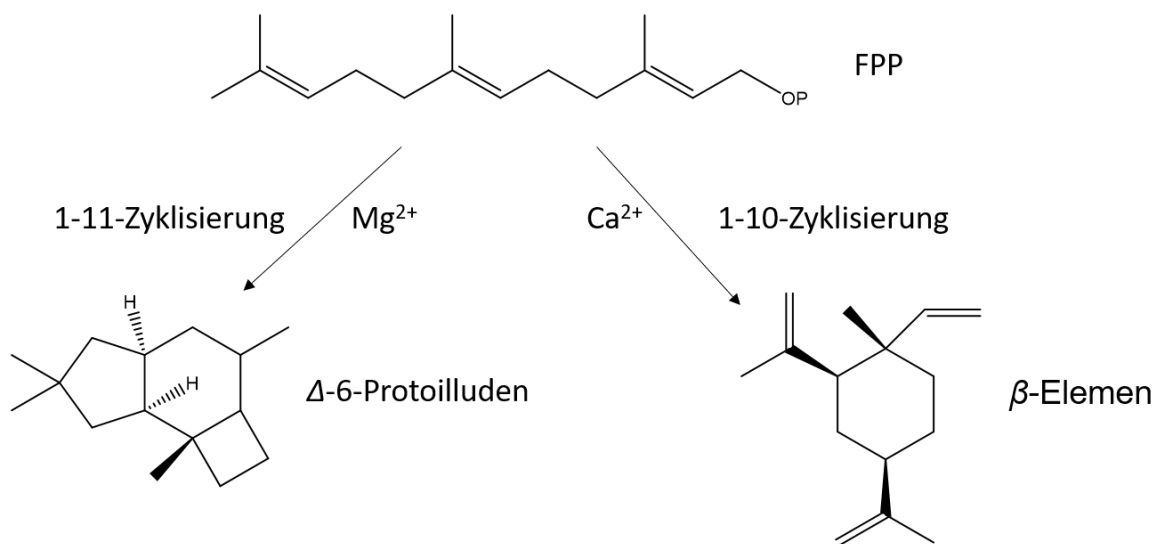


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Änderung im initialen Zyklisierungsmechanismus von STS Stehi73029 bei der Zugabe von Ca^{2+} .

Δ^6 -Protoilluden wurde durch β -Elemen als Hauptprodukt ersetzt. Dabei fand ein Wechsel der initialen Zyklisierung von 1,11 zu 1,10, statt. Per CD-Spektroskopie konnten keine

Änderungen der Sekundärstruktur festgestellt werden, sodass durch die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen keine strukturellen Änderungen angenommen werden. Im gleichen Zuge konnte unter Einsatz von Ca^{2+} die Produktion von β -Elemen als Hauptprodukt ebenfalls für die STS Stehi25180 und Stehi64702 gezeigt werden. Für Omp6 und Omp7 wurde zudem eine signifikant niedrigere Produktausbeute festgestellt (Quin *et al.*, 2015). Auch in Anwesenheit von Mn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} zeigten die fünf zuletzt genannten STS Restaktivität, ohne Änderungen des Produktspektrums, jedoch verbunden mit einer stark verringerten katalytischen Effizienz im Falle von Co^{2+} und Ni^{2+} . Zur Erklärung wurden die unterschiedlichen Ionenradien sowie die Koordinierungsgeometrie angeführt. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren und anschließender Strukturmodellierungen konnte Glutaminsäure an Position 182 als Schlüsselaminosäure für die hohe Metallionenpromiskuität von Stehi73029 identifiziert werden. Eine generelle Erklärung für Unterschiede in der Metallionenaffinität ist eine negativgeladene Aminosäure jedoch nicht. Omp6 und Omp7 zeigten eine geringe Affinität und wurden an der entsprechenden Position verändert, besaßen jedoch keine höhere Metallionenaffinität als zuvor (Quin *et al.*, 2015). Eine weitere Erklärung könnte die Interaktion von Metallionen wie Ca^{2+} mit Aminosäuren des H-alpha1-loops sein, da dieser eine wichtige Rolle für das Produktspektrum von STS spielt (López-Gallego *et al.*, 2010).

Ein generelles Muster bei der Metallionenabhängigkeit von TPS kann für keinen Zweig ihres phylogenetischen Baums getroffen werden. Gerade die Arbeiten von Köllner und Picaud zeigten, dass Mg^{2+} und Mn^{2+} bei STS am weitesten verbreitet sind, aber auch einige andere Metallionen können eine Aktivität hervorrufen (Köllner *et al.*, 2008; Picaud *et al.*, 2005). Viele Arbeiten beschäftigten sich mit der Strukturaufklärung von Enzymen dieser Klasse und zeigten, welche Aminosäuren der aktiven Stelle an der Koordinierung der jeweiligen Metallionen beteiligt sind. Es ist bekannt, dass Pflanzen Änderungen im Sesquiterpenprofil im Falle von pathogenen Infektionen zum *signaling* und als Abwehr nutzen. Ähnliches ist bei Pilzen vorstellbar. Welche Rolle einzelne Metallionen spielen, bedarf jedoch weiterer Forschung. Aber wie der zurückliegende Abschnitt zeigt, ist die Datenlage zu gering, um ein umfassendes Resümee zu diesem Thema geben zu können.

1.4 Nebenströme der Agro- und Lebensmittelindustrie

Möchte man Lebensmittel für einen anderen Zweck als den der Ernährung einsetzen, muss dies gut begründet und der Nutzen klar erkennbar sein. Für eine Verwendung als Kulturmedium oder als Additiv zu diesem können bei biotechnologischen Verfahren alternativ zu verzehrfähigen Lebensmitteln Nebenströme der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden. Das Schließen von Stoffkreisläufen erzielt nicht nur eine wesentlich höhere Akzeptanz, sondern ist zudem kostengünstiger. Als Nebenstrom der Agro- und Lebensmittelindustrie wird alles definiert, was während des Produktionsprozesses nicht vom Ausgangsmaterial in das jeweilige Produkt umgewandelt und daher oft auch als Abfall- oder Nebenprodukt bezeichnet wird. Betrachtet man beispielhaft die Produktion von Fruchtsaft, so verbleiben nach der Pressung im Durchschnitt 40 % der zuvor eingesetzten Früchte als Reststoff und müssen entsorgt werden. Dabei fallen Schalen, Kerne und Fruchtfleischreste an. Jedes Jahr wird so eine große Menge biologisch abbaubarer Abfälle und Nebenprodukte ungenutzt entsorgt. Diese Nebenströme enthalten zum Teil noch sehr große Mengen an Nährstoffen wie Lipide, Kohlenhydrate, Proteine, Vitamine, organische Säuren, Antioxidantien und Mineralien (Švarc-Gajić *et al.*, 2020).

Aus der modernen Biotechnologie sind Firmen, die Nebenströme verwerten, nicht mehr wegzudenken. Die Kynda Biotech GmbH entwickelt beispielsweise Fleischersatzprodukte aus Pilzmyzel, das auf Nebenströmen der Agro- und Lebensmittelindustrie kultiviert wird. Pilze wie *Fusarium venenatum* IR372C, ein Ascomycet, werden durch ihre fadenartige, dem Muskelprotein ähnliche Struktur gerne als Fleischersatz eingesetzt („Quorn“). Es muss sichergestellt sein, dass der eingesetzte Pilz keine Toxine produziert oder möglicherweise ein allergenes Potenzial aufweist (Hashempour-Baltork *et al.*, 2020). Gerade die Spezies *Fusarium* birgt das Risiko von allergischen Reaktionen (Hoff *et al.*, 2003). In 2015 wurden neben *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes* und *Flammulina velutipes* insgesamt 29 Basidiomyceten auf Rückständen der Pflanzenölgewinnung, den sogenannten Presskuchen, kultiviert. Bei insgesamt 18 der eingesetzten Pilze wurde durch den Einsatz von Rapspresskuchen im Kulturmedium die Pilzbiomasse signifikant erhöht (Krupodorova & Barshteyn, 2015). In einer anderen Studie wurde Apfeltrester als Substrat für *Pleurotus sapidus* eingesetzt. Hier war nicht die Biomasse insgesamt das Ziel, sondern die Erschließung einer alternativen veganen Proteinquelle (Ahlborn *et al.*, 2019). Aber auch zur Produktion lebensmitteltechnologischer relevanter Enzyme mit Basidiomyceten wurden die Pilze bereits auf Nebenströmen kultiviert. Laccasen wurden zur Quervernetzung bei der

Herstellung veganer Gele eingesetzt (Khalighi *et al.*, 2020). Durch den Zusatz von Mandarinenschalen zum Kulturmedium konnte die Produktion von Laccasen durch *Cerrena unicolor*, *Trametes versicolor* und andere Basidiomyceten in Einzel- und Co-Kultivierungen gesteigert werden (Kachlishvili *et al.*, 2021).

Im Folgenden werden die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Nebenströme und ihre bisherigen Möglichkeiten der Verwertung erläutert.

1.4.1 Rapspresskuchen

Allein in der EU fallen pro Jahr 32 Millionen Tonnen von diesem Nebenstrom an (FEDIOL Statistics, <https://www.fediol.eu/web/2019/1011306087/list1187970188/f1.html>, aufgerufen am 14 Februar 2023). Anders als Rapsextraktionsschrot fällt Rapspresskuchen bei der Gewinnung von kaltgepresstem Rapsöl an und hat dadurch einen höheren Restfettgehalt. Der Fettgehalt schwankt mit 10-30 % sehr stark und hängt maßgeblich vom verwendeten Pressdruck ab. Der Proteingehalt liegt bei 19-45 % (Rakita *et al.*, 2023). Durch mehrstufige Extraktionsschritte können zudem Faserstoffe, Phytochemikalien und auch Antioxidantien gewonnen werden (Baiano, 2014). Die Menge an extrahierbarem Protein hängt stark von der vorangegangenen Methodik der Ölgewinnung ab. Bei der Verwendung von kaltgepresstem Rapspresskuchen ohne jegliche Wärmebehandlung während des gesamten Prozesses erhält man die höchsten Ausbeuten an Protein (Östbring *et al.*, 2019). In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Extraktion von Stoffen mit emulgierenden Eigenschaften stark von der vorangegangenen Ölextraktion und der späteren Behandlung mit Wärme abhängig ist. Auch die Konzentration an Natriumchlorid nimmt Einfluss auf die Ausbeute der Proteinextraktion (Fetzer, 2018).

Die häufigste Nutzung des Nebenstroms ist die Verfütterung an Rinder, Schweine und Hähnchen, da er reich an Protein ist. Durch die Kombination von Rapspresskuchen und Extraktionsschrot lässt sich das kostenintensivere Sojaextraktionsschrot ersetzen (Jilg, 2005) und in Einzelfällen sogar die Milchleistung von Kühen erhöhen (Weigel, 2008). In 2016 konnte erstmals gezeigt werden, dass aus Presskuchen extrahiertes Rapsprotein in der Humanernährung eingesetzt werden kann (Wanasundara *et al.*, 2016). Der postprandiale Insulinspiegel blieb länger stabil und es kam zu einer längeren Sättigung (Volk *et al.*, 2020). Problematisch bleibt der Gehalt an Bitterstoffen, vor allem Kaempferol-3-O-(2'''-O-sinapoyl- β -sophorosid) (Hald *et al.*, 2019). Durch eine Vorbehandlung von Rapsprotein mit der Ferulasäure-Esterase aus *Schizophyllum commune* lässt sich jedoch der Gehalt von

Kaempferolen deutlich reduzieren (Siebert *et al.*, 2022). Auch die Energiegewinnung ist eine Form der Verwertung von Rapspresskuchen. Obwohl es sich nicht um ein offizielles Substrat nach dem Gesetz für erneuerbare Energien (EEG 2012 §27 Absatz 2) handelt, wird es in Biogasanlagen genutzt und auch in der direkten Verbrennung eingesetzt.

In der Produktion von Enzymen mittels Festbettreaktor wird Rapspresskuchen ebenfalls als Medienbestandteil eingesetzt. Parameter wie die Reaktionszeit, Wassergehalt und pH spielen eine große Rolle. Vor allem die Beeinflussung des Zellwachstums durch Partikelgröße und Gehalt des Nebenstroms haben einen wesentlichen Einfluss auf die Enzymausbeute bei solchen Fermentationen (Thakur *et al.*, 2015). Beispiele sind die Produktion von Proteasen mit *Aspergillus ficuum*, *Streptomyces thermovulgaris*, *Aspergillus oryzae* (Medhe *et al.*, 2018), Phytase mit *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus oryzae* (Ramachandran *et al.*, 2007), sowie β -Glukosidase mit *Trichoderma reesi* (Alhomodi *et al.*, 2022).

1.4.2 Ahornholz

Sägespäne und Hackschnitzel zählen zu den Nebenprodukten, die in Sägewerken anfallen. Diese hatten allein in Deutschland im Jahr 2010 ein Aufkommen von ca. 15 Mio. m³ (Mantau, 2012). Die häufigste Verwendung findet sich in der energetischen Nutzung, zum Beispiel als Pellets, oder in der Herstellung von Spanplatten (Thrän *et al.*, 2009). Eine weitere Möglichkeit der Verwertung von diesem Nebenstrom ist die Extraktion des Biopolymers Cellulose. Zur Verbesserung der chemischen und mechanischen Eigenschaften ist jedoch häufig der Mix mit anderen Polymeren nötig (Ferreira *et al.*, 2016). Auch Lignin kann aus Holzabfällen gewonnen werden. Es lässt sich chemisch modifizieren und in unterschiedliche Matrices eingebettet als Verpackungsmaterial einsetzen (Banu *et al.*, 2019). Biopolymere aus Holzabfällen haben vor allem in der Verpackung von Lebensmittel eine große Zukunft (Kumar *et al.*, 2022). Ein weiterer Weg der Verwertung von Abfällen der Holzindustrie ist die Produktion von Bioethanol, etwa durch die Entfernung von Lignin, eine Vorbehandlung mit cellulolytischen Enzymen und eine anschließende Fermentation mit Ethanolproduzierenden Organismen wie Hefen und Bakterien (Liguori *et al.*, 2013). Presst man den Holzsaft aus entsprechenden Abfallströmen, kann dieser zur Synthese von Polyhydroxyalkanoaten durch die Kultivierung mit *Bacillus sp.* G8_19 eingesetzt werden (Ciesielski *et al.*, 2021). Eichenholzspäne finden unter anderem Einsatz in der Kultivierung des Basidiomyceten *Grifola frondosa* zur Gewinnung von Xylanasen und Cellulasen (Montoya *et al.*, 2012).

Ahornholzspäne wurden für diese Arbeit ausgewählt, da der eingesetzte Pilz natürlicherweise bevorzugt auf Ahorn- und Birkenholzstämmen wächst. Daher wurde eine induktive Wirkung von Ahornholz im Kulturmedium postuliert.

1.4.3 Kartoffelstärke

Stärke besteht aus den beiden Polysacchariden Amylose und Amylopektin in unterschiedlicher quantitativer Zusammensetzung. Je nach botanischer Herkunft unterscheidet sich das Verhältnis der beiden zueinander sehr (Martens *et al.*, 2018).

β -Cyclodextrine werden für immer mehr Anwendungen benötigt. Zur Minimierung der Produktionskosten konnte ein Prozess etabliert werden, in dem Kartoffelstärke mit einer heterolog produzierten Cyclodextrin-Glucanotransferase umgesetzt wird (Amara *et al.*, 2022). Neben dem Einsatz als Agens zur Herstellung von Filmen für technische Anwendungen (Javanbakht & Namazi, 2017) wird Stärke vor allem für die Herstellung von Aerogelen und Schäumen genutzt und dient damit überwiegend der Verpackungsindustrie (Silva *et al.*, 2020).

Durch die Fermentation von Kartoffelstärke mit *Geobacillus stearothermophilus* kann Milchsäure hergestellt werden (Smerilli *et al.*, 2015). Durch die Kultivierung von *Aureobasidium pullulans* auf Kartoffelstärke konnten parallel die vielfältig einsetzbaren Stoffe Pullulan und Melanin produziert werden (Lin *et al.*, 2022).

1.4.4 Weizenkleie

Weizenkleie ist mit einem Gehalt von 35-60 %, je nach Verarbeitungsgrad, eine gute Ballaststoffquelle (Li *et al.*, 2016). Die Gewinnung findet meist durch saure, alkalische, physikalische oder enzymatische Extraktion statt. Durch den Einsatz der zusätzlichen Ballaststoffe in der Brotherstellung erhöht sich die Wasserbindefähigkeit des Teiges. Dies führt zu einer erhöhten Plastizität während des Herstellungsprozesses und einem erhöhten Volumen des fertigen Produkts (Chaari *et al.*, 2022). Auch der Einsatz als Füllstoff in der Herstellung von biobasierten und -abbaubaren Kunststoffen ist ein mögliches Einsatzgebiet von Weizenkleie (Aliotta *et al.*, 2022).

Es werden aber auch immer mehr Festbett-Fermentationsprozesse etabliert. Ein Beispiel ist die Produktion von phenolischen Säuren mit *Aspergillus niger* (Yin *et al.*, 2019) oder *Formitopsis pinicola* (Tu *et al.*, 2020). Weiterhin wurden mit Hilfe der drei aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannten Pilze *Isaria cicadae* Miq.,

Cordyceps militaris, und *Inonotus obliquus* Flavonoide und Aromastoffe wie Ester und Aldehyde aus Weizenkleie gewonnen (Li *et al.*, 2022). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass sich mit Weizenkleie durch die Ganzzell-Biokonversion mit einem genetisch veränderten *Escherichia coli*-Stamm *cis-cis*-Muconsäure herstellen lässt (Molinari *et al.*, 2023).

1.4.5 Zitrusfruchtschalen

Die Schale von Zitrusfrüchten ist ein Abfallstrom der Lebensmittelindustrie mit einem jährlichen Volumen von 50 bis 100 Millionen Tonnen weltweit. Sie enthalten eine Vielzahl organischer Substanzen, vor allem D-Limonen. Die antimikrobiellen Eigenschaften machen es schwierig, sie als Medienzusatz in Fermentationen einzusetzen (Zema *et al.*, 2018). Neben ätherischen Ölen enthalten sie ebenfalls Polyphenole und Carotinoide. Die Gehalte dieser Wirkstoffe mit anti-carcinogenen, antimutagenen und antiallergenen Eigenschaften sind in den Schalen um ein Vielfaches höher als in der restlichen Frucht (Londoño-Londoño *et al.*, 2010). Die Gewinnung dieser Stoffe ist jedoch in den meisten Fällen ineffektiv und sehr kostenintensiv (Chemat *et al.*, 2012). Das Heteropolysaccharid Pektin lässt sich durch den Einsatz von Mikrowellen, Ultraschall, durch Enzyme oder mit Hilfe von subkritischem Wasser aus Zitruschalen gewinnen (Adetunji *et al.*, 2017). Außerdem sind Flavonoide enthalten, die einen therapeutischen Nutzen haben können. So konnte ein ethanolscher Extrakt erfolgreich in der Behandlung von Epilepsie eingesetzt werden (Sharma *et al.*, 2023). Die Fermentation von monokaryotischen Stämmen des Pilzes *Pleurotus ostreatus* auf Zitruschalen kann für die Produktion von *p*-Anisaldehyd und (2*S*)-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon genutzt werden (Bürger *et al.*, 2022).

1.4.6 Traubentrester

Traubentrester ist ein Abfallprodukt der Wein- und Traubensaftproduktion. Die Hauptbestandteile sind Schale, Kerne, Stängel und Fruchtfleisch. Eine Möglichkeit, Traubentrester zu recyceln, ist die Herstellung von Tresterbrand. Die wohlbekanntesten Vertreter sind *Grappa* aus Italien oder *Marc de Champagne* aus Frankreich. Nach einer Aufbereitung von Traubentrester können die daraus separierten Traubenkerne außerdem zu Traubenkernöl gepresst werden. Seit 2016 gibt es zudem die Idee, Lederersatz aus Traubentrester herzustellen. Durch den hohen Gehalt an antioxidativ wirkenden Polyphenolen konnte der Trester von *Cabernet Sauvignon* Trauben dazu genutzt werden, asphalthaltigen Straßenbelag widerstandsfähiger und langlebiger zu machen (Sandoval *et al.*,

2019). Die wohl gebräuchlichste Form des Recyclings ist die Ausbringung von Traubentrester als organischer Dünger durch die Weinbauern. Durch den hohen Gehalt an Stickstoff und Phosphat ist dies eine gute Möglichkeit der Nährstoffrückführung. Die Ausbringung von Trester ist abhängig von der Dauer der vorherigen Lagerung und der Lage des Weinberges, geregelt durch die Düngeverordnung (DüV, Art. 1 der V v. 26.5.2017 I 1305, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft). Auch gibt es Ansätze, die enthaltene Weinsäure (Devesa-Rey, 2011) oder Phenole (Lucarini *et al.*, 2018; Weseler & Bast, 2017) aus Traubentrester zu extrahieren. Nach dem Pressen verbleiben ca. 70 % der enthaltenen Polyphenole im Trester (Beres *et al.*, 2017).

Ebenfalls wurde untersucht, ob durch den Zusatz von Traubentrester in Pulverform die Haltbarkeit von Fleischprodukten durch Inhibierung der Fettautoxidation erhöht werden kann (Ryu *et al.*, 2014). Durch die enthaltenen Anthocyane wurde jedoch in allen untersuchten Lebensmitteln die Farbtintensität erhöht, was zu einer deutlich schlechteren Akzeptanz bei Testessern führte (Özvural & Vural, 2011).

Ein Zusatz von Traubentrester führte zu einer Erhöhung des Proteingehalts von *Pleurotus albidus* während der Festbettfermentation (Stoffel *et al.*, 2019). Durch die Umsetzung von Traubentrester mit *Saccharomyces cerevisiae* kann Bioethanol hergestellt werden (Rodríguez *et al.*, 2010).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Nachhaltige Produktionsverfahren gewinnen nicht zuletzt wegen des Klimawandels immer mehr an Bedeutung. Die Biotechnologie zeigt Möglichkeiten auf, ressourcenschonende und hocheffiziente Prozesse zu etablieren. Durch Ähnlichkeiten zum metabolischen Potenzial von Pflanzen bergen Basidiomyceten vielfältige Möglichkeiten zur biotechnologischen Produktion von Aroma- und Naturstoffen. Auch Enzyme aus Basidiomyceten fanden in der Vergangenheit bereits Anwendung in der Lebens- und Waschmittelindustrie. Die Untersuchung des Volatiloms von immer mehr Vertretern dieser Spezies zeigt, welches großes Potenzial man sich in Zukunft noch erhofft (Ezediokpu *et al.*, 2022; Freihorst *et al.*, 2018; Gressler *et al.*, 2021; Rühl *et al.*, 2018). Ein damit einhergehendes wachsendes Verständnis der Regulierung und der zugrundeliegenden Biosynthesewege bietet Möglichkeiten für Ganzzell- oder *in vitro*-Prozesse, hocheffiziente biotechnologische Produktionsverfahren für nachgefragte Naturstoffe zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es, Möglichkeiten für eine biotechnologische Produktion von Sesquiterpenen mit dem Basidiomyceten *Cerrena unicolor* (Cun) aufzuzeigen. Dazu sollten zuerst die in das Kulturmedium sekretierten Sesquiterpene identifiziert und die für ihre Synthese verantwortlichen Sesquiterpensynthasen (STS) kloniert werden. Sequenzvergleiche dienten der Identifikation der STS-Gene im Genom von Cun, sowie der Ermittlung von STS-typischen Motiven. Nach erfolgter heterologer Expression sollten die Synthasen, mit dem Fokus auf einer eindeutigen Zuordnung von Enzym und jeweiligem Produkt sowie Untersuchungen zur Metallionenabhängigkeit der Produktbildung, funktionell charakterisiert werden. Weil es vor allem für STS aus Pilzen zum Thema der Metallionenpromiskuität bisher kaum einschlägige Untersuchungen gibt, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und damit das Verständnis auf diesem Gebiet erweitert werden.

Ferner sollte die Verwendung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zur Kultivierung von Basidiomyceten zur Produktion von sesquiterpenoiden Aromastoffen unter ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten evaluiert werden.

3 Vorwort zur Publikation „Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete *Cerrena unicolor*“

Bei Sesquiterpenen handelt es sich um eine vielfältige Klasse von Naturstoffen, die eine Vielzahl von Bioaktivitäten aufweist und auch als Aromastoff sehr gefragt ist. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der Basidiomycet *Cerrena unicolor* (Cun) Sesquiterpene produziert (Grosse *et al.*, 2019).

Teil der nachfolgend dargestellten Publikation war die Identifizierung der entsprechend beteiligten Sesquiterpensynthesen (STS). Nach der Klonierung und heterologen Produktion stand die funktionelle Charakterisierung im Fokus. Da sich die Aufklärung der Metallionenabhängigkeit bisher auf pflanzliche und nur einige wenige STS aus Pilzen beschränkt, wurden zwei STS aus Cun auch auf diese Eigenschaft hin untersucht. Die STSs Cun3157 und Cun7050 wurden aufgrund ihres sehr unterschiedlichen Produktspektrums als Modellenzyme ausgewählt und sollten das Wissen über das Phänomen der Metallionenpromiskuität im Bereich der STS erweitern.

Nukleotid- sowie Aminosäuresequenzen der STS und die zur Klonierung genutzten Primer können dem Anhang entnommen werden.

An der Arbeit beteiligt waren Frau Dr. Ersoy, Herr Dr. Krings, und Herr Prof. Berger. Herr Berger stellte die notwendigen Mittel zur Verfügung und verfolgt seit geraumer Zeit Fragen der Bildung und Regulation von flüchtigen terpenoiden Naturstoffen aus Basidiomyceten. Franziska Ersoy und Ulrich Krings übernahmen die wissenschaftliche Betreuung. Ulrich Krings unterstützte zudem bei der Datenauswertung und -interpretation.



Die nachfolgende Arbeit wurde in der *peer-reviewed* Zeitschrift *Catalysts* (MDPI) als Teil des *Special Issue „Enzyme Catalysis, Biotransformation and Bioeconomy“* akzeptiert und veröffentlicht (<https://doi.org/10.3390/catal11111361>).

4 Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete *Cerrena unicolor*



Article

Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete *Cerrena unicolor*

Nils Püth *, Franziska Ersoy , Ulrich Krings and Ralf G. Berger 

Institut für Lebensmittelchemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany; franziska.ersoy@lci.uni-hannover.de (F.E.); krings@lci.uni-hannover.de (U.K.); rg.berger@lci.uni-hannover.de (R.G.B.)

* Correspondence: nils.pueth@lci.uni-hannover.de

4.1 Abstract

Hundreds of terpenoids have been isolated from Basidiomycota, among them are volatile mono- and sesquiterpenes with amazing sensory qualities, representing a promising alternative to essential oils from endangered plant species. Sesquiterpene synthases (STS) appear to be an abundant class of enzymes in these fungi. The basidiomycete *Cerrena unicolor*, a known sesquiterpene producer, was in silico screened for sesquiterpene cyclases via homology Basic Local Alignment Search Tool searches. Cyclase genes identified were cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli* B121 using pCOLDI as the expression vector. Ten cyclases were successfully produced and purified, and their identity was confirmed using amino acid sequencing of tryptic peptides by nano-liquid chromatography-high resolution-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Gas chromatography/mass spectrometry analysis was applied to characterize these cyclases according to the formation of sesquiterpene hydrocarbons and oxidized terpenoids. Bioinformatic characterization and phylogenetic determination allowed for the classification of these diverse fungal enzymes. A representative single and a multi-product STS, respectively, were further analyzed for their dependency from divalent metal cations as a cofactor for the catalytic activity.

Keywords: sesquiterpenes; terpene cyclases; metal ion dependency; phylogenetic analysis; heterologous expression; *Cerrena unicolor*

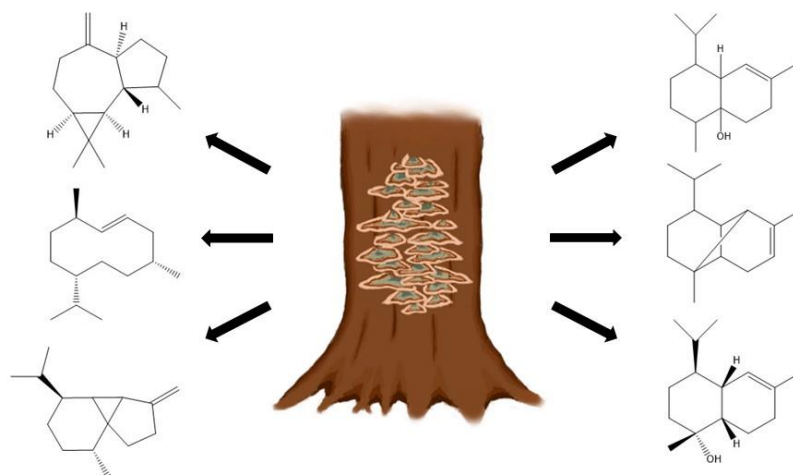


Figure 4-1: Graphical abstract

4.2 Introduction

Fungi and, in particular, the division of Basidiomycota, are known to exhibit amazing metabolic diversity. They produce a wide range of complex natural compounds of industrial interest; among them are polyketides and terpenoids (Zhong, 2009). While polyketides have been studied intensively in the past, terpenoids and their biosynthesis have received less attention (Pateraki, 2015). Although structurally highly diverse, with more than 95,000 terpenoid compounds known, this group of natural products is based upon the same building blocks (Faylo *et al.*, 2021). Mono (C10)-, sesqui (C15)-, di (C20)-, sester (C25)-, and tri (C30)-terpenes result from the chain elongation of five-carbon isoprene starters, namely dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) and isopentenyl pyrophosphate (IPP) (Christianson, 2017). The ability to form such a diversity of products out of small linear precursors is largely caused by the catalysis of two types of terpene synthases (TPS), prenyltransferases and terpene cyclases. Whereas prenyltransferases are responsible for chain elongation, cyclases convert linear C5-isoprenoid pyrophosphates into structurally complex hydrocarbons containing multiple rings and stereocenters. Cyclic sesquiterpenoids, for instance, originate from C15 farnesyl pyrophosphate (FPP), which represents the structural core of a multitude of functionalized, bioactive sesquiterpenoids. Sesquiterpenoids serve as antibiotics (Alves *et al.*, 2012), antifouling agents (Mehbub *et al.*, 2014), or anti-cancer drugs (Fidyt *et al.*, 2016). Furthermore, they are widely utilized as flavors and fragrances in the food and cosmetic industries (Leonhardt & Berger, 2015; Moniodis *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2015). Thus far, these sought-after compounds are derived mostly from plant essential oils, but these can be exploited only once a year. As quality and harvest depend on variable factors such as climate, pests, transport, and storage conditions, and the recovery from plant raw materials is costly and time consuming (Chemat *et al.*, 2012), alternative bioprocesses are of increasing interest (Liu *et al.*, 2018). Cell cultures of plant cells are known to dedifferentiate and stop secondary pathways under typical culture conditions. Whole-cell conversion systems may produce highly desired products, starting from simple sugars and/or nitrogen-sources, but the product yield is typically very low. An alternative to natural sources is chemosynthesis. However, limited stereoselectivity, harsh reaction conditions, and the usage of poisonous transition metals are the main disadvantages. Thanks to modern developments in the field of molecular biology, the identification of suitable STS for terpene production has been simplified (Bian *et al.*, 2017). Several whole-genome projects have generated a large pool of uncharacterized, and, therefore, unexploited genes in the kingdom of fungi (Quin *et al.*, 2014; Schmidt-Dannert, 2014). To explore the potential of fungal enzymes in biotechnological applications,

their catalytic mechanisms must be characterized. Heterologous expression and functional characterization will open the gate for industrial implementation. *Cerrena unicolor* (Cun), a poroid fungus of the genus *Cerrena*, is classified as a white-rot fungus. So far, this fungus has been studied for the production of manganese peroxidases and lignin-degrading laccases (Kachlishvili *et al.*, 2014; Michniewicz *et al.*, 2006). In a preliminary study, Cun attracted attention as a producer of several sesquiterpenoids (Strauss, 2018). The aim of this work was the *in silico* identification of the corresponding STS in the genome of Cun. After cloning and heterologous production in *Escherichia coli* (*E. coli*), biochemical and phylogenetic classification was carried out with a focus on the metal ion dependency of the catalytic activity.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Identification of genes

Two general classes of terpene cyclases are distinguished based on the folds (α , β , γ) and the metal binding motifs. Class I cyclases show catalytic activity in an α domain, where a trinuclear metal binding site (Mg²⁺ A, B, C) is located, which consists of conserved D(D/E)XXD (Mg²⁺ A, C) motifs and an NSE/DTE (Mg²⁺ B) motif. Catalysis by class II cyclases is located in a β -domain, and the aspartic acid responsible for the protonation of a terminal double bond of the isoprenoid is found in the center of the conserved signature sequence motif DXDD (Faylo *et al.*, 2021).

To locate the putative sesquiterpene synthases (STS) in the genome of the basidiomycete *Cerrena unicolor*, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analyses based on these motifs were performed. Genomic data (Accession number PRJNA207864) were provided by the Joint Genome Institute (Nordberg *et al.*, 2014). A BLAST search within the genome of Cun resulted in 14 putative STS. BLAST searches with consensus sequences have already been used for the identification of potential terpene synthases (TPS) within fungal genomes, but the majority of these putative TPS have not yet been expressed and biochemically characterized (Zhang *et al.*, 2020). To gain insight into the biochemistry of STS from Cun, all 14 putative cyclases were selected for cloning and expression in *E. coli*. As shown in Figure 4-2, 10 active STS (see also Section 4.3.2) contained sequences of conserved motifs typical for the TPS family.

The first conserved motif is the aspartate-rich D(D/E)XXD sequence coordinating the Mg²⁺ (A, C) cluster, essential for the catalytic hydrolysis of the pyrophosphate group of the

terpenoid substrate, together with a highly conserved NSE triad (Christianson, 2006). This suggests that all STS are class I cyclases. A highly conserved arginine residue, suspected as a pyrophosphate sensor and an arginine-tyrosine dimer close to the C-terminus, involved in pyrophosphate binding, was described for TPS (Dickschat, 2016; Rabe *et al.*, 2016). Interestingly, the pyrophosphate sensor R was found to be a single arginine in the upstream position of the NSE motif in *Trichoderma viride* J1-030 (Sun *et al.*, 2019). However, for all *Cun* TPS a highly conserved RR-dimer was observed at the respective position. Furthermore, highly conserved motifs were detected in the multiple sequence alignment (Figure 4-2). An RF dimer and an AXXR motif were located upstream of the before mentioned pyrophosphate sensor. Their role in forming the active site cavity or the reaction cascade of the respective STS is not yet known and needs to be clarified by X-ray crystallography.

stc_3817	MVMYKRNAIFNDGFTVIQIDIPSSISLFFTMVWVQLRPFPSRFVLDLAVTEFVFKLRI	60
stc_5155	-----MANESLITITQLFI PDVLR--SWPWRQI	26
stc_9106	-----MSTESSASSEFYIPDTLR--NMFWSRHL	26
stc_3157	-----MSSNAVSTFLPDLLA--ICPLQGRIT	23
stc_3158	-----MPALTRIFKLPDLLS--MCPVKGST	23
stc_0773	-----MVAHTFSLDFEFA--KTPVQSRIL	21
stc_7050	-----MQSATAFVLSQSKVVI PDLVS--HCDFTLR	31
stc_0716	-----MSRFNADSFVLPDLVS--HCTVFLNL	24
stc_0759	-----MARSTFALPDVLS--HCPVFLRI	21
stc_3574	-----MSPKRFFVFDLVS--HCPYQLRI	21
	: : *	
stc_3817	NPHQEAYRNIERWFKDLKVVPEPKQRKFLSHAFDLYAGLSFPDADVEHLETICIAFFLWA	120
stc_5155	NPHYAICKAESDTWAQSFNAFSMPKAQAFRLRCDFDLLASLGCPRLDKEGCRICCDLMQLF	86
stc_9106	NPHYAICKAESAAWCEFNAFSPKAQAFNRCDFNLLASLAFLLDKDQGRIGCDLMLNLF	86
stc_3157	NPHYEAAAAESSAWVLSFNVFSNRKQDFVSGGSELLCSHAYPYAGHEELRTRCCDFVNL	83
stc_3158	NPHYEKAASAAWVLSFNVFTDQKRAFFIQGSNELLVSHYTPYADYQFRCCDFVNL	83
stc_0773	HPLTIGIVVQKQEWLKVNYDEKERTAFKLTSGGLLGCYCPNADAFHICADWMDWV	81
stc_7050	NSHQERASAECKEWFQGSNLSERKQNAFHGLKAGLLTWCYPADEYHHLRVCDFMNL	91
stc_0716	NTNWHVSRSASEQFVLEENLSEMKRQVFMGLKAGELTSAICYPCDAFHLQVAAFDLGLV	84
stc_0759	NPLCDIVTQKSEENILNEAKYIPEKRI RFLNFKAGILTAYCYPDADFHLQVSSDYLNL	81
stc_3574	HPDCCIVNKTSEENIMKDIITFPDRKRFLDIKAGVLTAYCYCDADLFRLQASSDYLNL	81
	: : *	
stc_3817	FSDDLSDGEFQSKPDRVQGVDSIMEVLNHPLEPP--PKFYAAMLHDVWRRFRSTAS	178
stc_5155	FTDEHSDVDITV----VRRQADSIMAAIRDTPRPRPEGEWGGIEISRQFWANAMRVST	142
stc_9106	FVDEYSDVADATE----VRRQADIIMDALRNSTRPRKGEWVGGEVAKQFWENAIRITIT	142
stc_3157	FTDEISDQNGQD----AYKTGLVLLKSLRDFE--YN--DGSVLCITMTKQFQERLFFPMG	136
stc_3158	FVDEVSDVQSGRD----ARATGNVFLQVMRHDD--WD--NGSPLAQMTKEFKARFRKTAG	136
stc_0773	FCDDWSDCSVAE----AQSVINSIKKEYPRYPHEHS--GSTPIIEIAKLNLYDRFFQTA	135
stc_7050	FHLDNISDMMENGG----TSRTAVDMNLTLYHFPYSY--FVSPGEGHLTQDFWRRLIFTAS	145
stc_0716	FTDDWSDFDELG----TKGLAVCMNALRDFHGFC--TDKAGILAKLQFSSRYISKGG	138
stc_0759	FCDDWSDFDEID----ACSFADCMGCLRDVPGFK--TDKAGRLTKSYGRLQTSG	135
stc_3574	FCDDWDFDEDE----SCSFKDCILGCLRDVPGYK--TDKIAGRLIADFFRRLQTSG	135
	* : : *	
stc_3817	PGACRFKAVESNMKSQVEAANRANNTVPSVDFILRRRTIGGEIVEMVVEYSLDIK	238
stc_5155	PTFQRFVAFQETDSVQQAALDRSRHNIPHEQYFWRRTIGVKPSVAMLEI--QFD	200
stc_9106	ETAQRFDTIFQLTDSVQQAADRSRIRSDVDFEWRRTIGAKPSFAILEV--KMD	200
stc_3157	PACYRFRFDHVENYINAFVKAAYRERGVVLDMSYETIRRNNSAVRCCFLGFGYVGLD	196
stc_3158	PGCYRFRFVHCENYINAVGKAEYRERGVVLDMSYETIRRNNSAIRLCFGLFFVFLGVD	196
stc_0773	PGCARRFRMSDIYLDGVEACDREKGSILDTESVTIRRTSGVWPCFALIEFAARID	195
stc_7050	PGSQRFRTMDLFFQAVTQALDRNGVVPDLSYIARRTSGCKPCWALIEFAAYNLD	205
stc_0716	PGCIRFRDTMDLFFIAVERCAIDRENGVVELEAVIPRRRTSGCKPCFALIEFAADID	198
stc_0759	PRCARRFRDTMDLYLKSVAQAADRDGRTDPLETVIGRRRTSACRPCFALMEFVAGID	195
stc_3574	PHCARRFRDTMDLYLDSVGRQAADREERTDPLESVIARRRTSACKTCFALMEFANGLD	195
	** : : * * : : * * : : *	
stc_3817	IPFVWHDHFVVLGSLRAAIDIMTWNDLCSFNKEADNDFQ--NLVFCVMLERNVDLQSA	297
stc_5155	IPFVSNHFAISTLASCVDMAIANDLFSYNVEALGDDEHNLITVWHEHECSLTDAL	260
stc_9106	IPFVSNHPSIVKLTISVICDMLIANDLCSYNVEARGDGGHNLVTVMHERKCDLTRL	260
stc_3157	LPDEIFEFHMMAMHLAAVDMVVCNDIYSYNMEAMGHTINNMIVLMKAKNVDLQAA	256
stc_3158	LPDEVFDDPAFLNLYWAAADMVVCNDVYSYNMEAKGHSGNNILTVLMQAKNIDLQAS	256
stc_0773	LPDAVVEHPLIRSMEEATNDIWSNDILFSYKESADKDAH--NLVAVIMNQVTLDLQSAV	254
stc_7050	LPNEVMEHPTIIVALGEATNDLVTVNDIYSYNVESKGDTH--NMIVVAMRQEGLDLQSAV	264
stc_0716	LPDEVVEHPTIAALEEATNDLITWNDIIFSYNVESRGDTH--NMIVVAMRQEGLDLQSAV	257
stc_0759	LPDEVAEHPLIRSMEDATNDLVSNNDIIFSYNKESRGDTH--NLVAVIMEERKLDLQSAM	254
stc_3574	LPDEVSEHPLIREMEDATNDLVSNNDIIFSYNKESLIEDTH--NLVAVIMEKKNLQSAV	254
	: : * : : * : : * : : * : : *	
stc_3817	DIVTKMLATRVDYAKFKQLPSFGA--EVDQELAAVFKALEHYVQGITVWVYVESRYR	356
stc_5155	ENISDLHDSIANTFLSMKTVPSFGDLVIDEQVAIYVDGLGNWRANEANSFESRYR	320
stc_9106	ENISDLHDLRDLGFLSTLEEVPSFENSVLQVSTVVDGLGNWRANDANSFESRYR	320
stc_3157	DYVGEYFKVLMRDFDHSKLPFFPG--DMDPTAEQVWAMESWVGNLANWFELRYR	315
stc_3158	DLVGDHFELMRRFLEGRKALPSWGL--ATDVAVAAVYKALEHWVGNLWNSFETRYR	315
stc_0773	DLAGSHCFDCITKFEDNRKALPSWGE--EIDREVLYVQGLQDNIIGSLHNSFACRYR	313
stc_7050	DFVGLCKQSIDRFEHQRAHLPSWGF--DIDQVQVYVGLADNIVGSLHNSFESRYR	323
stc_0716	DFVGLCKQSIDRFEHDLRTVPSWGF--EIDRDVRTVIQGLQDNIIVGSLHNSFDTRYR	316
stc_0759	DFAGELCHQSIDRFEADRSLPSWGF--EIDRDVQLVQGLQDNIIVGSLHNSFATRYR	313
stc_3574	DYAGDLCHNCIARFDEARKQLPSWGF--EIDREVLYVQGLQDNIIVGSLHNSFVSTRYR	313
	: : * : : * : : * : : * : : *	
stc_3817	MDVTDKTDIMVIFVYSRSADAPTSPSVSIRVSYLNRSMPPRSSKASV*-----	403
stc_5155	NGLEIQESRVVDLLPKQEN*-----	339
stc_9106	KGLEIQEKRLVLLPKQVGHSTYQVVPASVQ*-----RMPSSHCLQVLSILADTQVPLFI	375
stc_3157	KREQVKVTLVVELASKKV*-----	333
stc_3158	KHEEIKKTLVLRAPSF*-----	334
stc_0773	EGKEIKKHRTVFLSEKHQS*-----	333
stc_7050	SGLDVKKTRVVELPRRA*-----	341
stc_0716	DGETVKLHRQIKLLPRKGPCSD*-----	338
stc_0759	EGEAVKHHRTIQLLPRKDGVERKDTVVRQNV*-----V-----YLFN	350
stc_3574	EGEAIKHHRTIELTFAMKSDVEA*-----	336
	: : :	
stc_3817	-----	403
stc_5155	-----	339
stc_9106	VLL-SFLGVCFIASPSTPCLVSPLMF*---	401
stc_3157	-----	333
stc_3158	-----	334
stc_0773	-----	333
stc_7050	-----	341
stc_0716	-----	338
stc_0759	MFFIVLVGSLFGNM---KGLSSFLRVFRP*	376
stc_3574	-----	336

Figure 4-2: Sequence homology modeling of putative TPS of *Cun*. Conserved motifs are framed in red. Asterisks indicate conserved residues, colons equivalent residues and dots partial residue conservation.

4.3.2 Heterologous Production and Functional Characterization

The predicted coding sequences (Figure 4-2) were used for the design of specific primers. Isolated mRNA was translated into cDNA, an N-terminal 6× His-tag was attached and used for the amplification of the respective STS genes. After cloning into the pCOLD I expression vector, the resulting plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for recombinant gene expression and enzyme production. In contrast to plant derived STS, *E. coli* is often used as an expression host for fungal STS (Mischko *et al.*, 2018; Quin *et al.*, 2013; Wawrzyn *et al.*, 2012). In total, 10 out of 14 putative STS from *Cun* were expressed functionally. To confirm the respective cyclases' identity, the proposed STS were isolated via Ni-NTA and separated using native PAGE. Bands of the overproduced proteins were cut out and subjected to tryptic digestion, followed by peptide mass fingerprinting using nano-LC/QTOF/MS-MS (Table 4-1). Sequence coverages ranging from 45% to 86% were achieved, thereby confirming - with a different degree of similarity - the identity and successful overexpression of all STS. The generally rather high sequence coverage was remarkable.

Table 4-1: Results of peptide mass fingerprinting

STS	Molecular Mass (kDa) ¹	Sequence Coverage (%)	Score	Matches
Cun3157	40.4	70	40,853	603
Cun7050	38.8	67	15,743	256
Cun3574	38.8	86	30,151	568
Cun3158	38.2	58	12,608	229
Cun0759	43.0	69	18,445	339
Cun9106	45.7	62	8345	188
Cun5155	38.8	72	10,039	213
Cun3817	46.4	45	5341	102
Cun0773	38.2	46	4622	100
Cun0716	38.3	65	12,289	288

¹ calculated based on the AA sequence.

For functional characterization, the purified cyclases were incubated with FPP and the resulting volatile products were analyzed by GC-MS. Adjusted for control incubation with heat inactivated enzymes, products exhibiting a molecular ion at m/z 204 and fragment-ions at m/z 91, 105, 119, and 161 were indicative of an enzymatic formation of cyclic C₁₅ hydrocarbons. These products were identified by comparing both their electron impact mass spectra and linear retention indices with the published data (NIST spectral library; NIST online data base) (Table 4-2).

Table 4-2: Identified products of heterologous STS from *C. unicolor*. Product ratios are given to highlight the main products.

STS	Cyclic Terpene Products	RI Polar (Lit.)	RI Non-Polar (Lit.)	Product Ratio (%)
Cun3157	β -Cubebene ^A	1547(1540)	1385(1388)	47.4
	Germacrene D ^A	1720(1719)	1478(1476)	23.8
	γ -Amorphene ^A		1488(1491)	10.4
	δ -Cadinene ^A	1764(1762)	1515(1521)	4.3
	Epicubenol ^A	2084(2072)	1625(1625)	14.1
Cun7050	δ -Cadinol ^A	2212(2205)	1644(1647)	100
Cun3574	α -Copaene ^A	1495 (1502)	1372(1375)	100
Cun3158	β -Cubebene ^A	1546(1540)	1390(1388)	13.0
	Germacrene D ^A	1720(1719)	1477(1476)	14.4
	γ -Amorphene ^A		1488(1491)	11.0
	δ -Cadinene ^A	1765(1762)	1515(1521)	61.6
Cun5765	none			
Cun0759	α -Muurolene ^A	1729 (1711)	1495(1500)	100
Cun9106	unknown	1512	1372	100
Cun5155	Aromadendrene ^B	1632 (1608)	1432 (1442)	100
Cun6114	none			
Cun3817	γ -Cadinene ^A	1767 (1745)	1511 (1513)	100
Cun0773	Germacrene D ^A	1718 (1707)	1478 (1476)	100
Cun0716	α -Muurolene ^A	1730 (1727)	1497 (1500)	7.9
	δ -Cadinol ^A	2209 (2205)	1646 (1647)	92.1
Cun7487	none			
Cun0802	none			

^A = Matched with library spectrum (NIST database); ^B = matched with EI-MS of an authentic standard; Lit. = compared with RI from NIST online database.

Cun3157 produced β -cubebene as the main product and germacrene D, γ -amorphene, δ -cadinene, and epicubenol as the side products, whereas Cun7050 and Cun0716 produced δ -cadinol respectively, with α -muurolene as a side product for the latter STS. Cun5765, Cun6114, and Cun7487 were found to be inactive and, therefore, were not further addressed. The missing activity might be explained by difficult intron prediction (Misieki & Hoffmeister, 2008). Despite the usage of a web application such as Augustus, some recombinant STS were found inactive (Stanke *et al.*, 2004). For example, Cop5, an STS from *Coprinus cinereus* remained inactive, although a defined splicing model was used for gene prediction (Agger *et al.*, 2009). The remaining STS catalyzed the formation of a single product: Cun3574 α -copaene, Cun0759 α -muurolene, while Cun5155, Cun3817 and Cun0773 catalyzed the formation of aromadendrene, γ -cadinene, and germacrene D, respectively. The cloning of Cun0802 was not successful. The gene clusters of secondary metabolism are tightly regulated, which may have resulted in low transcript levels (Bayram & Braus, 2012; Merhej *et al.*, 2011). Cun3158 produced the same sesquiterpenes as Cun3157, except epicubenol, but with significantly less activity. Deduced from its EI-MS spectrum, the product of Cun9106

was most likely a cyclic sesquiterpene as well, but it did not match with any database entry and thus remains unidentified.

4.3.3 Phylogenetic Determination

Until now, 86 basidiomycota and 240 ascomycota have already been analyzed for homologous STS in silico, totaling to 1133 putative STS (Zhang *et al.*, 2020). Among them, only 40 STS were functionally characterized. After performing a phylogenetic analysis of basidiomycetous STS, four clades (clade I–IV) were distinguished (Figure 4-3).

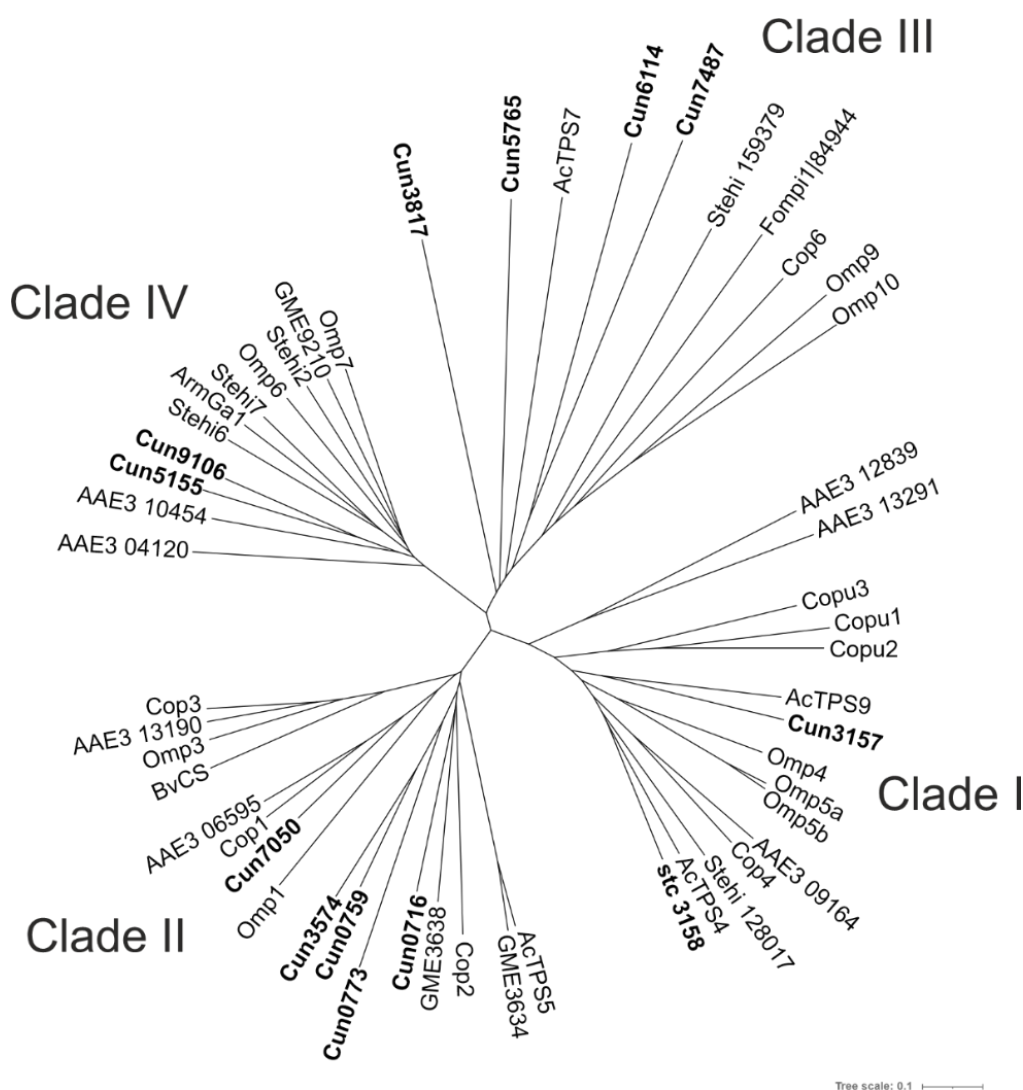
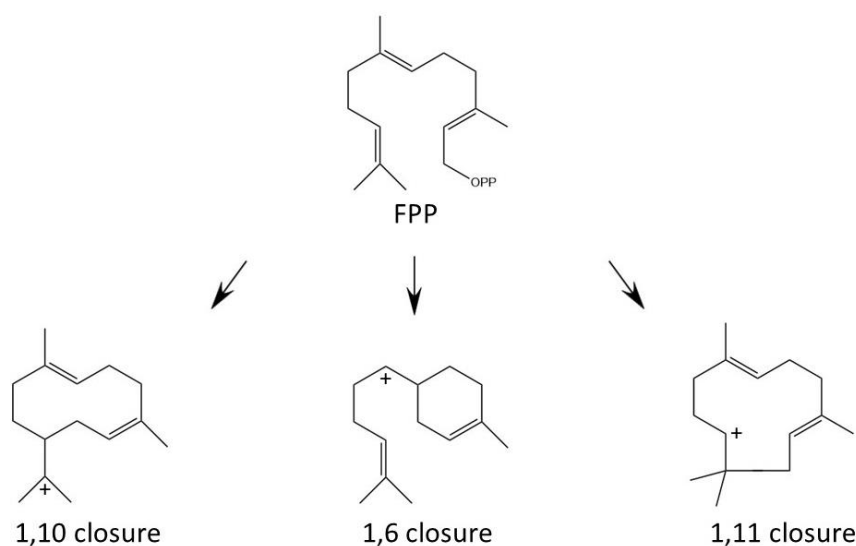


Figure 4-3: Phylogenetic determination of sesquiterpene synthases from basidiomycota. Unrooted neighbor-joining phylogram of 37 experimental characterized STS. Included are STS protein sequences from *Antrodia cinnamomea* (AcTPS) (Lin *et al.*, 2017), *Armillaria gallica* (ArmGa) (Engels *et al.*, 2011), *Boreostereum vibrans* (BvCS) (Zhou *et al.*, 2016), *Coprinopsis cinereus* (Cop) (Agger *et al.*, 2009), *Coniophora puteana* (Copu) (Mischko *et al.*, 2018), *Formitopsis pinicola* (Fompi) (Wawrzyn *et al.*, 2012), *Lignosus rhinoceros* (GME) (Yap *et al.*, 2017), *Stereum hirsutum* (Stehi) (Quin *et al.*, 2013), *Omphalotus olearius* (Omp) (Wawrzyn *et al.*, 2012), and *Cerrena unicolor* (Cun). Different cyclisation mechanisms were found for the clades. Clades 1 and 2 follow an initial 1,10-cyclization, clade 3 follows a 1,6-cyclization, and clade 4 follows a 1,11-cyclisation. Modified after (Mischko *et al.*, 2018).

This clustering leads to the presumption that the STS within one clade are catalyzing similar cyclization reactions. Comparing the main reaction products of respective cyclases within one clade, four different underlying cyclization mechanisms became obvious. Clade one contains the STS Cop4, Omp4, Omp5a, and Omp5b, all known for the transformation of FPP via nerolidyl diphosphate (NPP) 1,10 ring closure; a 1,11 H-shift; and a 1,6-ring closure, ending up with the bicyclic cadinyl cation. Cun3157 and Cun3158 are part of this clade.

An initial 1,10-cyclization of FPP forms an *E,E*-germacradienyl cation with cyclases of clade two. AcTPS5, Cop1, and Omp1 share this clade with Cun0716, Cun0759, Cun3574, Cun0773 and Cun 7050. In contrast, clade three follows a 1,6 cyclization, forming an intermediate bisabolyl cation. None of the active heterologous cyclases from Cun fit into this clade. STS grouped in clade four share a 1,11-cyclization mechanism. Six cyclases of this clade produce the tricyclic Δ^6 -protoilludene. In contrast, GME9210 produces 2H-2,4a-ethanonaphthalene and Cun5155 catalyzes the production of the tricyclic aromadendrene. In Scheme 4-1, the initial cyclization steps performed by STS from the four clades are shown. The three types of initial cyclization's all include the loss of diphosphate and result in a primary carbocation intermediate. From there, several reaction steps such as H-shifts and additional cyclization's take place to form the final sesquiterpene products.



Scheme 4-1: Initial cyclization reactions of STS. FPP: farnesyl diphosphate.

4.3.4 Temperature Optimum and Metal Ion Dependence of Cun3157 and Cun7050

In the past, large differences between single product and multi-product STS have been observed. Therefore, two cyclases, Cun3157 (multi-product) and the high-yielding Cun7050 (single product), were selected for further biochemical characterization to disclose the

differences. The same experimental conditions as for STS product identification were used to evaluate the impact of the incubation temperature on enzyme activity as a function of product formation. For visualization, the total peak area was plotted against the incubation temperature (Figure 4-4).

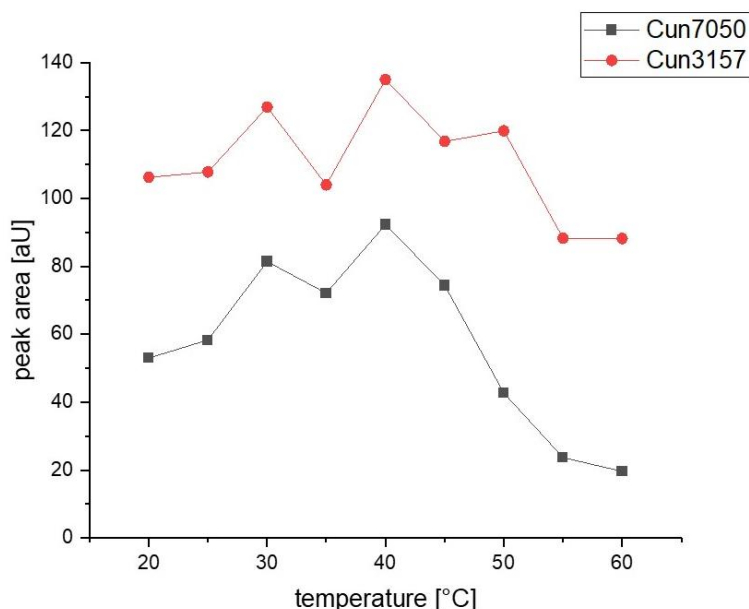


Figure 4-4: Temperature optimum of Cun3157 and Cun7050.

For Cun7050, solely producing δ -cadinol, the activity increased steadily until maximal activity was reached at 40 °C incubation temperature. At higher temperatures, the activity decreased, with 20% remaining activity at 60 °C. Compared to that, Cun3157 produced five different sesquiterpenes and was found to be less affected by the temperature. Activity fluctuated within a range of $\pm 10\%$ between 20 °C and 50 °C, with a maximum at 40 °C. By increasing the temperature up to 60°C the activity remained at approximately 65%. For the following experiments, incubations were carried out at 40 °C.

The effect of metal ions on the catalytic efficiency of terpene synthases is gaining more and more interest. It is well-known that STS require Mg^{2+} coordination in the active site for the cleavage of pyrophosphate and for initializing the reaction cascade. Reported high-resolution X-ray crystal structures show the mechanistic role of metal cofactors, for example, epi-isozizaene synthase from *Streptomyces coelicolor* (Ronnebaum *et al.*, 2020). Another study showed that Mn^{2+} is a suitable cofactor too (Vattekkatte *et al.*, 2018). Monoterpene synthases were shown to be promiscuous in terms of the required divalent cations (Croteau, 1987). Furthermore, it was shown that the presence of different metal ions altered the product ratio of the prenyl diphosphate synthase from *Phaedon cochleariae* significantly (Frick *et al.*,

2013). In the presence of Mg^{2+} , farnesyl diphosphate was the major product with a yield of 82%, whereas in the presence of Co^{2+} ions, geranyl diphosphate was the preferred product with a yield of 96%. Additionally, plant STS showed activity in the presence of different metal ions. However, STS from fungi have rarely been investigated for their acceptance of metal ions other than Mg^{2+} .

Cun3157 and Cun7050 were incubated with FPP in the presence of different metal ions. Activity was monitored as product compounds detected in the GC-MS chromatograms and plotted against the metal ions used (Figure 4-5).

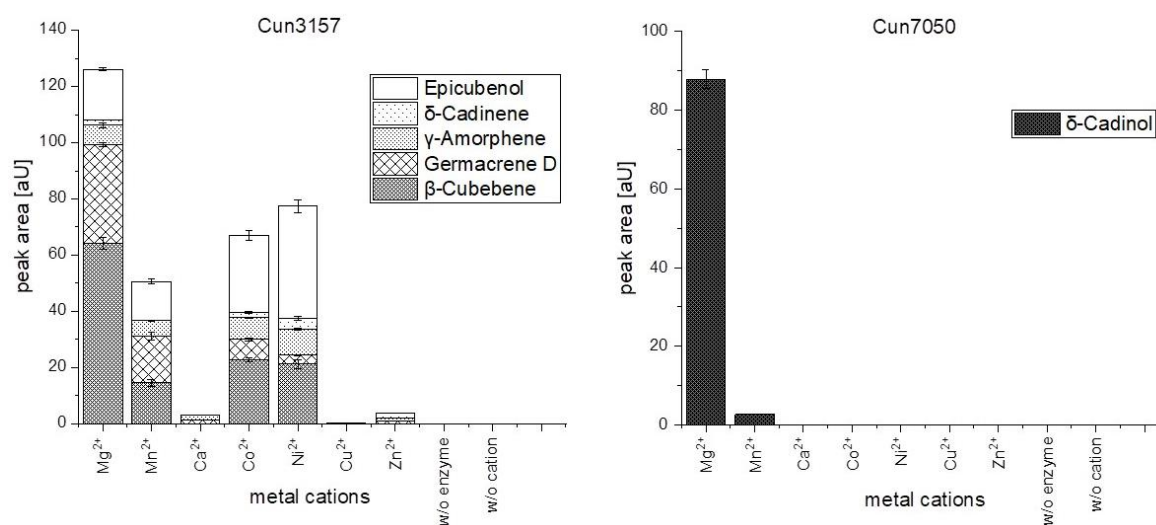


Figure 4-5: Metal cation dependency of Cun3157 and Cun7050. Peak areas are plotted against the used metal ions. Blank reactions without STS (w/o enzyme) and without any metal ion solution (w/o cation) were used as control reactions.

As expected, controls (without enzyme or metal ion) showed no product formation. For the multi-product STS, Cun3157, incubation in the presence of 20 mM Mn^{2+} , Co^{2+} , or Ni^{2+} , 40–60% relative activity was detected compared to 20 mM Mg^{2+} (100%). Supplementation with Ca^{2+} , Cu^{2+} , or Zn^{2+} depleted almost all activity. By using Mn^{2+} , a slight change from β -cubebene to germacrene D as the main product was observed. Supplementation with Co^{2+} and Ni^{2+} resulted in the formation of the sesquiterpene alcohol epicubanol as the main product. For Cun7050, chosen as a representative for a single-product STS because of its high catalytic efficiency, out of all divalent metal ions tested, only Mn^{2+} showed a relative activity of merely 3% compared to Mg^{2+} . For all other divalent cations, no activity was detected.

In summary, the multi-product cyclase Cun3157 showed a distinctly broader acceptance for metal ions. A study by Ronnebaum *et al.* proposed a correlation between the volume of the active cavity and product promiscuity of STS, which might also be an explanation for the

higher metal ion acceptance of Cun3157 (Ronnebaum *et al.*, 2020). Another unsolved question is whether the formation of sesquiterpene alcohols is part of enzyme catalysis, or a subsequent, merely chemical attack of water on a cationic intermediate. In the future, more X-ray data of crystallized fungal STS or AI based 3D-structure models (Alpha Fold 2) will allow for deeper insight into the correlation of the geometry of the active site and its surroundings, and the resulting reaction mechanisms and sesquiterpene products.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Chemicals, Reagents, and Strains

All chemicals were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) or Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany) if not otherwise indicated. Enzymes for molecular biology were purchased from Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Roth, Germany). The pUC57 vector and the pCOLDI vector were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The *E. coli* strains BL21 (DE3) and TOP10 were maintained in our laboratory. Oligonucleotides were synthesized using Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, Germany).

4.4.2 Gene Identification

To identify the presence of the STS sequences in the genome of *Cerrena unicolor*, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and the sequence of 33 known and functionally characterized STS from Basidiomycota were used. Based on this bioinformatic approach, 14 possible STS sequences could be identified.

4.4.3 Cloning of pCOLDI_STS Constructs

For the generation of cDNA encoding for the predicted STS, *C. unicolor* was cultivated and submerged in SNL medium (30 g/L D-glucose monohydrate, 3 g/L yeast extract, 4.5 g/L L-asparagine monohydrate, 0.5 g/L MgSO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 1 mL of trace element solution, pH 6.0 [0.08 g/L FeCl₃, 0.09 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.005 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.027 g/L MnSO₄, and 0.4 g/L Titriplex III). RNA was isolated using the plant and tissue RNA extracting kit from Analytic Jena (Jena, Germany). Afterwards, genomic DNA was digested with DNase I (Thermo Fisher, Waltham, MA, United States), and cDNA was produced using FastGene® Scriptase II (Nippon Genetics, Düren, Germany). The generated cDNA was used for amplification with Phusion High Fidelity Polymerase (Thermo Fisher). Specific primers were designed based on the BLAST search (see Section 3.2) with restriction sites for FastDigest *SacI* and *BamHI* (Thermo Fisher). Amplified open reading frames of the putative STS and vector pCOLDI (Thermo Fisher, Waltham, United States) were digested with FastDigest

restriction enzymes followed by ligation using T4 DNA ligase (Thermo Fisher). Chemocompetent *E. coli* TOP10 cells were transformed with the finished constructs by heat shock. After incubation at 37 °C, clones were selected for overnight incubation and plasmids were isolated with an innuPrep Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Jena, Germany). Sequencing was performed by Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, Germany). *E. coli* BL21 (DE3) were transformed with correct constructs for expression. Glycerol stocks of cells were stored at -80 °C.

4.4.4 Cultivation and Expression

The open reading frames of each STS were reamplified from the cloning vector by adding endonuclease restriction sites to the sequences. The amplified genes were ligated into the expression vector pCOLDI I and transformed into the expression host *E. coli* BL21 (DE3) using chemical competence. Transformed clones of each construct were cultivated on Luria/Miller media (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl), supplemented with the appropriate antibiotic (ampicillin, 100 µg/mL) at 37 °C and a shaking rate of 150 rpm. Precultures were growing in 5 mL cultures. Main cultures were inoculated to an OD₆₀₀ of 0.05 and grown until an OD₆₀₀ of 0.6–0.8 was reached. After induction with IPTG, the cultures were cold shocked and incubated at 17 °C, with a shaking rate of 150 rpm for another 20 h. Depletion of cells was performed at 5000 rpm at 4 °C for 30 min.

4.4.5 Enzyme Purification

The cells were re-suspended in binding buffer (50 mM MOPS, 500 mM NaCl, pH 7) and disrupted via sonification using an UP100 (Hielscher, Germany) at amplitude 50 and cycle 0.5 for 5 min. Produced STS were purified using metal affinity chromatography, desalted using 10 kDa MWCO columns (Vivaspin 500, Sartorius, Göttingen, Germany), and used for biocatalysis right after purification.

4.4.6 Biocatalysis

Transformation of farnesyl pyrophosphate was performed in reaction buffer (50 mM MOPS, 20 mM MgCl₂, and 25% glycerol) with a reaction volume of 1 mL containing 30 µM of FPP and incubation at room temperature for 15 min. Reactions were overlaid with 500 µL Hexane. The reaction was stopped by shaking. After centrifugation at maximum speed and 4 °C for 15 min, the hexane fraction was collected, dried with sodium sulfate, and analyzed via GC-MS for product identification.

4.4.7 Product Analysis

GC-MS analysis was performed on an Agilent GC-7890B coupled to a 5977A mass selective detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The following conditions were set: interface: 230 °C, ion source: 200 °C, quadrupole: 100 °C, electron impact ionization: 70 eV, and scan range m/z : 33-330 amu. For the identification of sesquiterpenes, two stationary phases of different polarities were installed: DB-WAX MS (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m film; Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, USA) and VF-5 MS (30 m; 0,25 mm i.d.; 0,25 μ m film; Agilent J&W GC Columns). Helium with a volumetric flow rate of 1 mL/min was used as a carrier gas. The following temperature programs were set: 40 °C for 3 min, 10 °C/min until 230 °C, 230 °C for 10 min (DB-WAX MS), and 40 °C for 3 min, 10 °C/min until 300 °C, 300 °C for 10 min. For both stationary phases, a MS hold time of 5 min was set. Structural determination of sesquiterpenes was carried out by comparison of reference spectra from the NIST Standard Reference Database. Alkanes from C₈ to C₃₀ (VF-5 MS) and C₈ to C₃₀ were used for the calculation of retention indices.

4.4.8 Phylogenetic Analysis

For the classification of the cyclases derived from *Cun*, the protein sequences were compared with the sequences of all functionally characterized basidiomycetic cyclases known so far via Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools>, accessed on 30 September 2021). The phylogenetic tree dataset was formerly edited using the tool iTOL (<https://www.itol.embl.de>, accessed on 9 October 2021). For the phylogenetic tree, the maximum likelihood method was used.

4.4.9 Semi-Native PAGE

Recombinant samples were prepared by adding a sample buffer 1:1 (v/v) (0.05 M Tris/HCl; pH 6.8, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Polyacrylamide gel electrophoresis was performed at 10 mA per gel, at 4 °C, using 12% gels.

4.4.10 Peptide Mass Fingerprinting

Purified protein bands of STS from *Cun* were excised from native acrylamide gel, dried, and digested with trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA). The resulting peptides were analyzed via a nano-HPLC (EASY-nLC II, Bruker, Bremen, Germany), coupled with a maXis quadrupole time of flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) using electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Peptides were analyzed *via* Mascot search matrix and protein scape software.

4.5 Author Contributions, Funding, Acknowledgments and Conflicts of Interest

Author Contributions

Conceptualization, N.P. and R.G.B.; methodology, N.P.; validation, N.P.; formal analysis, N.P.; investigation, N.P.; writing - original draft preparation, N.P.; writing - review and editing, R.G.B. and U.K.; visualization, N.P.; supervision, R.G.B., F.E. and U.K.; project and funding administration, R.G.B. and F.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The APC was funded by the Open Access fund of the Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Acknowledgments

We thank Carmen Theobald for skillful nLC-ESI-QTOF-MS/MS sequencing.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5 Vorwort zur Publikation „Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured *Cerrena unicolor*”

Der Grund für die Produktion von Terpenen und insbesondere Sesquiterpenen durch höhere Pilze liegt vermutlich in deren Interaktion mit Pflanzen oder auch Insekten (Kramer, 2012). Die Untersuchung von entsprechenden Effektoren und der Regulierung der Produktion steht noch am Anfang.

Im Rahmen einer Vorarbeit wurde *Cerrena unicolor* als Sesquiterpenproduzent identifiziert. Teil der nachfolgend dargestellten Publikation war die Identifizierung von Effekten auf die Sesquiterpenproduktion während der submersen Kultivierung. Um zu überprüfen, ob es für diese Effektoren eine möglichst ressourcenschonende und ökonomische Quelle gibt, stand die Verwendung von agro-industriellen Nebenströmen als Medienzusatz im Fokus. Um eine Erklärung für mögliche Steigerungen der Produktausbeuten durch die verwendeten Nebenströme zu finden, wurden diese auf ihre Zusammensetzung hin analysiert. Dabei lag der Fokus auf dem Protein- und Lipidgehalt, sowie auf der Fettsäurezusammensetzung. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass vor allem ein lipidreicher Nebenstrom, Rapspresskuchen, zu einer signifikanten Steigerung der Produktausbeute führte. Die Hypothese, dass ein β -oxidativer Abbau der Lipide zu einer Flutung des Acetatpools und dieser zu einer vermehrten Sesquiterpensynthese führt, konnte durch Mediensupplementierung mit ^{13}C -markiertem Acetat nachdrücklich untermauert werden.

An der Arbeit beteiligt waren Frau Dr. Ersoy, Herr Prof. Berger und Herr Dr. Krings. Herr Berger stellte Thema und die nötigen Mittel zur Verfügung. Franziska Ersoy und Ulrich Krings übernahmen die wissenschaftliche Betreuung. Ulrich Krings unterstützte zudem bei der Datenauswertung und -interpretation.




Die nachfolgende Arbeit wurde in der *peer-reviewed* Zeitschrift *Foods* (MDPI) als Teil des *Special Issue „Innovative Applications of Mass Spectrometry to Valorize Food and Agro-Food By-Products“* akzeptiert und veröffentlicht (<https://doi.org/10.3390/foods12030668>).

6 Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured *Cerrena unicolor*



Article

Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured *Cerrena unicolor*

Nils Püth *, Franziska Ersoy , Ralf G. Berger *  and Ulrich Krings 

Institute of Food Chemistry, Leibniz University Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany
* Correspondence: nils.pueth@lci.uni-hannover.de (N.P.); rg.berger@lci.uni-hannover.de (R.G.B.)

6.1 Abstract

The quality and harvest of essential oils depend on a large number of factors, most of which are hard to control in an open-field environment. Therefore, Basidiomycota have gained attention as a source for biotechnologically produced terpenoids. The basidiomycete *Cerrena unicolor* (Cun) was cultivated in submerged culture, and the production of sesquiterpenoids was analyzed *via* stir bar sorptive extraction (SBSE), followed by thermo-desorption gas chromatography coupled with mass spectrometry (TDS-GC-MS). Identification of aroma-active sesquiterpenoids was supported by GC, coupled with an olfactory detection port (ODP). Following the ideal of a circular bioeconomy, Cun was submerged (up-scalable) cultivated, and supplemented with a variety of food industrial side-streams. The effects of the different supplementations and of pure fatty acids were evaluated by liquid extraction and analysis of the terpenoids *via* GC-MS. As sesquiterpenoid production was enhanced by the most by lipid-rich side-streams, a cultivation with ¹³C-labeled acetate was conducted. Data confirmed that lipid-rich side-streams enhanced the sesquiterpene production through an increased acetyl-CoA pool.

Keywords: Basidiomycota; *Cerrena unicolor*; medium supplementation; rapeseed press cake; side-streams; sesquiterpene synthesis; bioeconomy

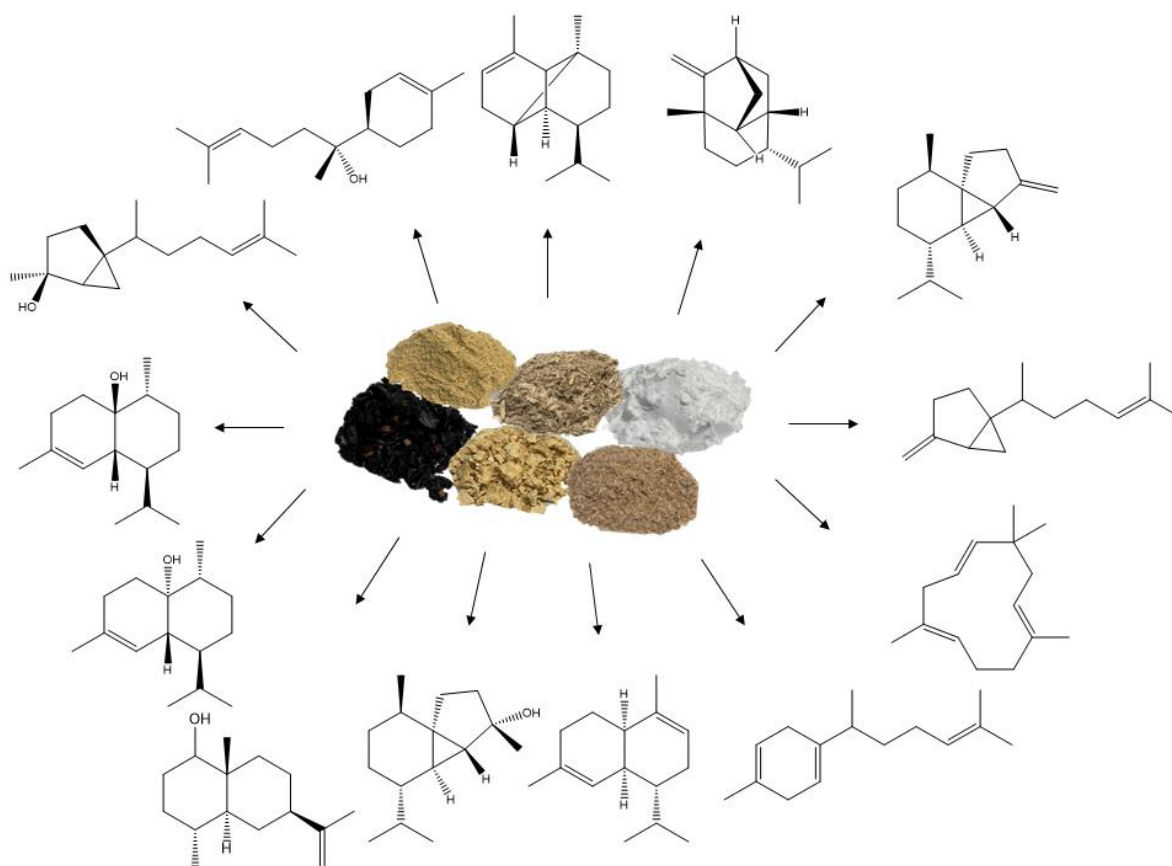


Figure 6-1: Graphical abstract.

6.2 Introduction

Fungi are one of the most versatile producers of secondary metabolites, including beneficial (antibiotics, pharmaceuticals, and perfumery) and harmful (toxins and carcinogens). These are derived from four main chemical classes: polyketides, non-ribosomal peptides, indole alkaloids, and terpenic compounds (Keller *et al.*, 2005). Basidiomycota produce a large number of different sesquiterpenes, whose biological functions encompass physiological effects, defense against other organisms (especially parasites), attraction of pollinators, and phytohormone activity (de Bruyne & Baker, 2008; Jischa *et al.*, 2019; Kramer, 2012; Wu & Kawagishi, 2020).

Fungal volatile terpenes, formerly thought to occur in plants only, were first reported almost 60 years ago (Sprecher, 1963). Since then, especially higher fungi, such as basidiomycetes (mushrooms), have been identified as a good source of aroma compounds. Their volatile profile consists of aliphatics, aromatics, and terpenoids, whose complexity can be comparable to the complexity of the plant volatilome (Abraham & Berger, 1994). Expressive examples for aroma-active sesquiterpenoids are the oxo-functionalized, grapefruit-smelling (+)-nootkatone and the fruity smelling α -ylangene (Grosse *et al.*, 2019; Leonhardt & Berger, 2015). The sustainable biotechnological production of sesquiterpenoids is not only of interest for the production of aromas but also for pharmaceuticals (Ohloff, 2012), due to their anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-oxidative, and cytotoxic effects (Chang *et al.*, 2020; Jang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2021; Tamemoto *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010).

Cerrena unicolor (Cun) is a white-rot basidiomycete and a known producer of several bioactive compounds (Mizerska-Dudka *et al.*, 2015; Ziaja-Sołtys *et al.*, 2022). The fungus is also well-known as a source of miscellaneous enzymes, such as laccases, xylanases, cellulases, oxidases, and, as was recently reported, terpene cyclases (Belova *et al.*, 2014; Elisashvili *et al.*, 2002; Kachlishvili *et al.*, 2021; Michniewicz *et al.*, 2006; Püth, 2021). In 2018, Cun was discovered to be a producer of volatile aroma-active compounds (Strauss, 2018). Its fruity, flowery scent with woody notes aroused interest for further investigations. Sesquiterpenoids were identified as aroma-active principles built by this fungus.

Fungal sesquiterpene biosynthesis starts with acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) to form the two C₅-terpene building blocks, isopentyl and dimethylallyl pyrophosphate (IPP and DMAPP), along the well-known mevalonate pathway. Three building blocks result in the characteristic farnesyl backbone of sesquiterpenes, consisting of 15 carbon atoms. The linear

farnesyl pyrophosphate (FPP) serves as the substrate for sesquiterpene synthases, which synthesize specific cyclic sesquiterpenes (Christianson, 2017). After the metal ion-induced release of the pyrophosphate group, the resulting highly reactive allylic cation is stabilized in the active center of a respective cyclase. A subsequent cascade of rearrangements, hydride shifts, and formation of C–C bonds (regiospecific cyclisation) furnishes sesquiterpene and later, the oxidized sesquiterpenoid products (Miller & Allemann, 2012). A recent study showed that the synthesis of sesquiterpenes was associated with the sporulation process in fruiting bodies (Orban *et al.*, 2020). However, *Cun* also produced sesquiterpenes in submerged cultures, thus enabling the set-up of an experimental model system for further scaling-up.

Several chemical and physical factors may affect the production of sesquiterpenoids in submerged, cultured basidiomycetes; however, scarce information was found in literature (Ezediokpu *et al.*, 2022). The use and valorization of food and agro-industrial side-streams as cultivation substrates may render fungal bioprocesses more sustainable (Bertacchi *et al.*, 2021; Di Lena *et al.*, 2020; Moreno-González & Ottens, 2021), as these fungi thrive well on such complex substrates. In this work, a variety of side-streams of different chemical compositions were used as supplements for the submerged cultivation of *Cun*. Their impact on culture growth and aroma-active terpene formation was evaluated to identify the preferred side-stream. Protein-, lipid-, and carbohydrate-rich side-streams were selected, and the mevalonate pathway towards sesquiterpene synthesis was eventually confirmed using ^{13}C -labeled acetate.

6.3 Materials and Methods

6.3.1 Chemicals

All chemicals, solvents, and medium components were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), VWR (Radnor, PA, USA), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), and Merck KGaA (Darmstadt, Germany) unless mentioned otherwise. All solvents were purified by rectification prior to use. Side-streams were obtained from: rapeseed press cake from Teutoburger Ölmühle (Ibbenbüren, Germany), maple wood chips from Axtschlag GmbH (Heidesee, Germany), wheat bran from DM (Karlsruhe, Germany), grape pomace from Staatsweingut Neustadt (Neustadt a.d.W., Germany), and lemon peel from H. Zorn (JLU Gießen, Germany). Rapeseed oil was purchased from Rapso (Aschach, Austria) and coconut butter from Rewe (Köln, Germany).

6.3.2 Cultivation Conditions

All flasks and media were autoclaved prior to use. For submerged cultivation, standard nutrient liquid (SNL) at pH 6.0 (30 g/L D-glucose monohydrate, 4.5 g/L L-asparagine monohydrate, 3 g/L yeast extract, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 5 $\mu\text{g/L}$ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 80 $\mu\text{g/L}$ $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 90 $\mu\text{g/mL}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ EDTA) was used.

Pre-cultures of 250 mL were inoculated with a 1 cm^2 grown agar plate and homogenized with a disperser (Micra D-9, Micra GmbH, Heitersheim). Main cultures of 250 mL were inoculated with 10% (v/v) pre-culture. Cultivations were performed in triplicates. As side-streams, wheat bran, potato starch, maple wood chips, rapeseed press cake, grape pomace, and lemon peel (2% w/v) were added to the main culture upon inoculation. As lipidic supplements, rapeseed oil, linoleic acid, oleic acid, and coconut butter (2% v/v) were used.

6.3.3 Extraction of Volatiles

For endpoint product analysis, volatiles were extracted from 250 mL of culture supernatant with an azeotropic mixture of *n*-pentane and diethyl ether (PE; 1:1.12 v/v). Samples were dried with sodium sulfate and concentrated *via* Vigreux rectification (DURAN, Wertheim, Germany) to a final volume of approximately 1 mL. Analysis was performed *via* thermodesorption–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry (TDS-GC-MS/O), as described below (cf. 6.3.5) (Schimanski, 2013). Semi-quantification was performed using an internal standard (methyl dodecanoate), with a final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$.

For time-dependent product analysis, culture supernatant was extracted *via* sequential stir bar sorptive extraction (SBSE) using polydimethylsiloxane-coated Twisters (10 mm \times 0.5 mm; Gerstel, Mülheim, Germany) (Sampedro *et al.*, 2009). Extraction was performed with 5 mL of culture supernatant for one hour under vigorous stirring at 400 rpm. The Twister was rinsed with deionized water, dried with a lint-free cloth, and stored at 4 °C. A second extraction was performed by adding a new Twister and NaCl with a final concentration of 30% (m/v) to the supernatant. Both Twisters were analyzed together *via* gas chromatography.

6.3.4 GOPOD-Assay, Determination of D-Glucose Concentration

D-Glucose was analyzed using a glucose oxidase/oxidase assay (GOPOD) by Megazyme (Bray, Ireland) according to the manufacturer's protocol. External calibration was performed with 0.05–1.0 mg/mL D-Glucose. Determinations were performed in duplicates.

6.3.5 GC-MS Analysis

The system consisted of an Agilent 6890N GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and an Agilent 5975B MS (interface: 300 °C, ion source: 200 °C, quadrupole: 100 °C, electron impact ionization: 70 eV, scan range: 33–300 m/z). Stationary-phase DB-Wax (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) and DB-5ms (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) from Agilent Technologies were used. Injection was performed via a thermal desorption (TDS-3) and cold injection system (CIS-4) with an autosampler TDSA-2 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Helium with a flow rate of 1.3 mL/min was used as the mobile phase. The temperature program was 10 min of hold-time at 40 °C, 5 °C/min until 250 °C, and 10 min hold-time at 250 °C. Compound identification was performed *via* retention index (polar/non-polar), comparison of the MS spectra (NIST, Wiley spectral database), and when possible, *via* authentic standard and odor impressions.

6.3.6 Lipid Content Determination

A defined amount of side-stream was applied to a Soxhlet shell and extracted with 200 mL of pentane/diethyl ether in a B-811 extraction system (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). After 25 cycles, the solvent was evaporated and the beaker weighed to constant mass. Extractions were performed in duplicates.

6.3.7 Fatty Acids Profiling

Approximately 100 mg of oil from the lipid content determination was solved in 1 mL of hexane. Sodium methylate was added to a final concentration of 1%, and the mixture was incubated at 60 °C and 200 rpm for 30 min. The organic phase was dried with sodium sulphate and diluted tenfold with hexane. The mixture was analyzed *via* TDS-GC-MS, as reported above (*cf.* 6.3.5). Determinations were performed in duplicates.

6.3.8 Protein Content Determination

The determination of the protein content of side-streams was performed with a K-424 digestion unit and a K-350 distillation unit (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) according to the manual. Determinations were performed in duplicates.

6.4 Results and Discussion

In preliminary experiments, *Cerrena unicolor* (Cun) was identified as a potent producer of sesquiterpenes and other aroma compounds (Strauss, 2018). Submerged cultures of the fungus provided a rich, fruity–flowery volatilome, including various sesquiterpenes and sesquiterpenoids (Table 6-1). Nine days after inoculation in SNL medium, D-glucose was fully metabolized, and an increased formation of volatiles started.

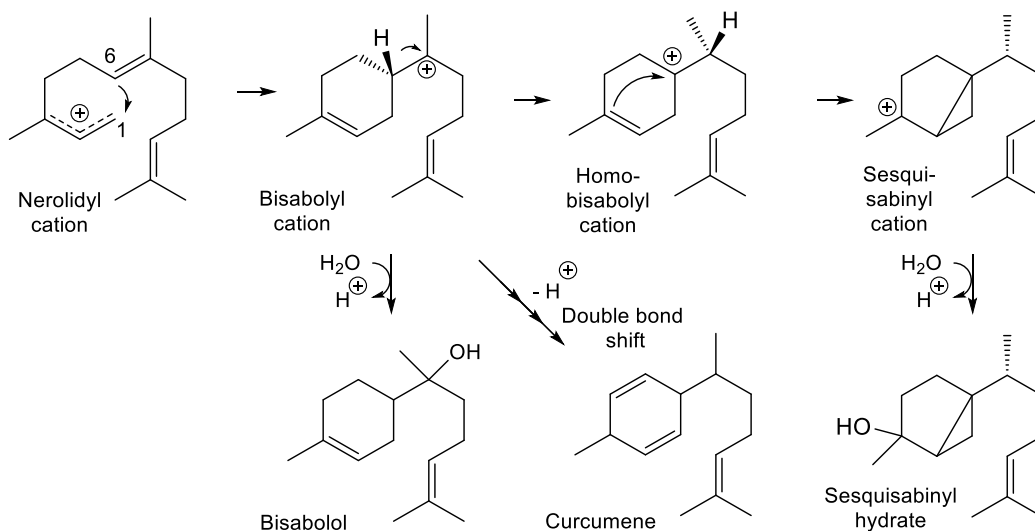
Table 6-1: Volatile sesquiterpenoids produced by *Cerrena unicolor*.

Clade	Substance	RI Polar ^{a(b)}	RI Non-Polar ^{a(b)}	Identification
II	α -Copaene	1462 (1502)	1349 (1375)	A, B, C, E
I	Isosativene	1492	1390 (1417)	B, C
I	β -Cubebene	1544 (1540)	1390 (1388)	A, B, C, E
III	Sesquisabinene	1663 (1648)	1454 (1465)	A, B, C, E
IV	Humulene	1693 (1670)	1460 (1455)	A, B, C, E
II	α -Muurolene	1729 (1727)	1501 (1499)	A, B, C, E
III	β -Curcumene	1743 (1734)	1510 (1516)	A, B, C
II	Cubebol	1956 (1951)	1521 (1531)	A, B, C, E
II	$5\beta,7\beta$ H, 10α -Eudesm-11-en-1 α -ol	2001	1544	C
II	Cubenol	2074 (2063)	1641 (1642)	A, B, C, E
II	Epicubenol	2083 (2072)	1635 (1625)	A, B, C
III	Sesquisabinene hydrate	2114 (2092)	1596 (1581)	A, B, C
III	α -Bisabolol	2223 (2232)	1694 (1697)	A, B, C, D, E

^a Retention index; ^b literature retention index (NIST data base: <https://webbook.nist.gov/chemistry> (accessed on 21th October 2022)). A/B identified *via* retention index (polar/non-polar column); C identified *via* comparison of MS spectra (NIST, Wiley spectral database); D identified *via* authentic standard; E identified *via* odor impressions obtained by GC-O.

Volatiles extracted from the culture broth were tentatively identified according to their linear retention indices on two stationary phases of different polarity, electron impact (EI) mass spectra, and, if available, using authentic standards. Extracted ion chromatograms (EICs) of m/z 204, 218, 220, and 222 were used for selective detection and semi-quantitation of sesquiterpenes and respective terpenoids (alcohols, ketones, and aldehydes). In total, 13 cyclic sesquiterpene hydrocarbons, alcohols, and aldehydes were identified (Table 6-1). Based on the underlying cyclization mechanisms, sesquiterpene synthases can be grouped into four clades (Mischko *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2022). Formation of α -muurolene, α -copaene, β -cubebene, and epicubenol can be assigned to cyclases of clade I and II, which form sesquiterpenes along a 1,10-ring closure of an intermediate trans- or *cis*-farnesyl cation, respectively. However, β -curcumene and α -bisabolol are representative products of clade III cyclases that catalyze the 1,6-cyclization of farnesyl cations. Humulene is the only product associated with clade IV cyclases detected in the culture broth of Cun under the chosen conditions.

Apart from the common 1,10 closure of (*E,E*)-farnesyl diphosphate, which resulted in the formation of cadinane and eudesmane skeletons, a 1,6 closure of nerolidyl pyrophosphate is supposed to yield the rather rare sesquisabinene and its hydrate. Their biogenesis is rationalized by a sequence starting with a nerolidyl cation, which, in few steps, is converted first to bisabolol, then to curcumene and sesquisabinene hydrate (Scheme 6-1), all found in the supernatant of *Cun* cultures (Table 6-1).



Scheme 6-1: Proposed biogenetic relationship of bisabolol, curcumene, and sesquisabinene hydrate in the submerged, cultured of *Cerrena unicolor* (stereochemistry incomplete to facilitate reading).

This hypothesis is supported by the co-occurrence of bisabolene and sesquisabinene skeletons, for example, in Indian sandalwood oil (Srivastava *et al.*, 2015), indicating that the fungus and the taxonomically distant tree may follow similar pathways.

6.4.1 Formation Kinetics in Standard Nutrient Liquid Medium (SNL)

Product formation kinetics were monitored for 21 days in main cultures of *Cun* cultivated in 250 mL of SNL medium using sequential stir bar sorptive extraction. A sample of 7 mL was taken every two to three days and volatiles, pH, and D-glucose concentrations were determined (Figure 6-2).

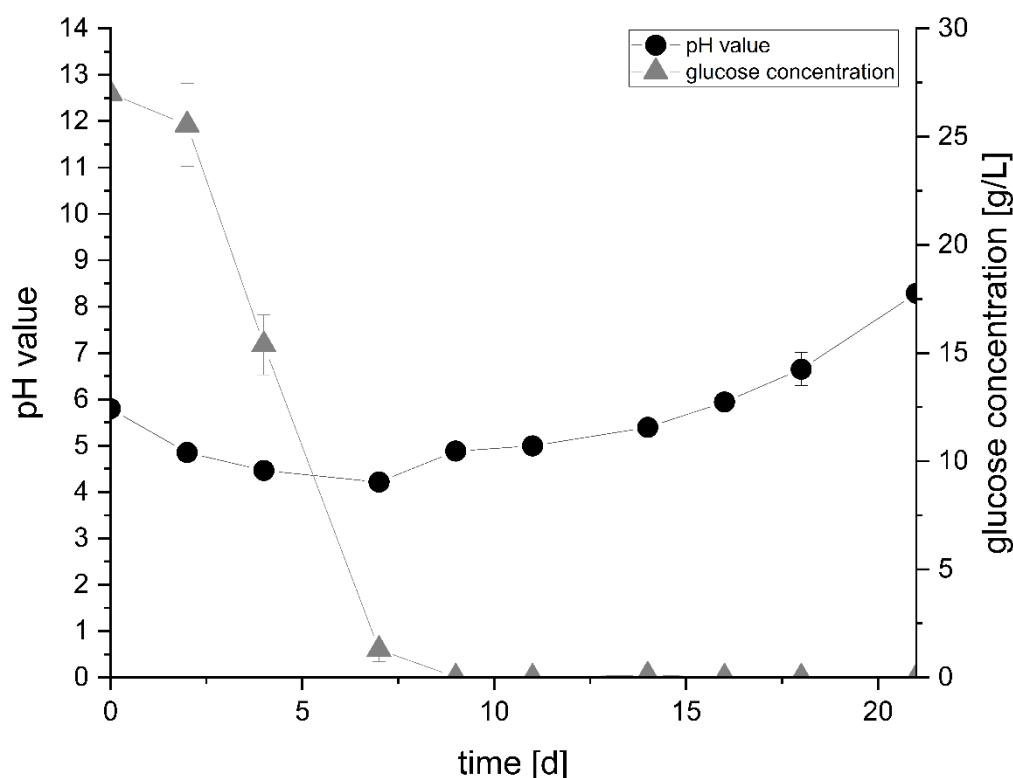


Figure 6-2: D-Glucose concentration and pH during the cultivation of *Cerrena unicolor* in SNL medium at 150 rpm and 24 °C for 21 days.

The D-glucose concentration and the pH value over the course of cultivation are shown in Figure 6-2. Without a distinct lag phase, the D-glucose concentration in the medium declined rapidly, and D-glucose was completely exhausted within 9 days of cultivation. The pH value started in the slightly acidic range at pH 6 and decreased to pH 4.5 until day 7. With the depletion of the carbon source after 9 days, the pH value increased and reached pH 8.3 after 21 days.

The increasing pH value might indicate the switch from primary to secondary metabolism (Keller *et al.*, 2005). In literature, a pH shift is often associated with the start of secondary metabolism (Calvo *et al.*, 2002). However, in this study, a clear distinction between primary and secondary metabolism could not be made, as sesquiterpene compounds were isolated from the cultivation medium right after the start (Figure 6-3). All of them were present from the beginning but in low concentrations (<2.5 mg/L), most likely due to a carry-over from the liquid pre-cultures used for inoculation. Upon D-glucose depletion after day 7, a moderate increase was observed for all products until culture day 11. Sesquiterpenoids are known to be produced during secondary metabolism (Chen *et al.*, 2022; Ichinose *et al.*, 2022; Schüffler, 2018). However, after day 11, the product concentration decreased until day 16 and slightly increased again until day 21. Apparently, a slightly unstable, dynamic steady state of terpene

formation and further processing was established in the stationary phase. Therefore, all subsequent cultivations to evaluate the impact of different food and agro-industrial side-streams on fungal growth and sesquiterpene formation were carried out for a period of eleven days.

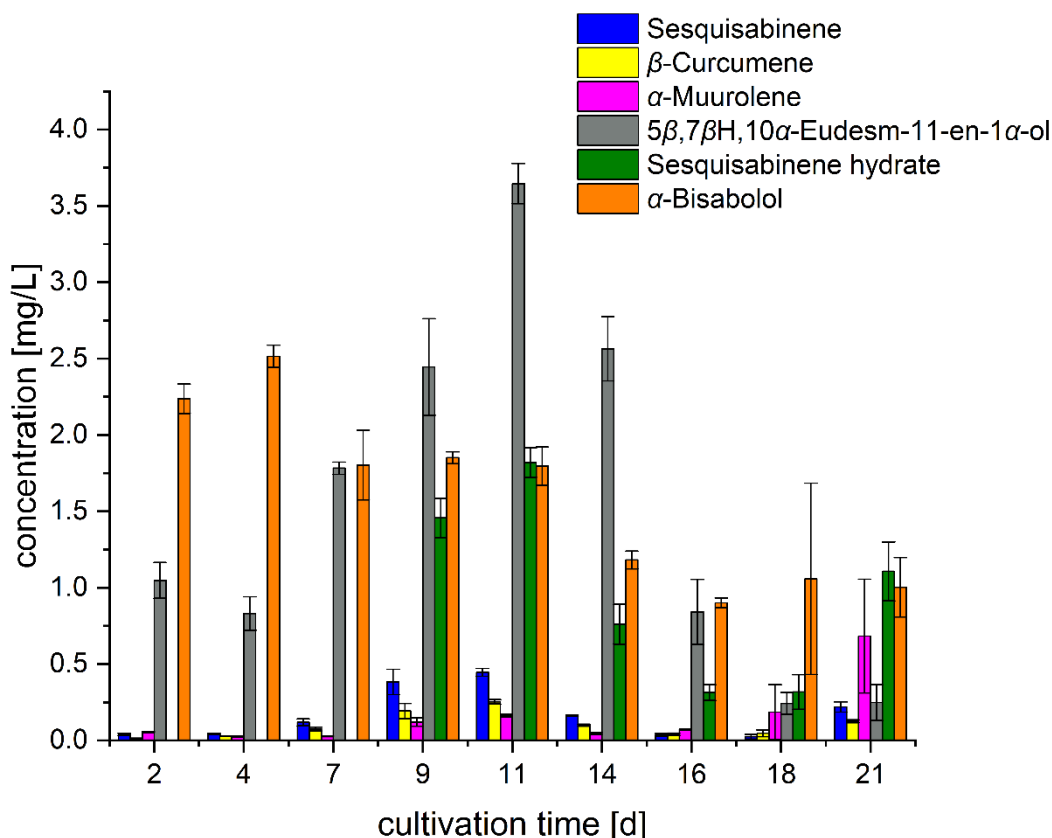


Figure 6-3: Sesquiterpenoid production over 21 days during the submerged cultivation of *Cerrena unicolor*.

6.4.2 Impact of Food and Agro-Industrial Side-Streams

Six side-streams of the food industry were selected as supplements: rapeseed press cake (rapeseed oil production), maple wood (maple syrup production), wheat bran (wheat flour production), potato starch (French fry production), grape pomace (winemaking), and lemon peel (lemon juice production). They were added to the liquid culture medium to induce and increase the biosynthesis of terpenes. Rapeseed press cake, the residue after oil extraction, is a known source of proteins for the feed of dairy animals (Östbring *et al.*, 2019). It also contains residual 5–18% lipids (Fetzer, 2018). Wheat bran and potato starch are both high in carbohydrates and are thought to enhance fungal growth. In 2016, tartrate was used as the medium component for fungal growth (Lee *et al.*, 2016). Grape pomace is also rich in oils and phenolic compounds (Bordiga *et al.*, 2019) and can be used as a nitrogen source (Devesa-

Rey, 2011). Citrus peel is rich in flavonoids, D-limonene, and sugars and was already successfully used as a medium supplement (Kachlishvili *et al.*, 2021; Virtanen *et al.*, 2017).

For all cultures of *Cun* supplemented with different side-streams, two general statements can be made. First, the course of D-glucose consumption was not noticeably affected (data not shown), and second, no additional sesquiterpenoid products other than those shown in Table 6-1 were detected. Nonetheless, the side-streams showed a distinct impact on both the overall sesquiterpenoid yields and their quantitative formation profiles (Figure 6-4).

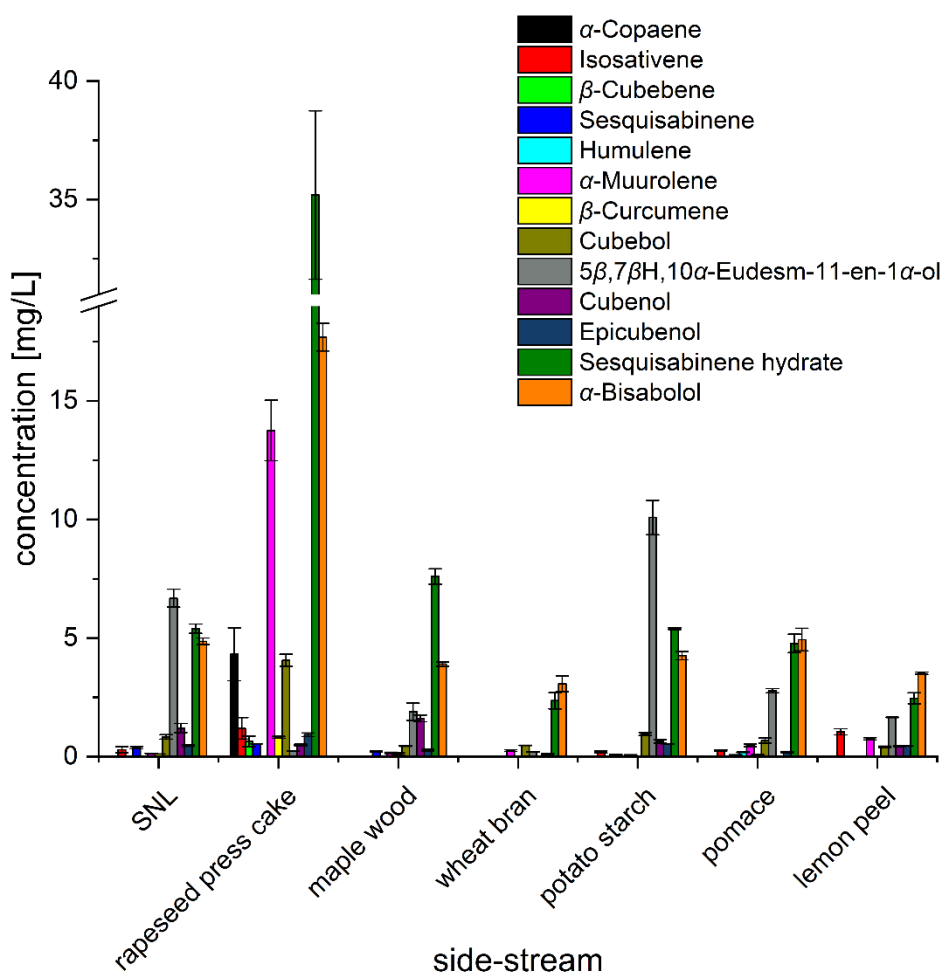


Figure 6-4: Sesquiterpenoid production during the submerged cultivation of *Cerrena unicolor* for eleven days, supplemented with side-streams from the food and agro-industry.

Compared to the control (SNL without side-stream), only the addition of rapeseed press cake led to a significantly increased formation of most of the sesquiterpenoids after eleven days of cultivation. α -Copaene (4.3 mg/L, not present in control on day eleven), cubebol (4.1 mg/L, 4-fold), sesquisabinene hydrate (35.2 mg/L, 7-fold), α -bisabolol (17.7 mg/L, 3-fold), and α -muurolene (13.8 mg/L, 100-fold) formation, in particular, were positively affected by the addition of rapeseed press cake. All other terpenoid products experienced only minor

changes, compared to the control. The same was true for SNL medium supplemented with the five other side-streams (Figure 6-4). The main difference in the composition of the side-streams was the high protein (33.0%) and lipid (15.7%) contents of rapeseed press cake in comparison to the other side-streams (Figure 6-5). A high protein content improved the nitrogen supply of the growing culture and was supposed to increase culture growth and formation of amino acid-derived metabolites, but no changes in fungal growth or immediate metabolites (data not shown) were observed. The following cultivations were thus designed to determine the specific impact of rapeseed press cake on the formation of sesquiterpenoids.

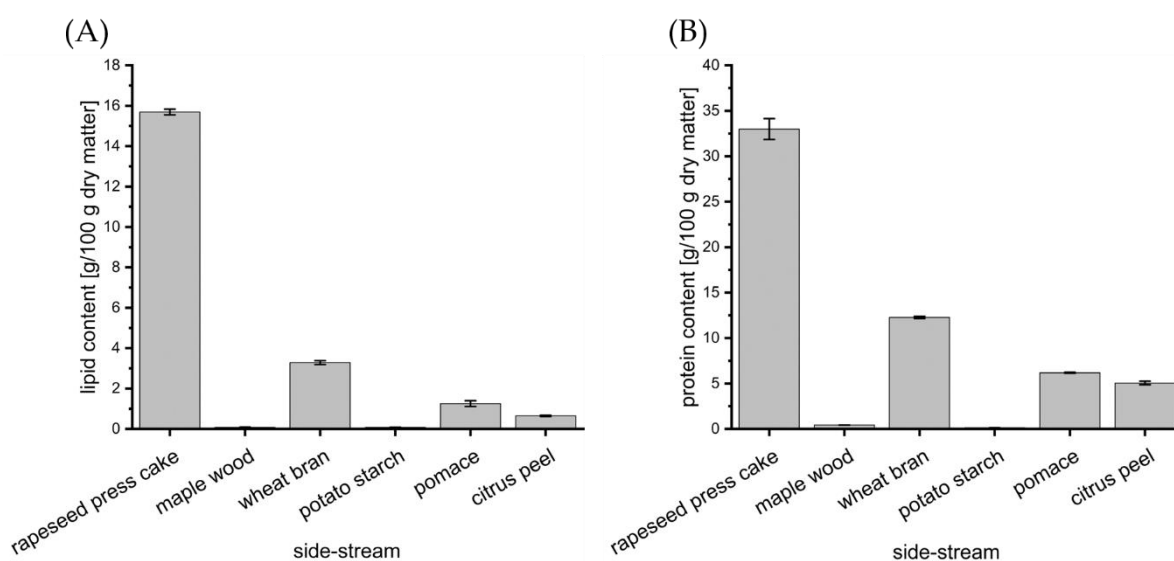


Figure 6-5: Lipid (A) and protein content (B) of side-streams used as medium supplements for the cultivation of *Cerrena unicolor*.

6.4.3 Impact of Rapeseed Press Cake and Lipidic Supplements

The focus was placed on the lipid content and composition. Two possible explanations for the impact of the lipid portion were considered. On one hand, lipid hydrolysis with subsequent β -oxidation of released fatty acids may fill the intracellular acetate pool, which might result in an increased terpene biosynthesis. On the other hand, a lipid phase in the aqueous culture medium may extract lipophilic substances (*in situ* recovery). This may protect terpenoids, once formed, against catabolism, shift biochemical equilibria towards product formation, and enable high extracellular product accumulation, even above the water solubility of the respective terpenoids.

To characterize the lipid phase of rapeseed press cake, its fatty acid composition was determined. The fatty acid profile is shown in Figure 6-8. In accordance with literature, rapeseed oil was dominated by unsaturated C₁₈ fatty acids, which made up more than 80%

(oleic 55%, linoleic 20%, and linolenic acid 8%) (Kaczmarek, 2016; Lewinska, 2015). Palmitic acid with 13% was the only saturated fatty acid with a higher share in the oil.

To shed a light on the impact of rapeseed oil, single free fatty acids, as well as lipids with a high degree of unsaturated or saturated fatty acids, were chosen as media supplements. Cultivations with *Cun* in SNL medium were supplemented with (2% v/v) rapeseed oil, oleic acid, linoleic acid, or coconut butter. The latter is known as a lauric oil rich in lauric, myristic, and palmitic acid and served as counterpart to the highly unsaturated rapeseed oil (Figure 6-8).

As shown in Figure 6-6, huge differences in terpenoid production were observed between the control (SNL without supplementation) and coconut butter on the one hand and unsaturated C₁₈-fatty acids and rapeseed oil on the other hand. After supplementation with coconut butter, the diversity of the identified terpenoids was strongly reduced. α -muurolene, sesquisabinene hydrate, and α -bisabolol were the only terpenoids found after eleven days of incubation. Their concentrations were comparable to the respective one in the sample without supplement. Therefore, the meaningful impact of this lipid as the *in situ* extraction phase was ruled out.

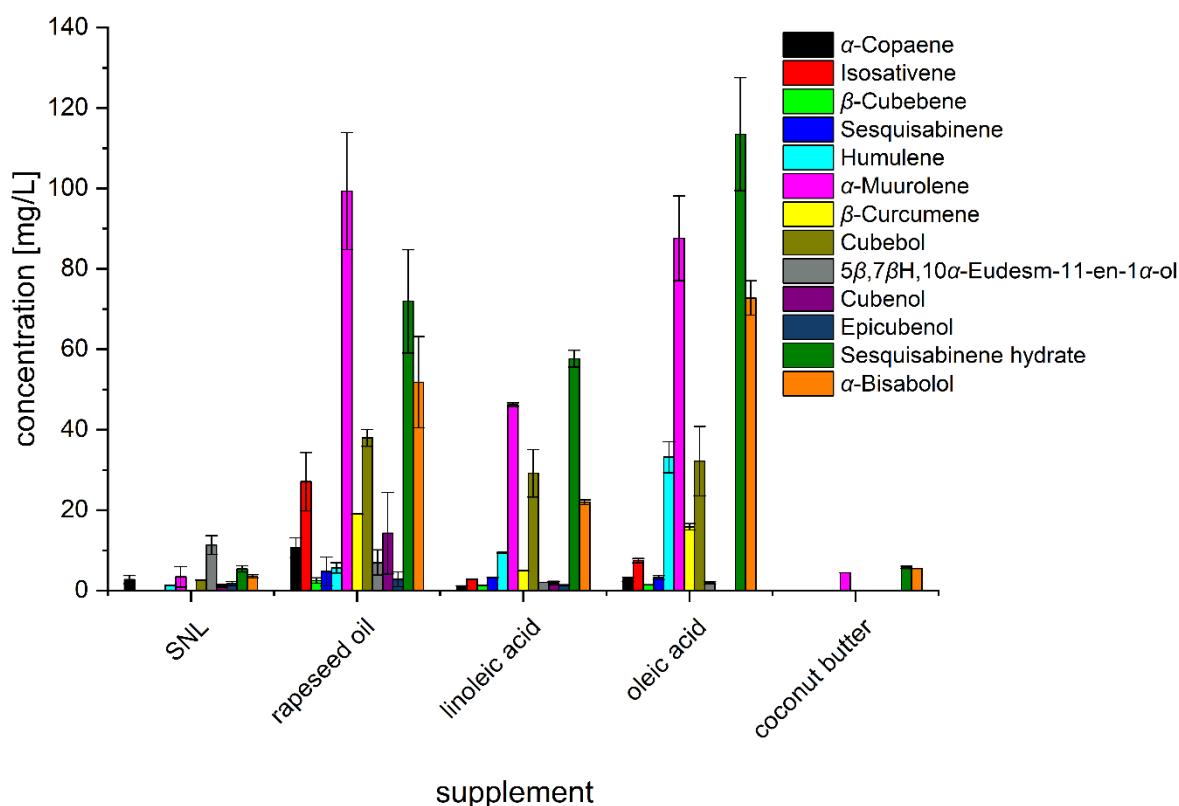


Figure 6-6: Sesquiterpenoid production of *Cerrena unicolor* supplemented with 2% lipidic additives after eleven days of cultivation. Products were analyzed using TDS-GC-MS after the liquid-liquid extraction of culture supernatant.

A completely different behaviour was observed for the supplementation with oleic acid, linoleic acid, and rapeseed oil. For all three supplements, significantly higher concentrations of sesquiterpenes were produced, compared to both the control (SNL) and the rapeseed press cake (Figure 6-4). The highest product yields were found for α -muurolene and sesquisabinene hydrate in the cases of oleic acid and rapeseed oil supplementation. The yields of both sesquiterpenes were reciprocal, so a purely additive effect of the two fatty acids can be ruled out. The release of fatty acids from the respective triacylglycerols and additional fatty acids, which are less abundant, may have influenced the quantity of particular sesquiterpenes. As rapeseed oil consists of more than 50% oleic acid, the mono unsaturated fatty acid seemed to have the greatest impact on terpene formation. However, as a molecule with an unbranched chain of carbon atoms, neither oleic acid itself nor larger degradation products thereof can serve as direct precursors for sesquiterpene formation.

An active or passive uptake of oleic acid into growing fungal cells and subsequent β -oxidation would result in an excess of acetyl-CoA, which may not be exploited completely in the citric acid cycle, especially in the presence of a concurrently active glycolysis. In such situations of excesses of primary metabolites, a switch to secondary metabolism may occur independently from the actual growth phase. Wood-decomposing basidiomycetes are especially known for their highly adaptable metabolism [49,50]. *Cun* was found in this study to be a producer of cyclic sesquiterpenes (Table 6-1, Figure 6-3), which is indicative of an active mevalonate pathway and the expression of several sesquiterpene cyclases (Püth, 2021).

6.4.4 Labeling Experiment

Presuming that a surplus of acetate would trigger the mevalonate pathway, a direct supplementation with ^{13}C -labeled acetate should result in an at least partial incorporation into the sesquiterpene/-terpenoid products.

After feeding 12 mM $^{13}\text{CH}_3\text{COO}^-$ on day one, the products were recovered on culture day eleven. The same product spectrum and a terpenoid yield slightly higher than in the control (without acetate supplementation) were obtained. Furthermore, an altered isotopic pattern of the respective molecular ions at m/z 204 (sesquiterpenes), m/z 220 (sesquiterpene alcohols), and m/z 222 (sesquiterpene hydrates) was detected for all of the products. An excess of acetate increased the formation of sesquiterpenes in liquid cultures of *Cun* (data not shown).

Figure 6-7 shows exemplarily the electron impact (EI) mass spectrum of the superimposed region around the M-H₂O ion (the molecular ion at m/z 222 was not present) of unlabeled

(control) and labeled α -bisabolol. The control showed the natural ^{13}C -isotopic peak at m/z 205, with 18.3% (measured, 16.5% calculated) intensity of the M-H₂O ion at m/z 204. Another peak at m/z 207 corresponded to the fragment ion after the splitting of a methyl group ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$) from the molecular radical cation. The isotopic pattern obtained for α -bisabolol after feeding $^{13}\text{CH}_3\text{COO}^-$ was markedly different. There was a number of additional isotopic peaks after the $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ion from m/z 205 to m/z 211, ordered in a falling ladder of intensity. This can be explained by the incorporation of up to six ^{13}C -labeled acetates (one ^{13}C per acetate). Further expected isotopic peaks were missing, due to their low abundance, because only a distinguished share (roughly 30% (calculated with the percental abundance of m/z 205 and 206, Table 6-3)) of labeled acetate besides the ubiquitous unlabeled acetate built up the α -bisabolol molecule. The regular isotopic distribution of multiple-labeled α -bisabolol at m/z 204 was altered from m/z 207 because of the contribution of the $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ -fragment ion, which made further comparisons of measured and calculated isotopic patterns complicated. Therefore, the incorporation of labeled acetate in all sesquiterpenoids produced by Cun was verified via the increased abundance of m/z 205 and the occurrence of m/z 206 (Table 6-3) only.

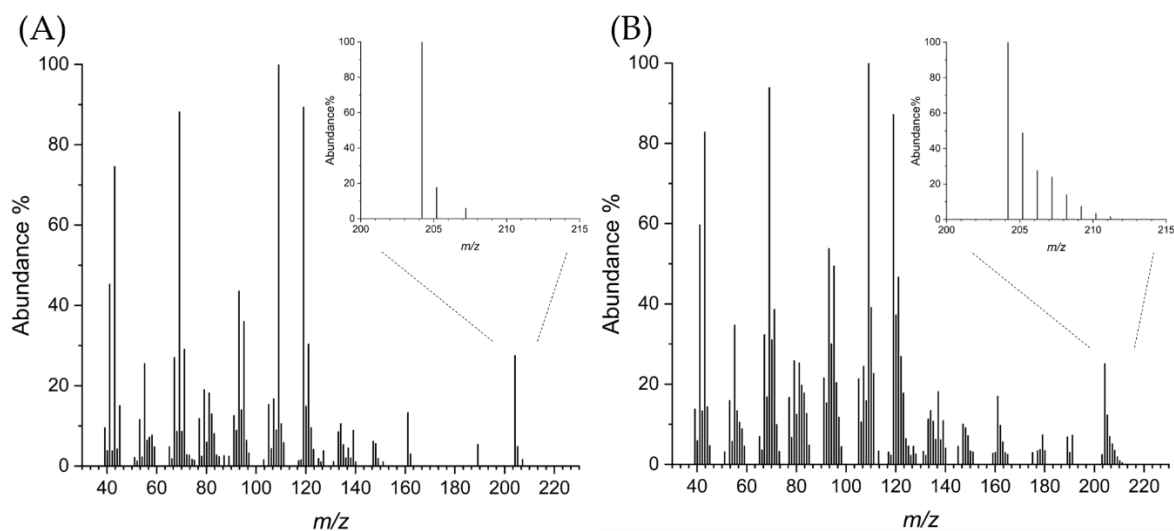


Figure 6-7: Mass spectra of α -bisabolol. (A) Spectrum of α -bisabolol (scan m/z from 33 to 300). (B) Spectrum of α -bisabolol after supplementation of ^{13}C -labeled acetate (scan m/z from 33 to 300). m/z range from 200 to 215 is shown superimposed in the upper right corner of the respective spectra.

Humulene was the only sesquiterpene with an unusually high intensity (39.5%) of the isotopic peak at m/z 205 already in the control. A co-elution with another compound was most likely parental for this, but the incorporation of labeled acetate was clearly indicated by the occurrence of m/z 206, which was not present in the control.

For low-yield products, not all of the expected labels were detected, due to lower ion intensities. Nevertheless, the incorporation of ^{13}C -labeled acetate was detected for all sesquiterpenoids produced by *Cun* and verified that a surplus of acetyl-CoA had flown into the mevalonate pathway. It is noteworthy that predominately cyclic sesquiterpenoids were generated. The constant development of genome mining and bioinformatic tools in general led to an increasing number of characterized sesquiterpene biosynthetic pathways (Quin *et al.*, 2014). In a previous work, ten cyclases were identified in *Cun* and heterologously produced (Püth, 2021). This finding is in good accordance with the results of the present study.

6.5 Conclusions

Cerrena unicolor possesses a unique portfolio of sesquiterpene cyclases, which enables the biotechnological production of a number of bioactive mono- and bicyclic sesquiterpenes (Table 6-1). Their production was boosted to a total of more than 300 mg/L by feeding them unsaturated fatty acids, which exceeded the solubility of some sesquiterpene hydrocarbons in water. For example, the predicted water solubility of α -muurolene (ALOGPS solubility calculation software) was 10 mg/L (<https://foodb.ca/compounds/FDB016928>, accessed on 20 December 2022), but the almost 10-fold concentration was isolated from a culture broth upon supplementation with rapeseed press cake (Figure 6-4). Residual lipid droplets in the culture supernatant may have served as protective accumulation sites, which would explain the high product concentrations observed. Rapeseed press cake was a sustainable nutrient source to improve sesquiterpenoid production because it is a large-volume, lipid- and protein-rich side-stream of rapeseed oil production (Figure 6-5). In this study, its double function as a precursor and as an accumulation site was supposed.

Knowledge about the biogenesis of sesquiterpenoids and its regulation in basidiomycetes is deficient (Wang *et al.*, 2021). An overflow of the acetyl-CoA pool appeared to stimulate the mevalonate pathway. This hypothesis was strongly supported through the incorporation of labeled acetate into the carbon chain of the sesquiterpenes. Further improvements in product yields can be envisaged through a systematic optimization of cultivation conditions. However, substantial improvements may be achieved through strain engineering only. Unfortunately, only very few data on the regulation of gene expression and no data on terpene metabolism of *Cun* on the genome level are available (Elisashvili, 2009). Experimental tools

to modify the genome of Basidiomycota are still under development and need to be refined in the future (Strong, 2022).

Biotechnologically generated sesquiterpenes used as flavor compounds may be labeled “natural,” according to current EU regulations (VO (EG) 1334/2008). In the United States, natural flavors are defined under regulation 21 CFR 101.22. Under this regulation, “natural flavor” or “natural flavoring” means “... any product of ... plant material ... or fermentation products thereof, whose significant function in food is flavoring ...”. As naturalness of food is crucial for the majority of consumers, this distinguishing attribute creates a marketing advantage for the producer (Román, 2017).

6.6 Author Contributions, Funding, Acknowledgments and Conflicts of Interest

Author Contributions

Conceptualization, N.P. and R.G.B.; methodology, N.P.; validation, N.P. and U.K.; formal analysis, N.P.; investigation, N.P.; writing—original draft preparation, N.P.; writing—review and editing, F.E., R.G.B. and U.K.; visualization, N.P.; supervision, F.E., R.G.B. and U.K.; project and funding acquisition, R.G.B. and U.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The APC was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

Acknowledgments

We thank Elisa Strauss for her preliminary work with *Cerrena unicolor*, Carmen Theobald for the skilful Soxhlet extraction, and Gesa Bimmermann for the skilful Kjeldahl analysis.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

6.7 Supplementary Material

Table 6-2: Odor impressions obtained by GC-O measurement of extracts from cultivation of *Cerrena unicolor* in SNL and rapeseed oil as media supplement.

peak	substance	odor impression
1	α -Copaene	fresh, honey
2	Isosativene	
3	β -Cubebene	citrus, unpleasant
4	Sesquisabinene	woody
5	Humulene	woody
6	α -Muurolene	woody
7	β -Curcumene	
8	Cubebol	spicy
9	$5\beta,7\beta H,10\alpha$ -Eudesm-11-en-1 α -ol	
10	Cubenol	heavy, tea
11	Epicubenol	
12	Sesquisabinene hydrate	
13	α -Bisabolol	flowery

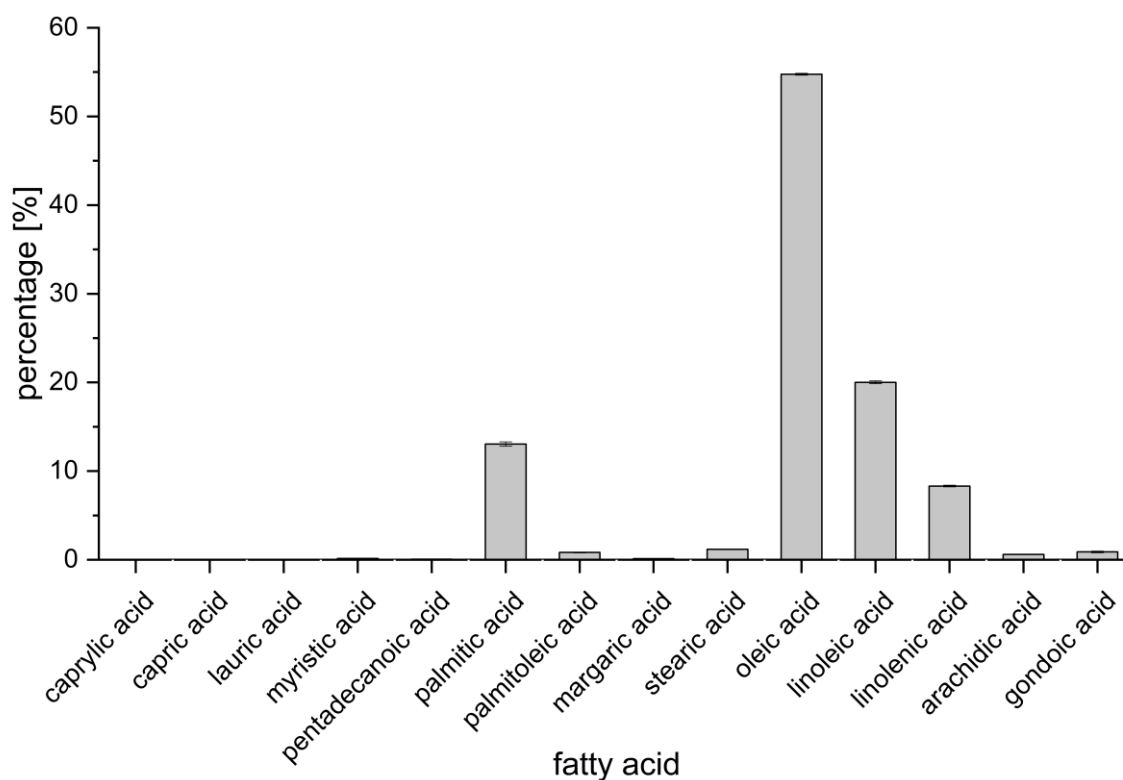


Figure 6-8: Fatty acid distribution of residual oil from rapeseed press cake obtained *via* Soxhlet extraction.

Table 6-3: Intensities of the sesquiterpenoid molecular ion (204 m/z) and isotopic peaks (205 m/z, 206 m/z) in the supernatant after eleven days of cultivation of *Cerrena unicolor* in SNL w/o supplementation of ^{13}C sodium acetate.

m/z	α -Copaene		Isosativene		β -Cubebene	
	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate
204	100	100	100	100	100	100
205	16.0	29.3	16.8	22.5	15.3	28.5
206		4.7		3.5		4.6
m/z	Sesquisabinene		Humulene		β -Curcumene	
	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate
204	100	100	100	100	100	100
205	18.2	30.4	39.5	46.5	21.8	30.9
206		5.1		18.4		6.2
m/z	α -Muurolene		Cubebol		5 β ,7 β H,10 α -Eudesm-11-en-1 α -ol	
	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate
204	100	100	100	100	100	100
205	18.6	37.5	20.2	29.7	17.0	31.9
206		10.9		5.3		6.5
m/z	Cubebol		Epicubebol		Sesquisabinenhydrat	
	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate	SNL control	^{13}C -acetate
204	100	100	100	100	100	100
205	28.8	46.6	23.1	38.6	16.6	69.5
206		8.0		6.2		15.9
m/z	α -Bisabolol					
	SNL control	^{13}C -acetate				
204	100	100				
205	18.4	48.8				
206		27.5				

7 Ausblick

Diese Arbeit zeigt am Beispiel der Sesquiterpenbildung das große Potential von Enzymen aus Basidiomycota für eine biotechnologische Produktion natürlicher Aromastoffe. Im ersten Teil der Arbeit konnten vier der im Genom von *Cerrena unicolor* (Cun) identifizierten putativen Sesquiterpensynthasen (STS) nicht kloniert bzw. heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert werden. Die Inaktivität von Cun5765, Cun 6114, and Cun7487 wurde mit Schwierigkeiten bei der Vorhersage von Introns begründet (Misieck & Hoffmeister, 2008). Die Weiterentwicklung von Programmen zur Vorhersage von Introns wie beispielsweise „Augustus“ ist der Schlüssel, um zukünftig derlei Probleme umgehen zu können. Das Produkt von Cun9106 konnte abschließend noch nicht eindeutig identifiziert werden. Ein Ansatz für weiterführende Arbeiten wäre eine heterologe Produktion der STS im Reaktor-Maßstab mit anschließendem *Scale-Up* der Substratumsetzung. Da bei der enzymatischen Umsetzung lediglich ein Produkt gebildet wird, sollte die Bereitstellung einer ausreichenden Menge des Produktes für die finale Strukturaufklärung mittels NMR möglich sein.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass lipidhaltige Nebenströme wie Rapspresskuchen als Medienzusatz die Sesquiterpenproduktion von Cun drastisch erhöhen können. Ein möglicher nächster Schritt wäre das *Scale-Up* der Kultivierung und die Entwicklung von Prozessen für eine spezifische Extraktion von Sesquiterpenen. Denkbar wäre hier der Einsatz eines *Wave*-Reaktors bzw. der Einsatz von Zeolithen zur *in situ* Produktabtrennung. Die Erstellung von *knock-out* Mutanten könnte dazu genutzt werden, dass Sesquiterpenprofil von Cun zu verringern und die Produktion einzelner Sesquiterpene in den Vordergrund zu stellen. Dazu fehlt jedoch Wissen über die Genexpression des Pilzes (Elisashvili, 2009) sowie die Entwicklung experimenteller Möglichkeiten der Genommodifizierung von Basidiomyceten (Strong, 2022). Der Einfluss der einzelnen Medienzusätze auf Expressionsebene könnte zudem über quantitative PCR untersucht werden, da es auch zu verminderten Produktausbeuten einzelner Sesquiterpene gekommen ist.

Außerdem wurde bisher lediglich versucht, durch den Einsatz von Nebenströmen als Medienzusätze die Produktausbeute zu erhöhen. Ein weiterer Ansatz zur ressourcenschonenden Produktion von Sesquiterpenen wäre der Einsatz von industriellen Nebenströmen, um einzelne oder mehrere Komponenten des Kultivierungsmediums zu ersetzen. Vorarbeiten wurden in diesem Bereich bereits geleistet, wobei die generierten

Daten nicht Teil dieser Arbeit sind. Der Einsatz von Molkepulver anstelle von Glukose und Asparagin zeigte gutes Wachstum und die Produktion von Sesquiterpenen. Da Molkepulver hauptsächlich aus Laktose besteht, liegt nahe, dass der Pilz diese als Kohlenstoffquelle nutzt. Bisher konnte jedoch keine Abnahme der Laktosekonzentration während der Kultivierung nachgewiesen werden. Auch das Vorhandensein einer β -Glucosidase in *Cun* ist bisher nicht bekannt. Mittels HPLC konnte in ersten Versuchen eine Abnahme des frei vorliegenden Asparagins im Kulturmedium gemessen werden. Da Asparagin der kostenintensivste Bestandteil des in der hier vorliegenden Arbeit genutzten SNL-Mediums ist, ließe sich die Kultivierung von Basidiomyceten zukünftig durch den Einsatz von Molkepulver ressourcenschonender und kostengünstiger durchführen.

8 Literaturverzeichnis

- Aaron, J. A., & Christianson, D. W. (2010). Trinuclear Metal Clusters in Catalysis by Terpenoid Synthases. *Pure Appl Chem*, 82(8), 1585-1597. <https://doi.org/10.1351/pac-con-09-09-37>
- Abraham, B. G., & Berger, R. G. (1994). Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2344-2348.
- Abraham, W. R. (2001). Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Curr Med Chem*, 8(6), 583-606. <https://doi.org/10.2174/0929867013373147>
- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2017). Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids*, 62, 239-250.
- Agger, S., Lopez-Gallego, F., & Schmidt-Dannert, C. (2009). Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Microbiol*, 72(5), 1181-1195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06717.x>
- Ahlborn, J., Stephan, A., Meckel, T., Maheshwari, G., Rühl, M., & Zorn, H. (2019). Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8(1), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-00317-4>
- Alhomodi, A. F., Gibbons, W. R., & Karki, B. (2022). Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and submerged state fermentation of raw and processed canola meal. *Bioresource Technology Reports*, 18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101063>.
- Aliotta, L., Vannozzi, A., Cinelli, P., Fiori, S., Coltelli, M.-B., & Lazzeri, A. (2022). Wheat bran addition as potential alternative to control the plasticizer migration into PLA/PBSA blends. *Journal of Materials Science*, 57, 14511-14527.
- Alonso, W. R., Rajaonarivony, J. I., Gershenzon, J., & Croteau, R. (1992). Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *J Biol Chem*, 267(11), 7582-7587.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med*, 78(16), 1707-1718. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315370>

- Amara, F. B., Bouzid, M., Sahnoun, M., Nasr, Y. B., Jaouadi, B., Bejar, S., & Jemli, S. (2022). Valorization of Potato Peels Starch for Efficient β -Cyclodextrin Production and Purification through an Eco-Friendly Process. *Starch*, 74(9-10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/star.202200037>
- Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes--a review. *Molecules*, 19(9), 14821-14842. <https://doi.org/10.3390/molecules190914821>
- Banu, J. R., Kavitha, S., Kannah, R. Y., Devi, T. P., Gunasekaran, M., Kim, S. H., & Kumar, G. (2019). A review on biopolymer production via lignin valorization. *Bioresour Technol*, 290, 121790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121790>
- Bayram, O., & Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*, 36(1), 1-24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x>
- Belova, O. V., Lisov, A. V., Vinokurova, N. G., Kostenevich, A. A., Sapunova, L. I., Lobanok, A. G., & Leont'evskii, A. A. (2014). [Xylanase and cellulase of fungus *Cerrena unicolor* VKM F-3196: production, properties, and applications for the saccharification of plant material]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 50(2), 171-176.
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag*, 68, 581-594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Berger, R. G. (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- Bertacchi, S., Pagliari, S., Cantù, C., Bruni, I., Labra, M., & Branduardi, P. (2021). Enzymatic Hydrolysate of Cinnamon Waste Material as Feedstock for the Microbial Production of Carotenoids. *Int J Environ Res Public Health*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph18031146>
- Bian, G., Deng, Z., & Liu, T. (2017). Strategies for terpenoid overproduction and new terpenoid discovery. *Curr Opin Biotechnol*, 48, 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.002>
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot*, 98(3), 426-438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

- Bürger, F., Koch, M., Fraatz, M. A., Omarini, A. B., Berger, R. G., & Zorn, H. (2022). Production of an Anise- and Woodruff-like Aroma by Monokaryotic Strains of *Pleurotus sapidus* Grown on Citrus Side Streams. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030651>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 447-459, table of contents. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.447-459.2002>
- Cane, D. E., Yang, G., Xue, Q., & Shim, J. H. (1995). Trichodiene synthase. Substrate specificity and inhibition. *Biochemistry*, 34(8), 2471-2479. <https://doi.org/10.1021/bi00008a010>
- Chaari, F., Zouari-Ellouzi, S., Belguith-Fendri, L., Yosra, M., Ellouz-Chaabouni, S., & Ellouz-Ghorbel, R. (2022). Valorization of Cereal by Products Extracted Fibre and Potential use in Breadmaking. *Chemistry Africa*, 5.
- Chang, Y. C., Chiang, C. C., Chang, Y. S., Chen, J. J., Wang, W. H., Fang, L. S., Chung, H. M., Hwang, T. L., & Sung, P. J. (2020). Novel Caryophyllane-Related Sesquiterpenoids with Anti-Inflammatory Activity from *Rumphella antipathes* (Linnaeus, 1758). *Mar Drugs*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/md18110554>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci*, 13(7), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen, R., Feng, T., Li, M., Zhang, X., He, J., Hu, B., Deng, Z., Liu, T., Liu, J. K., Wang, X., & Bian, G. (2022). Characterization of Tremulane Sesquiterpene Synthase from the Basidiomycete *Irpex lacteus*. *Org Lett*, 24(31), 5669-5673. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c01975>
- Christianson, D. W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev*, 106(8), 3412-3442. <https://doi.org/10.1021/cr050286w>
- Christianson, D. W. (2017). Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem Rev*, 117(17), 11570-11648. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287>
- Ciesielski, S., Obeyaa Adu, E., Mozejko-Ciesielska, J., Pokoj, T., & Wilke, A. (2021). Wood Juice Valorization through Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Using *Bacillus sp.* G8_19. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 9(50), 16870-16873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06856>
- Croteau, R. (1987). Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*, 87(5), 929-954. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/cr00081a004>

- Dai, Q., Zhang, F.-L., & Feng, T. (2021). Sesquiterpenoids Specially Produced by Fungi: Structures, Biological Activities, Chemical and Biosynthesis (2015–2020). *Journal of Fungi*, 7(12), 1026. <https://doi.org/10.3390/jof7121026>
- Daletos, G., & Stephanopoulos, G. (2020). Protein engineering strategies for microbial production of isoprenoids. *Metab Eng Commun*, 11, e00129. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00129>
- de Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: volatile codes. *J Chem Ecol*, 34(7), 882-897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1621-1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M., Moldes, A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31(11), 2327-2335. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.06.001>
- Di Lena, G., Sanchez Del Pulgar, J., Lombardi Boccia, G., Casini, I., & Ferrari Nicoli, S. (2020). Corn Bioethanol Side Streams: A Potential Sustainable Source of Fat-Soluble Bioactive Molecules for High-Value Applications. *Foods*, 9(12), 1788. <https://doi.org/10.3390/foods9121788>
- Dickschat, J. S. (2016). Bacterial terpene cyclases. *Nat Prod Rep*, 33(1), 87-110. <https://doi.org/10.1039/c5np00102a>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Bakradze, M. (2002). [Dependence of activities of polysaccharide hydrolases and oxidases from *Cerrena unicolor* on the source of carbon and aromatic acids in culture media]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 38(3), 243-247.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.020>
- Engels, B., Heinig, U., Grothe, T., Stadler, M., & Jennewein, S. (2011). Cloning and characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides. *J Biol Chem*, 286(9), 6871-6878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165845>
- Ezediokpu, M. N., Krause, K., Kunert, M., Hoffmeister, D., Boland, W., & Kothe, E. (2022). Ectomycorrhizal Influence on the Dynamics of Sesquiterpene Release by *Tricholoma vaccinum*. *J Fungi (Basel)*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/jof8060555>

- Faylo, J. L., Ronnebaum, T. A., & Christianson, D. W. (2021). Assembly-Line Catalysis in Bifunctional Terpene Synthases. *Acc Chem Res*, 54(20), 3780-3791. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00296>
- Ferreira, A. R., Alves, V. D., & Coelho, I. M. (2016). Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications. *Membranes (Basel)*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/membranes6020022>
- Fetzer, A., Herfellner, T., Stabler, A., Menner, M., Eisner, P. (2018). Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. *Industrial Crops and Products*, 112, 236-246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.011>
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzadała, L., & Szumny, A. (2016). β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med*, 5(10), 3007-3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
- Freiherst, D., Brunsch, M., Wirth, S., Krause, K., Kniemeyer, O., Linde, J., Kunert, M., Boland, W., & Kothe, E. (2018). Smelling the difference: Transcriptome, proteome and volatilome changes after mating. *Fungal Genet Biol*, 112, 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.08.007>
- Frick, S., Nagel, R., Schmidt, A., Bodemann, R. R., Rahfeld, P., Pauls, G., Brandt, W., Gershenzon, J., Boland, W., & Burse, A. (2013). Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(11), 4194-4199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221489110>
- Gao, Y., Honzatko, R. B., & Peters, R. J. (2012). Terpene synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis. *Nat Prod Rep*, 29(10), 1153-1175. <https://doi.org/10.1039/c2np20059g>
- Garms, S., Kollner, T. G., & Boland, W. (2010). A multiproduct terpene synthase from *Medicago truncatula* generates cadalane sesquiterpenes via two different mechanisms. *J Org Chem*, 75(16), 5590-5600. <https://doi.org/10.1021/jo100917c>
- Gennadios, H. A., Gonzalez, V., Di Costanzo, L., Li, A., Yu, F., Miller, D. J., Allemann, R. K., & Christianson, D. W. (2009). Crystal structure of (+)-delta-cadinene synthase from *Gossypium arboreum* and evolutionary divergence of metal binding motifs for catalysis. *Biochemistry*, 48(26), 6175-6183. <https://doi.org/10.1021/bi900483b>
- Gonçalves, B. M. F., Cardoso, D. S. P., & Ferreira, M. U. (2020). Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpene Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators. *Molecules*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153364>
- Goodwin, T. E., Rasmussen, E. L., Guinn, A. C., McKelvey, S. S., Gunawardena, R., Riddle, S. W., & Riddle, H. S. (1999). African elephant sesquiterpenes. *J Nat Prod*, 62(11), 1570-1572. <https://doi.org/10.1021/np990191n>

- Green, S., Squire, C. J., Nieuwenhuizen, N. J., Baker, E. N., & Laing, W. (2009). Defining the potassium binding region in an apple terpene synthase. *J Biol Chem*, *284*(13), 8661-8669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807140200>
- Gressler, M., Löhr, N. A., Schäfer, T., Lawrinowitz, S., Seibold, P. S., & Hoffmeister, D. (2021). Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. *Nat Prod Rep*, *38*(4), 702-722. <https://doi.org/10.1039/d0np00077a>
- Grosse, M., Strauss, E., Krings, U., & Berger, R. G. (2019). Response of the sesquiterpene synthesis in submerged cultures of the Basidiomycete *Tyromyces floriformis* to the medium composition. *Mycologia*, *111*(6), 885-894. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1668740>
- Hald, C., Dawid, C., Tressel, R., & Hofmann, T. (2019). Kaempferol 3- O-(2''- O-Sinapoyl- β -sophoroside) Causes the Undesired Bitter Taste of Canola/Rapeseed Protein Isolates. *J Agric Food Chem*, *67*(1), 372-378. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06260>
- Hao, W., & Golding, G. B. (2006). The fate of laterally transferred genes: life in the fast lane to adaptation or death. *Genome Res*, *16*(5), 636-643. <https://doi.org/10.1101/gr.4746406>
- Hashempour-Baltork, F., Hosseini, S. M., Assarehzadegan, M. A., Khosravi-Darani, K., & Hosseini, H. (2020). Safety assays and nutritional values of mycoprotein produced by *Fusarium venenatum* IR372C from date waste as substrate. *J Sci Food Agric*, *100*(12), 4433-4441. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10483>
- Hoff, M., Trüeb, R. M., Ballmer-Weber, B. K., Vieths, S., & Wuethrich, B. (2003). Immediate-type hypersensitivity reaction to ingestion of mycoprotein (Quorn) in a patient allergic to molds caused by acidic ribosomal protein P2. *J Allergy Clin Immunol*, *111*(5), 1106-1110. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1339>
- Hohn, T. M., & Plattner, R. D. (1989). Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase aristolochene synthase from *Penicillium roqueforti*. *Arch Biochem Biophys*, *272*(1), 137-143. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90204-x)
- Huang, Y., Hoefgen, S., & Valiante, V. (2021). Biosynthesis of Fungal Drimane-Type Sesquiterpene Esters. *Angew Chem Int Ed Engl*, *60*(44), 23763-23770. <https://doi.org/10.1002/anie.202108970>
- Hyatt, D. C., Youn, B., Zhao, Y., Santhamma, B., Coates, R. M., Croteau, R. B., & Kang, C. (2007). Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(13), 5360-5365. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700915104>
- Ichinose, H., Ukeba, S., & Kitaoka, T. (2022). Latent potentials of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* responsible for sesquiterpene

- metabolism: CYP5158A1 and CYP5144C8 decorate (E)- α -bisabolene. *Enzyme Microb Technol*, 158, 110037. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110037>
- Jang, H. J., Lee, S., Lee, S. J., Lim, H. J., Jung, K., Kim, Y. H., Lee, S. W., & Rho, M. C. (2017). Anti-inflammatory Activity of Eudesmane-Type Sesquiterpenoids from *Salvia plebeia*. *J Nat Prod*, 80(10), 2666-2676. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00326>
- Jaramillo, D. A., Méndez, M. J., Vargas, G., Stashenko, E. E., Vasco-Palacios, A. M., Ceballos, A., & Caicedo, N. H. (2020). Biocatalytic Potential of Native Basidiomycetes from Colombia for Flavour/Aroma Production. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184344>
- Javanbakht, S., & Namazi, H. (2017). Solid state photoluminescence thermoplastic starch film containing graphene quantum dots. *Carbohydr Polym*, 176, 220-226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.080>
- Jia, Q., Chen, X., Köllner, T. G., Rinkel, J., Fu, J., Labbé, J., Xiong, W., Dickschat, J. S., Gershenzon, J., & Chen, F. (2019). Terpene Synthase Genes Originated from Bacteria through Horizontal Gene Transfer Contribute to Terpenoid Diversity in Fungi. *Sci Rep*, 9(1), 9223. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45532-1>
- Jilg, T. (2005). Füttern ohne Sojaschrot - Einsatz von Rapsprodukten in der Rinderfütterung. Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung und Grünlandwirtschaft LVVG. Bildungs- und Wissenszentrum Aulendorf.
- Jischa, S., Sabu, K., & Manjula, S. (2019). Multifunctional aspects of *Piriformospora indica* in plant endosymbiosis. *Mycology*, 10(3), 182-190. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1600063>
- Kachlishvili, E., Jokharidze, T., Kobakhidze, A., & Elisashvili, V. (2021). Enhancement of laccase production by *Cerrena unicolor* through fungal interspecies interaction and optimum conditions determination. *Arch Microbiol*, 203(7), 3905-3917. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02374-8>
- Kachlishvili, E., Metreveli, E., & Elisashvili, V. (2014). Modulation of *Cerrena unicolor* laccase and manganese peroxidase production. *Springerplus*, 3, 463. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-463>
- Kaczmarek, P., Korniewicz, D., Lipiński, K., & Mazur, M. (2016). Chemical Composition Of Rapeseed Products And Their Use In Pig Nutrition. *Pol. J. Natur. Sc.*, 31(4), 545-562.
- Kashiwabara, M., Kamo, T., Makabe, H., Shibata, H., & Hirota, M. (2006). Repraesentins D, E and F, new plant growth promoters from *Lactarius repraesentaneus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(6), 1502-1505. <https://doi.org/10.1271/bbb.50639>

- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, 3(12), 937-947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kelly, M., Su, C. Y., Schaber, C., Crowley, J. R., Hsu, F. F., Carlson, J. R., & Odom, A. R. (2015). Malaria parasites produce volatile mosquito attractants. *mBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00235-15>
- Khalighi, S., Berger, R. G., & Ersoy, F. (2020). Cross-Linking of Fibrex Gel by Fungal Laccase: Gel Rheological and Structural Characteristics. *Processes*, 8(16). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr8010016>
- Kivrak, I., Kivrak, S., & Harmandar, M. (2016). Bioactive Compounds, Chemical Composition, and Medicinal Value of the Giant Puffball, *Calvatia gigantea* (Higher Basidiomycetes), from Turkey. *Int J Med Mushrooms*, 18(2), 97-107. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i2.10>
- Köllner, T. G., O'Maille, P. E., Gatto, N., Boland, W., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2006). Two pockets in the active site of maize sesquiterpene synthase TPS4 carry out sequential parts of the reaction scheme resulting in multiple products. *Arch Biochem Biophys*, 448(1-2), 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.011>
- Köllner, T. G., Schnee, C., Li, S., Svatos, A., Schneider, B., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2008). Protonation of a neutral (*S*)-beta-bisabolene intermediate is involved in (*S*)-beta-macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11. *J Biol Chem*, 283(30), 20779-20788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802682200>
- Kolwek, J., Behrens, C., Linke, D., Krings, U., & Berger, R. G. (2018). Cell-free one-pot conversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by a unique dye-decolorizing peroxidase combined with a laccase from *Funalia trogii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 45(2), 89-101. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1998-9>
- Kramer, R., Abraham, W.-R. (2012). Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? *Phytochemistry reviews proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 11(1), 15-37.
- Krings, U., Pilawa, S., Theobald, C., & Berger, R. G. (2001). Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* - elucidation of metabolic pathways using [5-2H]-ferulic acid. *J Biotechnol*, 85(3), 305-314. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00396-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00396-5)
- Krupodorova, T. A., & Barshteyn, V. Y. (2015). Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation. *J. BioSci. Biotechnol.*, 4(3), 339-347.
- Kumar, L., Ramakanth, D., Akhila, A., & Gaikwad, K. K. (2022). Edible films and coatings for food packaging applications: a review. *Environ Chem Lett*, 20, 875-900. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10311-021-01339-z>

- Lee, J. S., Pan, J. J., Ramamoorthy, G., & Poulter, C. D. (2017). Structure-Function Studies of *Artemisia tridentata* Farnesyl Diphosphate Synthase and Chrysanthemyl Diphosphate Synthase by Site-Directed Mutagenesis and Morphogenesis. *J Am Chem Soc*, *139*(41), 14556-14567. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07608>
- Lee, S. Y., Kim, M., Kim, S. H., Hong, C. Y., Ryu, S. H., & Choi, I. G. (2016). Transcriptomic analysis of the white rot fungus *Polyporus brumalis* provides insight into sesquiterpene biosynthesis. *Microbiol Res*, *182*, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.008>
- Leonhardt, R. H., & Berger, R. G. (2015). Nootkatone. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, *148*, 391-404. https://doi.org/10.1007/10_2014_279
- Lewinska, A. Z., J.; Duda, M.; Gorka, A.; Wnuk, M. (2015). Fatty Acid Profile and Biological Activities of Linseed and Rapeseed Oils. *Molecules*, *20*, 22872-22880. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules201219887>
- Li, N., Wang, S., Wang, T., Liu, R., Zhi, Z., Wu, T., Sui, W., & Zhang, M. (2022). Valorization of Wheat Bran by Three Fungi Solid-State Fermentation: Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Flavor Characteristics. *Foods*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/foods11121722>
- Li, Q., Liu, R., Wu, T., Wang, M., & Zhang, M. (2016). Soluble Dietary Fiber Fractions in Wheat Bran and Their Interactions with Wheat Gluten Have Impacts on Dough Properties. *J Agric Food Chem*, *64*(46), 8735-8744. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03451>
- Liguori, R., Amore, A., & Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl Microbiol Biotechnol*, *97*(14), 6129-6147. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5014-7>
- Lin, C., Zhang, K., Zhao, S., Wang, W., Ru, X., Song, J., Cong, H., & Yang, Q. (2022). Screening and identification of a strain of *Aureobasidium pullulans* and its application in potato starch industrial waste. *Environ Res*, *214*(Pt 2), 113947. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113947>
- Lin, Y. L., Ma, L. T., Lee, Y. R., Shaw, J. F., Wang, S. Y., & Chu, F. H. (2017). Differential Gene Expression Network in Terpenoid Synthesis of *Antrodia cinnamomea* in Mycelia and Fruiting Bodies. *J Agric Food Chem*, *65*(9), 1874-1886. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05386>
- Liu, C. L., Tian, T., Alonso-Gutierrez, J., Garabedian, B., Wang, S., Baidoo, E. E. K., Benites, V., Chen, Y., Petzold, C. J., Adams, P. D., Keasling, J. D., Tan, T., & Lee, T. S. (2018). Renewable production of high density jet fuel precursor sesquiterpenes from *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*, *11*, 285. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1272-z>

- Liu, N., Wu, C., Yu, J. H., Zhu, K. K., Song, M. N., Yang, F. Y., Feng, R. L., Zhang, Y. Y., Chang, W. Q., & Zhang, H. (2019). Germacrane-type sesquiterpenoids with cytotoxic activity from *Sigesbeckia orientalis*. *Bioorg Chem*, *92*, 103196. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103196>
- Londoño-Londoño, J., de Lima, V. R., Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, *119*(1), 81-87.
- Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*, *44*(3), 335-353.
- López-Gallego, F., Wawrzyn, G. T., & Schmidt-Dannert, C. (2010). Selectivity of fungal sesquiterpene synthases: role of the active site's H-1 alpha loop in catalysis. *Appl Environ Microbiol*, *76*(23), 7723-7733. <https://doi.org/10.1128/aem.01811-10>
- Lucarini, M., Durazzo, A., Romani, A., Campo, M., Lombardi-Boccia, G., & Cecchini, F. (2018). Bio-Based Compounds from Grape Seeds: A Biorefinery Approach. *Molecules*, *23*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081888>
- Mantau, U. (2012). Holzrohstoffbilanz Deutschland, Entwicklungen und Szenarien des Holzaufkommens und der Holzverwendung 1987 bis 2015. Zentrum Holzwirtschaft. Universität Hamburg
- Martens, B. M. J., Gerrits, W. J. J., Bruininx, E., & Schols, H. A. (2018). Amylopectin structure and crystallinity explains variation in digestion kinetics of starches across botanic sources in an in vitro pig model. *J Anim Sci Biotechnol*, *9*, 91. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0303-8>
- Medhe, S., Anand, M., & Anal, A. K. (2018). Dietary Fibers, Dietary Peptides and Dietary Essential Fatty Acids from Food Processing By-Products. In *Food Processing By-Products and their Utilization* (pp. 111). John Wiley & Sons Ltd. .
- Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs*, *12*(8), 4539-4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>
- Merhej, J., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2011). The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*, *48*(3), 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.008>
- Michniewicz, A., Ullrich, R., Ledakowicz, S., & Hofrichter, M. (2006). The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, *69*(6), 682-688. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0015-9>

- Miller, D. J., & Allemann, R. K. (2012). Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players? *Nat Prod Rep*, 29(1), 60-71. <https://doi.org/10.1039/c1np00060h>
- Mischko, W., Hirte, M., Fuchs, M., Mehlmer, N., & Brück, T. B. (2018). Identification of sesquiterpene synthases from the Basidiomycota *Coniophora puteana* for the efficient and highly selective β -copaene and cubebol production in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1010-z>
- Misiek, M., & Hoffmeister, D. (2008). Processing sites involved in intron splicing of *Armillaria* natural product genes. *Mycol Res*, 112(Pt 2), 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.011>
- Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Błachowicz, A., Rejczak, T. P., Matuszewska, A., Osińska-Jaroszuk, M., Stefaniuk, D., Janusz, G., Sulej, J., & Kandefers-Szerszeń, M. (2015). Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *Int J Biol Macromol*, 79, 459-468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.015>
- Molinari, F., Pollegioni, L., & Rosini, E. (2023). Whole-Cell Bioconversion of Renewable Biomasses-Related Aromatics to *cis,cis*-Muconic Acid. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(6), 2476-2485. <https://doi.org/DOI:10.1021/acssuschemeng.2c06534>
- Moniodis, J., Jones, C. G., Renton, M., Plummer, J. A., Barbour, E. L., Ghisalberty, E. L., & Bohlmann, J. (2017). Sesquiterpene Variation in West Australian Sandalwood (*Santalum spicatum*). *Molecules*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/molecules22060940>
- Montoya, S., Orrego, C. E., & Levin, L. (2012). Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World J Microbiol Biotechnol*, 28(4), 1533-1541. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0957-2>
- Moreno-González, M., & Ottens, M. (2021). A Structured Approach to Recover Valuable Compounds from Agri-food Side Streams. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1387-1406. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02647-6>
- Nakano, C., Tezuka, T., Horinouchi, S., & Ohnishi, Y. (2012). Identification of the SGR6065 gene product as a sesquiterpene cyclase involved in (+)-epicubenol biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot (Tokyo)*, 65(11), 551-558. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.68>
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., & Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D26-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1069>
- Ohloff, G., Pickenhagen, W., Kraft, P. (2012). Scent and chemistry: the molecular world of odors. Verl. Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH.

- Okamoto, K., Narayama, S., Katsuo, A., Shigematsu, I., & Yanase, H. (2002). Biosynthesis of *p*-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *J Biosci Bioeng*, 93(2), 207-210. <https://doi.org/10.1263/jbb.93.207>
- Orban, A., Hennicke, F., & Rühl, M. (2020). Volatilomes of *Cyclocybe aegerita* during different stages of monokaryotic and dikaryotic fruiting. *Biol Chem*, 401(8), 995-1004. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0392>
- Östbring, K., Malmqvist, E., Nilsson, K., Rosenlind, I., & Rayner, M. (2019). The Effects of Oil Extraction Methods on Recovery Yield and Emulsifying Properties of Proteins from Rapeseed Meal and Press Cake. *Foods*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.3390/foods9010019>
- Özvural, E. B., & Vural, H. (2011). Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Sci*, 88(1), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.022>
- Page, M. J., & Di Cera, E. (2006). Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. *Physiol Rev*, 86(4), 1049-1092. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2006>
- Pateraki, I., Heskes, A.M., Hamberger B. (2015). Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. In J. B. J. Schrader (Ed.), *Biotechnology of Isoprenoids* (Vol. 148, pp. 107-139). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2014_301
- Perfumer, & Flavorist. (2022). Latest Flavors and Fragrances Market Report Projects Growth by 2026. Online verfügbar unter <https://www.perfumerflavorist.com/news/news/22512107/latest-flavors-and-fragrances-market-report-projects-growth-by-2026>, zuletzt aktualisiert am 24.10.2022, zuletzt geprüft am 21.03.2023.
- Picaud, S., Brodelius, M., & Brodelius, P. E. (2005). Expression, purification and characterization of recombinant (*E*)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 66(9), 961-967. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.027>
- Püth, N., Ersoy, F., Krings, U., Berger, R.G. (2021). Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete *Cerrena unicolor*. *Catalysts*, 11. <https://doi.org/10.3390/catal11111361>
- Quin, M. B., Flynn, C. M., & Schmidt-Dannert, C. (2014). Traversing the fungal terpenome. *Nat Prod Rep*, 31(10), 1449-1473. <https://doi.org/10.1039/c4np00075g>
- Quin, M. B., Flynn, C. M., Wawrzyn, G. T., Choudhary, S., & Schmidt-Dannert, C. (2013). Mushroom hunting by using bioinformatics: application of a predictive framework facilitates the selective identification of sesquiterpene synthases in basidiomycota. *Chembiochem*, 14(18), 2480-2491. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300349>

- Quin, M. B., Michel, S. N., & Schmidt-Dannert, C. (2015). Moonlighting Metals: Insights into Regulation of Cyclization Pathways in Fungal $\Delta(6)$ -Protoilludene Sesquiterpene Synthases. *Chembiochem*, *16*(15), 2191-2199. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500308>
- Quin, M. B., Wawrzyn, G., & Schmidt-Dannert, C. (2013). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Omp6, a protoilludene synthase from *Omphalotus olearius*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *69*(Pt 5), 574-577. <https://doi.org/10.1107/s1744309113010749>
- Rabe, P., Schmitz, T., & Dickschat, J. S. (2016). Mechanistic investigations on six bacterial terpene cyclases. *Beilstein J Org Chem*, *12*, 1839-1850. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.173>
- Rajaonarivony, J. I., Gershenzon, J., & Croteau, R. (1992). Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*). *Arch Biochem Biophys*, *296*(1), 49-57. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90543-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90543-6)
- Rakita, S., Kokić, B., Manoni, M., Mazzoleni, S., Lin, P., Luciano, A., Ottoboni, M., Cheli, F., & Pinotti, L. (2023). Cold-Pressed Oilseed Cakes as Alternative and Sustainable Feed Ingredients: A Review. *Foods*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/foods12030432>
- Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications--a review. *Bioresour Technol*, *98*(10), 2000-2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.002>
- Robinson, D. R., & West, C. A. (1970). Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *Ricinus communis* L. I. Identification of diterpene hydrocarbons formed from mevalonate. *Biochemistry*, *9*(1), 70-79. <https://doi.org/10.1021/bi00803a010>
- Rodríguez, L. A., Toro, M. E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M. L., Gouiric, S. C., & Vallejo, M. D. (2010). Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(11), 5914-5917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.112>
- Román, S., Sánchez-Siles, L.M.; Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends Food Sci. Technol.*, *67*, 44-57.
- Ronnebaum, T. A., Gardner, S. M., & Christianson, D. W. (2020). An Aromatic Cluster in the Active Site of epi-Isozizaene Synthase Is an Electrostatic Toggle for Divergent Terpene Cyclization Pathways. *Biochemistry*, *59*(50), 4744-4754. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00876>
- Ruan, J. X., Li, J. X., Fang, X., Wang, L. J., Hu, W. L., Chen, X. Y., & Yang, C. Q. (2016). Isolation and Characterization of Three New Monoterpene Synthases from *Artemisia annua*. *Front Plant Sci*, *7*, 638. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00638>

- Rühl, V., Lotz-Winter, H., Neuss, A., Piepenbring, M., Zorn, H., & Rühl, M. (2018). Comprehensive analysis of the volatilome of *Scytinostroma portentosum*. *Mycol Progress*, *17*, 417-424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11557-017-1367-0>
- Ryu, K. S., Shim, K. S., & Shin, D. (2014). Effect of Grape Pomace Powder Addition on TBARS and Color of Cooked Pork Sausages during Storage. *Korean J Food Sci Anim Resour*, *34*(2), 200-206. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.200>
- Sampedro, M. C., Goicolea, M. A., Unceta, N., Sánchez-Ortega, A., & Barrio, R. J. (2009). Sequential stir bar extraction, thermal desorption and retention time locked GC-MS for determination of pesticides in water. *J Sep Sci*, *32*(20), 3449-3456. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900383>
- Sandoval, G., Thenoux, G., Molenaar, A. A. A., & Gonzalez, M. (2019). The antioxidant effect of grape pomace in asphalt binder. *International Journal of Pavement Engineering*, *20*(2), 163-171. <https://doi.org/10.1080/10298436.2017.1279483>
- Schimanski, S., Ulrich Krings and Ralf G. Berger. (2013). Rapid analysis of volatiles in fat-containing matrices for monitoring bioprocesses. *European Food Research and Technology*, *237*, 739-746.
- Schmidt-Dannert, C. (2014). Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. In J. B. J. Schrader (Ed.), *Biotechnology of Isoprenoids* (Vol. 148, pp. 19-61). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/10_2014_283
- Schmidt-Dannert, C. (2015). Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, *148*, 19-61. https://doi.org/10.1007/10_2014_283
- Schüffler, A. (2018). Secondary Metabolites of Basidiomycetes. In T. Anke, Schüffler, A. (Ed.), *Physiology and Genetics. The Mycota* (Vol. 15, pp. 231-275). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-71740-1_8
- Sharma, P., Ruchika, Dhiman, P., Kumar, R., Saneja, A., & Singh, D. (2023). A solid dispersion of *Citrus reticulata* peel biowaste as an effective antiepileptic: Sustainable approach toward value addition and agro-industrial waste valorisation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *81*, 104238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104238>.
- Shinohara, Y., Takahashi, S., Osada, H., & Koyama, Y. (2016). Identification of a novel sesquiterpene biosynthetic machinery involved in astellolide biosynthesis. *Sci Rep*, *6*, 32865. <https://doi.org/10.1038/srep32865>
- Shu, H. Z., Peng, C., Bu, L., Guo, L., Liu, F., & Xiong, L. (2021). Bisabolane-type sesquiterpenoids: Structural diversity and biological activity. *Phytochemistry*, *192*, 112927. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112927>

- Siebert, M., Krings, U., Günther, T., Fragalas, A., & Berger, R. G. (2022). Enzymatic hydrolysis of kaempferol 3-O-(2^{'''}-O-sinapoyl- β -sophoroside), the key bitter compound of rapeseed (*Brassica napus* L.) protein isolate. *J Sci Food Agric*, *102*(5), 2179-2182. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11547>
- Silva, F., Dourado, F., Gama, M., & Poças, F. (2020). Nanocellulose Bio-Based Composites for Food Packaging. *Nanomaterials (Basel)*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/nano10102041>
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S., & Fuchs, W. (2015). Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *J Chem Technol Biotechnol*, *90*(4), 648-657. <https://doi.org/10.1002/jctb.4627>
- Soares-Castro, P., Soares, F., & Santos, P. M. (2020). Current Advances in the Bacterial Toolbox for the Biotechnological Production of Monoterpene-Based Aroma Compounds. *Molecules*, *26*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules26010091>
- Sprecher, E. (1963). Über ätherisches Öl aus Pilzen. *Planta Medica*, *11*, 119-127.
- Srivastava, P. L., Daramwar, P. P., Krithika, R., Pandreka, A., Shankar, S. S., & Thulasiram, H. V. (2015). Functional Characterization of Novel Sesquiterpene Synthases from Indian Sandalwood, *Santalum album*. *Sci Rep*, *5*, 10095. <https://doi.org/10.1038/srep10095>
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., & Morgenstern, B. (2004). AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, *32*(Web Server issue), W309-312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh379>
- Stoffel, F., Santana, W. d. O., Novello Gregolon, J. G., Ledur Kist, T. B., Fontana, R. B. C., & Camassola, M. (2019). Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *58*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102227>.
- Strauss, E. (2018). Effektoren der Terpenbiosynthese bei Basidiomyceten in Submerskultur [Bachelor Thesis, Leibniz University Hanover]. Hannover, Germany.
- Strong, P. J., Self, R., Allikian, K., Szewczyk, E., Speight, R., O'Hara, I., Harrison, M.D. (2022). Filamentous fungi for future functional food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, *76*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102729>.
- Sun, X., Cai, Y. S., Yuan, Y., Bian, G., Ye, Z., Deng, Z., & Liu, T. (2019). Genome mining in *Trichoderma viride* J1-030: discovery and identification of novel sesquiterpene synthase and its products. *Beilstein J Org Chem*, *15*, 2052-2058. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.202>

- Švarc-Gajić, J., Morais, S., Delerue-Matos, C., Vieira, E. F., & Spigno, G. (2020). Valorization potential of oilseed cakes by subcritical water extraction. *Applied Sciences*, *10*(24), 8815. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app10248815>
- Tamemoto, K., Takaishi, Y., Chen, B., Kawazoe, K., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., & Ashurmetov, O. (2001). Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry*, *58*(5), 763-767. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00307-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00307-7)
- Tan, L. T., Lee, L. H., Yin, W. F., Chan, C. K., Abdul Kadir, H., Chan, K. G., & Goh, B. H. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). *Evid Based Complement Alternat Med*, *2015*, 896314. <https://doi.org/10.1155/2015/896314>
- Thakur, S. A., Nemade, S. N., & Sharanappa, A. (2015). Solid state fermentation of overheated soybean meal (Waste) for production of protease using *Aspergillus Oryzae*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, *4*, 18456-18461.
- Thrän, D., Scholwin, F., & Körner, I. (2009). Nebenprodukte, Rückstände und Abfälle. In M. Kaltschmitt, H. Hartmann, & H. E. Hofbauer (Eds.), *Energie aus Biomasse* (pp. 135-170). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-540-85095-3_4
- Tu, J., Zhao, J., Liu, G., Tang, C., Han, Y., Cao, X., Jia, J., Ji, G., & Xiao, H. (2020). Solid state fermentation by *Fomitopsis pinicola* improves physicochemical and functional properties of wheat bran and the bran-containing products. *Food Chem*, *328*, 127046. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127046>
- Vattekkatte, A., Garms, S., Brandt, W., & Boland, W. (2018). Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: enzymes, substrates and cofactors. *Org Biomol Chem*, *16*(3), 348-362. <https://doi.org/10.1039/c7ob02040f>
- Venkateshwarlu, G., Chandravadana, M. V., & Tewari, R. P. (1999). Volatile flavour components of some edible mushrooms (Basidiomycetes). *Flavour and Fragrance Journal*, *14*(3), 191-194. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199905/06\)14:3<191::AID-FFJ810>3.0.CO;2-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199905/06)14:3<191::AID-FFJ810>3.0.CO;2-7)
- Virtanen, S., Chowreddy, R. R., Irmak, S., Honkapää, K., & Isom, L. (2017). Food Industry Co-streams: Potential Raw Materials for Biodegradable Mulch Film Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, *25*(4), 1110-1130. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0888-y>
- Volk, C., Brandsch, C., Schlegelmilch, U., Wensch-Dorendorf, M., Hirche, F., Simm, A., Gargum, O., Wiacek, C., Braun, P. G., Kopp, J. F., Schwerdtle, T., Treede, H., & Stangl, G. I. (2020). Postprandial Metabolic Response to Rapeseed Protein in Healthy Subjects. *Nutrients*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082270>

- Wanasundara, J. P. D., McIntosh, T. C., Perera, S. P., Withana-Gamage, T. S., & Mitra, P. (2016). Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL*, *23*(4). [https://doi.org/ https://doi.org/10.1051/ocl/2016028](https://doi.org/https://doi.org/10.1051/ocl/2016028)
- Wang, Q., Cao, R., Zhang, Y., Qi, P., Wang, L., & Fang, S. (2021). Biosynthesis and regulation of terpenoids from basidiomycetes: exploration of new research. *AMB Express*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01304-7>
- Wawrzyn, G. T., Quin, M. B., Choudhary, S., López-Gallego, F., & Schmidt-Dannert, C. (2012). Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota. *Chem Biol*, *19*(6), 772-783. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.012>
- Wei, G., Eberl, F., Chen, X., Zhang, C., Unsicker, S. B., Köllner, T. G., Gershenzon, J., & Chen, F. (2020). Evolution of isoprenyl diphosphate synthase-like terpene synthases in fungi. *Sci Rep*, *10*(1), 14944. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71219-z>
- Weigel, J. (2008). Verwendungsmöglichkeiten des Nebenproduktes Rapskuchen aus der Ölmühle Anklam in der Milchviehfütterung [Bachelor Thesis, Hochschule Neubrandenburg]. Neubrandenburg, Germany.
- Wendt, K. U., & Schulz, G. E. (1998). Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure*, *6*(2), 127-133. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00015-x](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00015-x)
- Weseler, A. R., & Bast, A. (2017). Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits. *Nutr J*, *16*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0218-1>
- Wu, J., & Kawagishi, H. (2020). Plant growth regulators from mushrooms. *J Antibiot (Tokyo)*, *73*(10), 657-665. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0352-z>
- Wu, J., Yang, X., Duan, Y., Wang, P., Qi, J., Gao, J. M., & Liu, C. (2022). Biosynthesis of Sesquiterpenes in Basidiomycetes: A Review. *J Fungi (Basel)*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/jof8090913>
- Yap, H. Y., Muria-Gonzalez, M. J., Kong, B. H., Stubbs, K. A., Tan, C. S., Ng, S. T., Tan, N. H., Solomon, P. S., Fung, S. Y., & Chooi, Y. H. (2017). Heterologous expression of cytotoxic sesquiterpenoids from the medicinal mushroom *Lignosus rhinocerotis* in yeast. *Microb Cell Fact*, *16*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0713-x>
- Yin, Z. N., Wu, W. J., Sun, C. Z., Liu, H. F., Chen, W. B., Zhan, Q. P., Lei, Z. G., Xin, X., Ma, J. J., Yao, K., Min, T., Zhang, M. M., & Wu, H. (2019). Antioxidant and Anti-inflammatory Capacity of Ferulic Acid Released from Wheat Bran by Solid-state Fermentation of *Aspergillus niger*. *Biomed Environ Sci*, *32*(1), 11-21. <https://doi.org/10.3967/bes2019.002>

- Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Manag*, *80*, 252-273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>
- Zhang, C., Chen, X., Orban, A., Shukal, S., Birk, F., Too, H. P., & Rühl, M. (2020). *Agrocybe aegerita* Serves As a Gateway for Identifying Sesquiterpene Biosynthetic Enzymes in Higher Fungi. *ACS Chem Biol*, *15*(5), 1268-1277. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00155>
- Zhang, J. X., Sun, L., Zhang, J. H., & Feng, Z. Y. (2008). Sex- and gonad-affecting scent compounds and 3 male pheromones in the rat. *Chem Senses*, *33*(7), 611-621. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjn028>
- Zhao, J., Zhang, J. S., Yang, B., Lv, G. P., & Li, S. P. (2010). Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of *Curcuma* using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis. *Molecules*, *15*(11), 7547-7557. <https://doi.org/10.3390/molecules15117547>
- Zhong, J., Xiao, JH. (2009). Secondary Metabolites from Higher Fungi: Discovery, Bioactivity, and Bioproduction. In J. Zhong, Bai, FW., Zhang, W. (Ed.), *Biotechnology in China I* (Vol. 113, pp. 79-150). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/10_2008_26
- Zhou, H., Yang, Y. L., Zeng, J., Zhang, L., Ding, Z. H., & Zeng, Y. (2016). Identification and Characterization of a δ -Cadinol Synthase Potentially Involved in the Formation of Boreovibrans in *Boreostereum vibrans* of Basidiomycota. *Nat Prod Bioprospect*, *6*(3), 167-171. <https://doi.org/10.1007/s13659-016-0096-4>
- Ziaja-Sołtys, M., Kołodziej, P., Stefaniuk, D., Matuszewska, A., Jaszek, M., & Bogucka-Kocka, A. (2022). Low-Molecular-Weight Secondary Metabolites from Fungi: *Cerrena unicolor* as a New Proposal of an Effective Preparation against Rhabditis Nematodes. *Molecules*, *27*(5), 1660. <https://doi.org/10.3390/molecules27051660>

9 Anhang

Tabelle 9-1: Aminosäuresequenzen der in aktiver Form exprimierbaren STS aus *Cerrena unicolor*

Cun3157

MSSNAVSFTLPDLLAICPLQGRTNPHYEAAAAESSAWVLSFNVFSNRKQDFVSGGSELLCSHAYP
YAGHEELRTCCDFVNLLFTVDEISDEQNGQDAYKTGLVLLKSLRDPEYNDGSVLCTMTKQFQERL
FPRMG PACYRRFVDHVENYINAFVKEAEYREKNVLDMASYEILRRENSAVRCCFGLFGYVLGL
DLPDEIFEHPDMMAMHLAAVDMVCWSNDIYSYNMEQAMGHTTNNIMTVLMKAKNVLDLQAA
DYVGEYFKVLMDFRFDHKSCLPFFGPDMDPTAEQFVMAMESWIVGNLAWSFETLRYFGEKREQV
KVTLVVELASKKV*

Cun7050

MQSATAPVLSSQPSKVVIPDLVSHCDFTLRCNSHQERASAECKEWLFQGSNLSERKQNAFHGLKA
GLLTSWCYPDAEYHHLRVCCDFMNWLFHLDNISDDMNENGTSRTAVDIMNTLYHPYSYSPVSPE
GKLTQDFWRRLIPTASPGSQRFMETMDFFFQAVTQQALDRANGVVPDLDSYIALRRDTS GCKPC
WALIEFAYNLDLPNEVMEHPTIVALGEATNDLVTWSNDIFSYNVEQSKGDTHNMIVVMMRQEGL
DLQSAVDFVGDLCQSIDRFIEQRAHLPSWGPDIQQVEKYVGGLADWIVGSLHWSFESERYFGK
SGLDVKKTRVVPELLPRA*

Cun3574

MSPKRFVFPDLVSHCPYQLRIHPDCDTVNKTSEEWIMKDITFTPDRDKRFLDIKAGVLTAYCYCDA
DLFRLQASSDYLTWLFVDDWTDFEDEFESCFKDCILGCLRDPYGYKTDKIAGRLIADFFRRFLQ
TSGPHCAQRFIDTMDLYLDSVGRQAADRIERTPDLESYIALRRDTSACKTCFALMEFANGLDLPD
EVSEHPLIREMEDATNDLVSWSNDFSYDKEHLIEDTHNIVA VIMEDKKLNLQSAVDYAGDLCNN
CIARFDEARKQLPSWGPEIDREVQLYGGQLQDWIVGSLHWSFVSKRYFGLEGEAIIKKHRTIELTPA
MKSDVEA*

Cun3158

MPALTRTFKLPDLLSMCPVKGSTNPHYEKAAAESSAWINSYNLFTDQKRAFFIQGSNELLVSHTYP
YADYEQFRTCCDFVNLLFVDEVSDDQSGRDARATGNVFLQVMRHDDWDNGSPLAQMTEKFKA
RFRKFAGPGCYARFLVHCENYINAVGHEAEYRERYVLDMESYETLRRENSAIRLCFGLFFVVLG
VDLPDEVFDDPAFLNLYWAAADMVCWSNDVYSYNMEQAKGHSNNILTVLMQAKNIDLQTAS
DLVGDHFAELMRRFLEGKRALPSWGLATDTAVAAVYKALEHWVKGNLWVSFETQRYFGPKHEE
IKKTLLVVLRAPSFD*

Cun0759

MARSTFALPDLVSHCPYPLRINPLCDIVTQKSEEWILNEAKYTPEKRTRFLNTKAGILTAYCYPDAD
DFHLQVSSDYLTWLFVDDWSDEFDETDACSFADCIMGCLRDPYGFKTDKAAGRLTKSYFGRYL
QTSGPCAKRFIDTMDLYLKSVAQQAADRDDGRTPDLETYIGLRRDTSACRPFALMEFVAGIDL
PDEVAEHPLIRSMEDATNDLVSWSNDFSYNKEQSRGDTHNLVAVIMEERKLDLQSAMDFAGELC
HQSISKFEADRRSLPSWGKEIDRDVQLYVQGLQDWIVGSLHWSFATKRYFGTEGEAVKHHRTIQL
LPRKDGVERKDTVVRQNVIVYLFNMFFTVLVGS LFGNMKGLSSPLRVPR*

Cun9106

MSTESSASSEFYIPDLRNWPWSRHLNPHYAICKAESAAWCEFNFAFSPKAQRAFNRCDFNLLASL
AFPLLDKDGCRIGCDLMLFFVFDEYSVADATEVRRQADIIMDALRNSTRPRPKGEWVGGEVA
KQFWENAIRTTTETAQRRFIDTFQLYTDVVQQAADRDDSRIRSVDHYFELRRDTIGAKPSFAILEV
KMDIPDEV MNHPSIVKLTVCIDMLIIGNDLCSYNVEQARGDDGHNLVTIVMHERKCDLTRALEW
ISDLHDLRDLADGFLSTLEEVPSFENSVDLQVSTYVDGLGNWVRANDTWSFESERYFGKKGLEIQE
KRLVTLLPKEVGHSTYQYVHPASVQRKPSHCLQVLSILRDTQVPLFIVLLSFLGVCFIASPSFTPCL
VSPLKF*

Cun5155

MANESLTTTQLFIPDVLRSWPWPRQINPHYAICKAESDTWAQSFNAFSMKAQQAFLRCDFDLLAS
LGCPRLDKEGCRICCDLMLFFVFDEHSDIVDTTVRRQADSIMAAIRDPTRRPEGEWIGGEISRQF
WANAMRVSTPTFQRRFIVAFQEYTDVVQQAALDRDRHNIPNIEQYFNVRRTIGVKPSVAMLEIQF

DIPNEVSNHPAISTLRSTCVDMIAIGNDLFSYNVEQALGDDEHNLITVVMHEHECSLTDALWISDL
HDSIANTFLSVMKTVPSFGDLVIDEQVAIYVDGLGNWVRANEAWSFESERYFGKNGLEIQESRVV
DLLPKQEN*

Cun3817

MVMYKRNATFNDGPVTQIQDIPSISSLFFTMNVNQLRPFPSRFVLRDLTAVTEPVFKLRTNPHQEE
AYRNIERWFKDLKVYPEPKQRKFLSHAFDLYAGLSFPDADVEHLET CIAFFLWAFSFDLSDGEF
QSKPDRVQVGVDISMEVLNHPPELPPPKFKYAAMLHDVWRRFRSTASPGACNRFKKAVESWMKS
QVEQAANRSWNTVPSVDEFILLRRRTIGGEIVEAMVEYSLDIKIPEYVWDHPVLVGLSRAAIDMT
WPNDLCSFNKEQADNDFQNLVFCVMLERNVDLQSALDIVTKMLATRVDDYAKFKAQLPSFGAE
VDQELAAAYFKALEHYVQGTVVWYYESPRYFRGMDVTDKTDMPVYVYRSADAPTSPSVSTRVSY
LSNRSMPPRSSKASV*

Cun0773

MVAHTFSLPDDFAKTPYQSRLHPLTGIVVQKSQEWVLRKVNDEKERT AFLKTSGGLLCGYCYPN
ADAFHIQVCADWMDWVFLDDWSDKCSVAEAQSVINSIKEYPRYPHEHSGSTPIELAKNLYDRF
FQTAAPGCAKRFVRSMDIYLDGVVEQADCREKGSILDTESY TILRRKTSGVWPCFALIEFAARIDL
DAVVEHPLIRSMEEATNDWISWTNDILSYSKEQADKDAHNLIAVIMNQYTLDLQSAVDLAGSHCF
DCITKFEDNRKALPSWGEEIDREVDLYVQGLQDWIIGSLHWSFACRRYFGAEGKEIKEHRTVFLS
EKHQS*

Cun0716

MSRFNADSFVLPDLVSHCTYPLNLNTNWHSVSRASEQFVLEEANFSEMKRGVFMGLKAGELTS
CYPYCD AFHLQVAADFLGYLFTLDDWSDDFDELGTKGLAVCVMNALRDPHGFQTDKPAGILAK
DFFSRYISKGGPGCIRRFIDTMDLFFIAVERQAIDRRNGVVPELEAYIPVRRDTS GCKPCFALIEFAA
DIDL PDEVVEHPTIAALEEATNDLITWSNDIFSFNVEQSRGDTHNMIIAMRERGLDLQDAVDFVG
ELCKQSIDRFEHDRLTVPSWGPEIDRDVRTYIQGLQDWIWGSLHWSFDTRYFGQDGTVEVKLHRQI
KLLPRKGPCSD*

Tabelle 9-2: Nukleotidsequenzen der STS aus *Cerrena unicolor*

>sts_Cun_3157

ATGTCGTCCAACGCAGTCTCTTTACGCTCCCGGATCTCCTCGCTATTTGCCCTCTACAGGGAC
 GTACCAACCCTCACTATGAAGCCGCTGCCGCCGAGTCCTCTGCCTGGGTACTIONCAGCTTCAACG
 TCTTCAGCAACAGGAAGCAGGATTTCTTTGTGTCTGGTGGAAAGCGAACTCTTGTGCTCTCATG
 CATATCCTTACGCTGGACATGAAGAACTTCGTACCTGCTGCGACTTCGTCAACTTGCTTTTCAC
 CGTTGACGAGATTAGCGACGAGCAGAACGGCCAGGATGCCTACAAAACCGGCTTAGTTCTAC
 TCAAGTCTCTTCGTGATCCCGAATAACAATGACGGATCTGTATTGTGTACTATGACCAAACAGT
 TCCAGGAACGGTTGTTCCCTAGGATGGGTCCGGCCTGCTACCGCCGCTTCGTGATCACGTGCG
 AGAACTACATCAACGCCTTCGTTAAGGAAGCGGAGTACAGAGAGAAAAATGTCGTCTTAGAC
 ATGGCCTCTTACGAGATCTTGCAGCGGAGAATAGCGCAGTCCGATGCTGCTTCGGACTATTC
 GGATATGTTCTAGGACTTGATCTCCCGACGAGATCTTTGAGCATCCCGACATGATGGCTATG
 CATCTCGCCGCTGTGATATGGTATGTTGGTCTAACGACATTTATTCTACAATATGGAGCAA
 GCTATGGGGCATAACCACTAACAAATAATGACCGTCTCATGAAGGCGAAAAATGTAGACCT
 TCAGGGGGCCCGCCACTATGTTGGAGAGTATTTCAAAGTGCTTATGGATCGCTTCTTTGACCA
 CAAGTCCAACTTCTTTTTTCGGCCCTGATATGGACCCTACCGCCGAGCAATTTGTCATGGCG
 ATGGAAGCTGGATTGTGCGGAATTTAGCATGGAGTTTTGAAACCCTGCGCTATTTGCGGGGAG
 AAGAGGGAACAGGTGAAGGTGACCTTAGTCGTAGAGTTAGCTTCCAAGAAGGTTTGA

>sts_Cun_7050

ATGCAATCTGCCACCGCTCCTGTGCTTTCGTACACAACCCTCCAAGGTCGTAATCCCTGACCTTG
 TCTCACATTGCGATTTACCCCTCCGATGCAATAGTCACCAAGAGCGTGCCAGCGCGGAATGCA
 AGGAATGGCTCTTCCAAGGTAGCAATCTCAGCGAGAGGAAGCAGAATGCTTTCCATGGTCTC
 AAAGCGGGTCTCCTCACATCTTGGTGTTACCCTGACCGCGAGTATCATCACCTCCGAGTTTGCT
 GCGATTTTATGAATGGCTGTTTACCTGCACAACATCTCAGACGATATGAATGAGAATGGCA
 CGTCACGTACTGTGGATATCATGAATACGCTCTATCACCCGTAATCTACTCTCTCTGTGTC
 GCCAGAGGGCAAATTGACCCAAGACTTTTGGCGCCGGTTAATCCCTACTGCCTCGCCCGGCTC
 ACAGCAGCGTTTCATGGAAACAATGGATTTCTTTTTCCAGGCCGTGACCCAGCAGGCTCTGGA
 CCGGGCGAATGGTGTGTTCCAGATCTTGATTTCGTACATTGCTTTGCGACGCGATAACAAGCGG
 TTGCAAACCATGCTGGGCACTCATTGAGTTTCGCTACAATCTTGACCTCCCAACGAAGTGAT
 GGAGCACCTACCATCGTGGCTTTGGGCGAGGCCACAAATGACCTTGTAAACGTGGTTCGAATG
 ATATCTTCTTACAATGTGGAACAATCGAAGGGTGACACCCACAACATGATTGTGTCATGA
 TGCGACAAGAGGGCCTCGACCTTCAAAGTGCCGTTGATTTTGTGGCGATCTATGCAAGCAGT
 CGATCGACCGATTCAATTGAACAGCGTGCTCACCTTCTTCTGGGGTCCAGATATTGATCAAC
 AGGTTGAGAAATACGTTGGGGGTTTGGCCGACTGGATCGTGGGCAGTCTTACTGGTCTTTCG
 AGTCGGAACGTTATTTGCGGAAGTCAGGACTGGACGTGAAGAAAACGCGCGTTGTAGAGCTT
 CTGCCTCGCCGTGCCTAA

>sts_Cun_3574

ATGTCTCCCAAACGCTTTGTCTTCCCAGACCTCGTCTCCCCTGACCCTTACCAACTTCGCATCC
 ACCCCGACTGCGATACCGTCAACAAAACGTCGGAAGAATGGATCATGAAAGACATCACGTTT
 ACTCCTGACCGGCTGAAGAGATTCCTTGACATTAAGCCGGGGTTCTACTGCCTACTGCTAT
 TGTGACGCAGATCTTCCGCCTTCAGGCGTCTTCAGATTACTTGACGTGGCTATTTTGCCTTG
 ACGATTGGACAGACGAGTTCGACGAGGACGAGTCTTGCTCATTCAAGGACTGCATCCTGGGT
 GTCTTAGAGATCCTTACGGGTACAAGACAGACAAGATCGCTGGTTCGTTGATCGCAGACTTTT
 TCCGTGATTCCTTACAGACAAGTGGCCCGCATTGCGCCAGCGTTTCATCGACACGATGGACC
 TGTACCTTGATTCCGTCGGAAGGCAAGCCGCTGACCGAATAGAAGAACGTACTIONCAGATCTG
 GAGTCGTACATCGCTTGCCTGCGATACACGCGCATGCAAACTTGCTTCGCTTTAATGGAA
 TTCGCGAACGGTCTCGATCTCCCTGACGAAGTCTCTGAGCATCCTCTTATCCGCGAGATGGAG
 GATGCCACCAACGATCTCGTTTCGTGGTTCGAACGACATCTTCTTACGACAAGGAGCATCTG
 ATCGAGGATAACATAACATTGTTGCCGTCATTATGGAAGACAAGAAGCTCAACTTGACAGAG
 CGCCGTGGACTACGCAGGTGACCTCTGTAACAACGATCGCTCGTTTCGACGAGGCTCGCAA
 GCAGTTGCCGTCATGGGGTCCCGAGATTGACCGTGAGGTCCAACCTTACGGTCAAGGCTTGA
 AGACTGGATTGTTGGCTCATTGCATTGGAGCTTTGTCTCCAAGCGATACTIONTGGTCTTGAAGG
 AGAAGCTATCAAGAAGCACCCGACCATCGAGCTGACGCTGCGATGAAGTCAGATGTGGAGG
 CCTAA

>sts_Cun_3158

ATGCCCCGCCCTTACGAGAACTTTCAAACCTCCCGACCTACTCTCCATGTGCCAGTAAAGGGC
TCGACTAATCCGCATTACGAGAAAGCTGCTGCCGAATCCTCTGCGTGGATCAATTCATAACAAT
CTTTTTACCGATCAAAAACGTGCCTTCTTCATCCAAGGCAGCAATGAGTTGCTTGTGTCCCATA
CTTATCCATACGCGGATTATGAGCAATTCAGAACCTGCTGTGATTTTCGTC AACCTACTGTTTGT
CGTTGACGAGGTCAGTGATGACCAGAGTGGTTCGTGATGCTCGTGCCACGGGAAACGTCTTCT
GCAGGTCAATGAGACACGATGATTGGGACAATGGTTCTCCGCTAGCCCAAATGACCAAGGAAT
TCAAAGCCCGTTTTTCGTAAATTTGCCGGCCCGGGCTGCTATGCACGCTTCTTAGTCCACTGCGA
GAACTATATCAATGCAGTCGGCCATGAGGCAGAGTATAGAGAGAGGGGTTACGTTCTTGACA
TGGAGTCATACGAGACTCTACGTCGGGAGAACAGTGCAATCCGACTCTGTTTTCGGATTGTTTG
AGTTTGTGTTTGGGCGTCGACCTTCCCGATGAGGTTTTTCGACGACCCGGCGTTCTTGAACCTATA
CTGGGCAGCCGCTGATATGGTTTTGTTGGTCCAATGATGTCTATTTCATAACAACATGGAACAAGC
CAAAGGTCATAGTGGGAATAATATCCTAACCGTCTTGATGCAGGCGAAGAACATTGACCTAC
AGACCGCTTCTGATCTTGTGTTGGTACTTTCGCGGAGTTGATGCGTCGCTTCTTGGAAAGGGA
AGCGCGCCCTTCTAGTTGGGGATTAGCCACTGATACCGCTGTCCGCGCATACTTAAGGCAT
TGGAGCACTGGGTTAAAGGGAACCTGGTCTGGAGTTTCGAAACACAGAGGTACTTTGGTCTTA
AACACGAGGAGATCAAGAAGACACTTCTGTGGTCTTACGTGCCCCGAGTTTTGATTGA

>sts_Cun_5765

ATGAAGCACTGGCCCTTTTCTAGCGAGAAGAAACGCGCCCGTATCCCATTCATGAATCTAGCC
GGCTTACGTACCTGGTGTGCTCCGGCATCCGACTTCGACCGTATGGTCTGGGGCGCGCGCATT
GCTGGAATCTTCTTCCCTGCCGATGACTATATCGACAGTGGAAGATGCTTGATCGTATTCTGT
GTTTCAAGAAAGCCGCCACTGGCGAGGGCCCTCTTACCCTGAAGACAGGGGCTGAAATCTGTG
ACGACATTGTCTTCCGGGCCATTAAGAGACATCTCACCCACGTACCTTCCGTCAACTAACC
AATGCACACACGAATGGTGGGACTCCAACATCCACGAGCCATTCCGTAATCTCGATCAGTATT
TAGCCACTCGCCGTGTTAACATTGCTATGATTTTTGCAAATGCTTACTTCCGATACTGTCTTGA
TATAA ACTTGACTGATGAACAAGTCAACAACCCTCTCATGCGAGAGGGCGGAGGGTATCATCTC
AGACCATGTCCGGCCTACCAATGATCTATTCTCATAACGCTAAGGAATACCTGACTCAGTCCGA
TGACACAAATGTTCTTTCGAATGTTGCAAGACTTTGAAGGGCTGACCTACGAACAAGCCAAGG
ACACCGTCATCAAGAAGATTCGTCAGAAGGAACAGGACTTCATCCCAGCTGGTCTCGCTGTAC
TCAATGACCTGAACTTGGAAAAGATCCCGAAGTTCATCGTTGGATTGCTAACCTTCCCTACT
GTATGGGAGGCAACAATGCTTGGTCCCAGGAGGTATGA

>sts_Cun_0759

ATGGCCCGCTCAACATTCGCCCTCCCTGATCTCGTATCACATTGTCCATACCCTCTGCGCATCA
ATCCTCTGTGCGACATCGTCACTCAAAAAGTCCGAAGAGTGGATTCTTAATGAGGCCAAATACA
CCCCAGAGAAGCGGACAAGATTCTTAAATACGAAAGCCGGTATACTCACTGCTTACTGTCTACC
CCGACGCCGACGACTTCCACCTACAAGTGTCTTCTGATTATTTGACTTGGTTGTTCTGTTTCGA
CGACTGGTCGGATGAATTTGACGAAACAGACGCTTGTTCCTTTGCGGATTGTATCATGGGATG
TCTTCGAGACCCTTACGGATTCAAACCGGACAAAGCGGCTGGGCGACTACTAAGAGTTATTT
GTATCTCAAGTCAAGTAGCTCAACAGGCCGCTGACAGAGACGATGGCCGCTACTCCAGACCTCG
AGACCTACATCGGCCCTCCGACAGAGACACCAGTGCATGCCGTCCGTGCTTCGCGCTGATGGAGT
TTGTTGCCGGTATTGACCTTCCGGACGAGGTCGCCGAGCACCCTCTCATCCGCTCAATGGAAG
ACGCTACTAACGACCTGGTTTTCGTGGTCAAATGATATTTTTCTCATAACAACAAGAACAGTCTC
GGGAGATAACACAAATCTTGTGCGGGTCATCATGGAAGAACGGAAATTGGATTTGCAGTCG
GCGATGGACTTCGCTGGTGAACATATGCCATCAAAGTATCAGCAAATTCGAAGCCGATCGTCGA
TCTTTACCTTCTTGGGGTAAAGAGATTGATCGAGACGTCCAACCTTTACGTCCAAGGTCTCCAA
GATTGGATCGTCGGCTCGTTGCATTGGAGCTTTGCCACGAAGCGGTATTTCCGAACGGAAGGC
GAAGCCGTCAAGCACCACCGCACGATCCAGTTACTGCCGAGGAAGGACGGCGTCGAGCGTAA
AGACACCGTCGTCCGACAGAACGTTATCGTGTACCTTTTTAATATGTTTTTACAGTACTTGTG
GGATCGCTATTTGGCAATATGAAAGGTTTTGAGTTCGCCGTTGCGCGTTCCAAGACCTTGA

>sts_Cun_9106

ATGTCCACTGAGTCTCCGCATCATCCGAGTTTTACATTCCAGATACGCTGCGCAACTGGCCA
TGGTCCC GCCATCTCAACCCCATATGCCATCTGCAAGGCAGAGTCTGCTGCATGGTGTGAA
TCGTTCAACGCCTTTAGCCCAAAGGCACAACGAGCCTTCAATCGTTGCGACTTTAATCTTCTCG
CTTCGTTAGCTTTCCCTGCTTGATAAAGATGGATGTCGTATCGGCTGTGACCTGATGAACCT
TTTTTTCGTGTTTCGACGAATACTCCGATGTGGCGGATGCCACAGAGGTAAGAAGACAAGCCGA
TATTATTATGGATGCACTCCGCAATTCTACTCGTCTCCGCTCCCAAAGGGGAGTGGGTCCGGCG
AGAAGTTGCCAAACAGTTCTGGGAGAATGCTATCCGAACGACTACCGAAACTGCGCAACGTC

GTTTCATTGACACTTTCCAACCTCTATACAGACTCTGTTGTTTCAGCAGGCAGCGGATCGCGACG
ACTCTCGAATCCGCAGTGTGATCACTACTTCGAACTCCGCCGTGACACTATCGGGGCCAAGC
CATCGTTTGGCATCCTCGAGGTTAAGATGGATATTCCCAGCAAGTCATGAACCATCCCAGCA
TTGTCAAACCTCACGTCCGTATGTATTGACATGTTAATCATCGGTAACGATCTGTGTTCTTACAA
CGTAGAGCAAGCTCGCGGGGACGATGGCCACAACCTGGTGACAATTGTTATGCATGAGCGCA
AATGCGACCTGACCAGGGCTCTGGAATGGATCTCGGATTTACATGATCGTCTTGCAGATGGGT
TCCTCTCTACCCTAGAGGAGGTGCCCTCCTTTGAAAACCTCCGTTCTCGACAAACAAGTCTCGA
CCTATGTTCGATGGCCTCGGAAATTGGGTCCGAGCTAATGATACATGGAGCTTCGAGAGCGAG
AGATACTTCGGTAAGAAAGGTCTGGAGATCCAAGAGAAGAGACTCGTTACTCTTCTGCCGAA
GGAGGTCGGCCATTCCACCTATCAATACGTCCACCCCGCCTCTGTCCAAAGAAAGCCGTCTTC
ACACTGCCTGCAAGTACTGTCAATTCTGCGCGACACCCAAGTTCCGTTGTTTATTGTTCTATTG
AGTTTCCTCGGTGTCTGCTTCATCGCCTCTCCTTCTTTCACACCCTGTCTAGTGTCCCTTTGAA
GTTTTGA

>sts_Cun_5155

ATGGCGAATGAATCACTAACAACCTACTCAGCTGTTTCATCCCAGACGTGCTCCGCAGCTGGCCA
TGGCCACGCCAGATTAATCCTCATTACGCCATTTGTAAAGCTGAGTCGGATACGTGGGCTCAG
TCGTTCAACGCGTTCAGTATGAAAGCACAACAGGCCCTTCCTTCGATGCGATTTTGATCTGCTG
GCTTCATTAGGTTGCCCCAGGCTCGACAAGGAGGGGTGTCTGATATGTTGCGACTTGATGCAG
CTTTTTTTCATCTTCGATGAGCACTCTGACATAGTGGACACCACCGTGGTGCGCAGACAGGCC
GACAGCATCATGGCTGCTATTTCGCGATCCTACCCGTCCCAGACCCGAGGGTGAATGGATCGGA
GGGGAGATTTCCAGACAATTTTGGGCAAATGCTATGAGGGTCTCTACTCCAACCTTTCCAACGC
CGTTTCATCGTCGTTTTCAAGAATACACCGACTCCGTTGTTCAACAAGCATTAGATCGCGAC
CGTCAACAACATTCCAAACATTGAACAGTACTTCAATGTTTCGTCGAGATACCATTGGAGTAAAA
CCCTCGGTGGCTATGCTTGAAATTCAATTTGACATTCCTAATGAGGTCAGCAATCACCCGCC
ATAAGTACGTTGCGGTCTACATGTGTTCGATATGATCGCAATTGGGAACGACTTGTTTTCATA
AACGTAGAACAAGCTCTCGGTGATGACGAGCACAACCTGATCACTGTCGTTATGCATGAACA
CGAGTGCAGTCTTACTGACGCCTTGGAAATGGATCTCGGATCTCCATGACAGTATTGCAAATAC
CTTCTCTCCGTTATGAAGACAGTTCCCTCCTTTGGAGACCTCGTCATCGATGAACAGGTTGCT
ATCTACGTAGATGGCCTCGGAAATTGGGTAGAGCCAACGAGGCTTGGAGTTTTGAGAGCGA
GAGATATTTTCGGGAAGAACGGTCTTGAGATTCAAGAGAGCAGAGTTGTTGACCTCTTGCCGA
AGCAAGAGAATTGA

>sts_Cun_6114

ATGGTTCGTCACTCGTTTTACATCCCTGATCTTATTGCACTATGCGGACCCAGTTTTGAGCTCC
AAGCGAATGCCCGTTGTTCGGCAGATCTCTGAGGCGTTGCTCTCGTGGACGTCGAGTGCGGGAT
TCCTAACCAAAGCAGAAATGGATTCTCTCCGGGCTTACAATTATCATTGCTAGCATCCCTAT
GCTACCCAAGTAGCGACTGGACACAACCTGCTTCTGATTTCAAATATCTGACCCTTCTTTTCCA
CTGGTCGAACAAATTCGAACCAATGAGCGCATCCGCGTTTGGAGTGTGTTGGGGTACAGTTATC
TCGAGAAACAACCTGCGAATGGCAGAGACGCTTCGAAACCAATCTAGAAGCCTTTTCGGCGTG
CTCGTATCGATCAAGATAGTTCTCGACCACTCGGGGACATCAAGGACTACCATAGACTGAGCC
GAAGCTATTCTGGTATCTCGACGCTGTTTCGATTTAGTTCGAATATGCAACTGGCTTGCGGATAC
CACCAAAAGTTCACAGGTCTCAAGAAATTCAGTTACTCAAAGAACACGCCCATGATATCATTG
TTTTCGCCAAGGATATAATCGCTCACAACCTATCAGCAATCCCGTGGCTGCCATTGTAATTTGGT
CTCTGCCATCATTGAGGAGCGTCAATGTACATTGCAGAGTGCTATTGATGTGCGCCGAAGTAAT
GTTCAAGGATGCCGTTGTAATAATTCCTCGCTGCCGAACATGAGATCCCTTCATGGAGCGTAGA
AATAGACGAAGAGGTTGGACGATACGTGCAAGGACTGCGAGAATGCATCATTGGATTCAATC
ATTGGCTTTACGAGACCGACAGATACTTTGGTGATAAGAAGGGGGATGTAAGAGAGTTTGA
TGGGTATTCTTGTACCAAAGAAACATCGTAA

>sts_Cun_3817

ATGGTCATGTATAAAAGGAATGCCACCTTCAACGATGGTCCAGTCACTCAAATACAGGATATC
CCTTCTATCTCTTCTGTTCTTTCACGATGAACGTCAATCAACTCAGGCCATTTCCCTCTAGATT
CGTTCTACGAGATCTCACCGCGTTACTGAGCCCGTTTTCAAACCTCAGGACTAATCCCCACCA
GGAAGAAGCCTATCGCAACATTGAGCGATGGTTCAAAGACCTGAAAGTCTACCCAGAGCCGA
AACAGAGGAAATTTGTGCGCATGCCTTCGACCTCTACGCAGGGCTCAGTTTCCCAGACGCAG
ATGTGGAGCACCTAGAAACGTGCATTGCCTTCTTCTGTGGCATTCTCGTTCGATGATCTCTC
GGACGAGGGGGAGTTCCAATCGAAACCGGACCGAGTACAAGTCGGTGTGACATCTCTATGG
AAGTATTGAACCACCCAGAATTGCCCCACCAAAGTTCAAATACGCCGCCATGCTTCACGATG
TCTGGAGACGCTTCAGGTCGACAGCTAGCCCCGGCGCGTGTAAACAGATTCAAGAAAGCCGTC

GAGAGCTGGATGAAATCTCAAGTGGAAACAGGCGGCAAACAGATCGTGGAATACCGTCCCCTC
TGTTGACGAGTTCATCCTCCTGCGCAGACGTAATATCGGAGGTGAAATTGTAGAAGCCATGGT
TGAATATTCTTTGGACATCAAGATTCCCGAGTACGTGTGGGATCATCCTGTACTCGTGGGGCT
CTCTCGCGCCGCAATCGATATCATGACATGGCCGAATGACCTTTGCTCCTTCAACAAAGAACA
AGCGGACAATGATTTCCAAAACCTTGTCTTCTGTGTATGCTTGAGCGCAATGTGGACCTGCA
AAGTGCATTGGATATTGTCACAAAGATGCTAGCCACACGTGTGGACGACTATGCCAAATTTCAA
AGCTCAGCTGCCATCGTTTGGAGCAGAGGTGGATCAGGAGCTCGCAGCGTATTTCAAGGCAAT
AGAACATTACGTTCAAGGCACCGTTGTGTGGTACTACGAGTCACCTAGATACTTCCGTGGCAT
GGACGTCACCGACAAGACGGACATGGTTATTCCAGTCTATTCTCGCTCGGCAGATGCACCAAC
TTCCCAAGCGTATCCACCAGGGTATCTTATCTGTGCAATCGCTCTATGCCACCTAGATCGAGT
AAGGCGAGCGTGTA

>sts_Cun_0773

ATGGTGGCCACACCTTTTCCCTCCCAGATTTCTTTGCAAAAACCTCCCTATCAGTCCCCTCTCC
ATCCGCTGACCGGTATTGTTGTGCAAAAGAGCCAGGAATGGGTCTGCGTAAAGTCAACTAC
GACGAGAAAGAGCGAACAGCCTTCTTGAAGACCAGTGGTGGTCTTCTGTGGTACTGCTAC
CCGAACGCTGACGCGTTTCATATTCAAGTCTGCGCTGACTGGATGGATTGGGTCTTTTGTCTGG
ATGATTGGTCCGACAAATGTAGTGTGCGAGAGGCGCAGTCCGTGATAAACTCCATTAAGGAAT
ACCCGCGATACCCTCATGAACATTCGGGTAGTACACCTATTATTGAGTTGGCTAAGAATCTAT
ACGACCGATTCTTTCAAACGGCTGCGCCTGGCTGTGCCAAGAGATTCTGTTTCGATCAATGGACA
TATATTTGGATGGAGTTGTGGAGCAGGCGGATTGCAGAGAGAAGGGTTCAATCCTCGACACG
GAAAGCTATACCATCTTACGCCGCAAGACGAGTGGAGTATGGCCCTGTTTGTCTGATTGAG
TTTGCGGCAAGGATAGATCTACCGGATGCGGTTGTTGAGCACCTCTCATCCGTTTCGATGGAG
GAAGCTACAAATGATTGGATATCTTGGACGAATGATATTCTTTTCGTACAGCAAGGAACAAGC
AGATAAAGATGCTCACAACCTCATTGCGGTATAATGAATCAATACACCTCGACCTACAGTC
CGCCGTGGATCTTGGGGTAGCCACTGCTTCGACTGTATCACCAAATTCGAGGACAATCGGAA
AGCTCTCCCTTCTTGGGGTGAAGAGATCGATAGAGAGGTCGATCTATATGTGCAAGGCCTGCA
AGACTGGATCATTGGGTGCTTGCAGTGGAGTTTGTCTTGGCGACGATATTTCCGGCGCCGAAGG
AAAGGAGATCAAGGAACATCGTACTGTTTTTCTTCTTTCAGAAAAACACCAATCGTAA

>sts_Cun_0716

ATGTCCTCGTTTCAATGCAGACTCCTTTGTCCTCCCTGACTTGGTGTCCCATTGTACCTATCCTCT
TAATCTTAACACTAACTGGCATTCTGTCTCACGTGCATCCGAGCAATTCGTCTTGAAGAAGC
TAATTTTTTCGGAGATGAAACGTGGGGTATTCATGGGACTGAAGGCTGGTGAACCTCACTTCTGC
GTGCTACCCTTACTGCGATGCGTTTCATCTTCAAGTCGCAGCGGACTTCTTGGGCTATCTTTTC
ACCTTGGATGATTGGTCCGACGACTTTGACGAGCTTGGCACCAAAGGTCTCGCCGATGTGTT
ATGAATGCTTTAAGAGACCCACACGGATTTCAAACAGACAAACCGGCAGGTATATTGGCAAA
AGATTTCTTCTCTCGCTACATCAGCAAGGGCGGCCAGGGTGTATCAGACGTTTCATCGACAC
GATGGACCTTTTCTTATAGCCGTGGAGAGGCAAGCAATCGATCGCCGTAACGGCGCTCGTCCC
TGAGCTCGAAGCCTACATTCCTGTGCGTAGAGACACCAGCGGATGCAAACCTGTTTTGCTCT
GATTGAATTTGCGCCGACATTGATCTCCCCGATGAGGTTGTGAGCAGCCACTATTGCTGC
GCTAGAGGAAGCTACGAATGATTTGATTACTTGGTCAAATGACATATTCTCTTTCATATGTCGA
GCAATCTCGTGGGGACACGCACAATATGATCATCGTGGCGATGCGCGAGCGGGGTCTCGATC
TTCAGGATGCAGTGGATTTTGTGCGGAGAGCTCTGCAAAACAATCCATCGATCGATTTGAACATG
ATCGCCTCACCGTCCCGTCTGTTGGGGCCCCGAGATCGATCGGGACGTCCGAACGTACATCCAAG
GTCTCCAAGACTGGATCGTAGGCTCACTTCACTGGAGTTTCGATACAACGCGGTATTTCCGCC
AGGATGGTACAGAAGTCAAATTACACCGCCAGATCAAACTTTTACCTCGAAAAGGGCCGTGT
AGCGACTAG

>sts_Cun_7487

ATGGCCACGTAAATTCACACTATGCCATCTGCAAAAACCTGAGTCTGATGCATGGATACAGTCA
TTCAAACCTTTTCGACGCGGATGCACAAGATGCCTTTACGGGCTGCAATCCTGCCCTCCTAGCC
TCTCTAGCTTGCCTTAGGCTTGATAAAGATGGATGTCGCATGGCTTGCAGCTTGTGACCTTC
TTTTTGTGTTTCGAGGAACACTCCGACGTAGCAGATGCTACAGTAGTACGACGACAGGCCAACA
GTATAATGGATGCTCTCGGCAATCCTACTCGCCCTCGTCTTGTGGGGAATGGGTCTGGTGGAG
AGATGGCTGAACAATTCTGGAAAAATGCTATGGTCTTCTTCTCGTCCACATCTCAGCGCCGCT
TCGTCAATGCTTCCCAGGAATACACTGATTCCGTTGTTTCAGCAAGCATTAGATCGTGACCATC
ACATCATTGCAAGCATTGACCAGTATTTTCGAGATTTCGTGACGTCAGGTTGGGGTGTGCCCCG
TGTTGGCTGTCTCCTGATTCATTCGAAATCCCTGACGAGGCTATGAGTCACCCGGGAATCG
TAGCTCTTGAAGTCTGCATGTGTCGACATGATTCTAATCTGTAACGACTTGCTTTCTTACATTGT

CGAGCAAGCTCGTGGCGACGACGAACATAACCTAATCACGGTCGTGATGCGCGAACGCAAGT
GCGGTCTTGCTAGTGCAGTAGAATGGATTGTGAACCCCATGATAATATTGTCAACACCTTTC
TCTCGACCATCAATACAATCCCTTCCCTTGGTGTATCTATTGTGGACGAAAATATTTCAATCTA
TATAGATGGTCTCGGGACCTGGGTTAGGGCCAACGAGGCTTGGAGCTTCGAGAGTGCAGAT
ACTTTGGAAGGAAAGGTCTTAAAATCAAAGAAAGTAGAATTATCGACCTATTGCCAAAACAC
AATATTGGACCCCTCTCCGCACATGCGGTGATTAA

>sts_Cun_0802

ATGGCCACCCAGACTTACATGCAACCCGATTTCTTACCAGGTGCCCTTACAAGCTTGGTGTA
AACCTGCCACTGATCCGGTTACCCACAACACTGAACAATGGCTCTTGAAAGAAGTCGACTAT
GATGAAGAGAAGCGAGCGAGGTTCTTCAAGATCAGAGGTGGCCTTCTAGCAGGATACTGCTA
CCCGAACACCGATGCCTTCCATCTTCAGGTCGCGTCCGATTTTCATAGAATGGATATTCTACGTC
GACGACATGACAGACGGATATACCAGAACCGAGGCTGGTTCCTTGCACGATGTCATTATGGC
ATGTTTCCGGAATCCCGGAAATGCGAGGAGAATCTGCCCGTGTGTCGACTGGCCAAAGATTT
CTTCGCCCCGGTTCCAACAAACGGCCGGACCACGTTGTACCAAACGTTTTGTGATAGGATAGA
CCAGTTTGTGGATGGTGTGCTCACCAGGCTGGCGATAGAGATGACGATAGCATCCCTGACCT
GCAAACCTTACATCGCATTGCGTCGAGATAACCAGTGGTATGCGTCCCTCTCTCGTTCTGGCCGA
ATTCCTGCTGGCATTGATCTCCCCGATGATGTTGCCGAACATCCTCTTCTCCGGGGCATGGA
GGATGCCACCAATGATTGGTGTCTTGGACAAACGACATTTTCTTACAATAAAGAACAGTC
GGTCGGTGACACCCACAACCTTCGTTGCCGTGCTCATGAAGGAGCGTAACCTTGACTTACAACC
CGCTATGGACCTTGCCGGTGAACCTTCCCTCGCCTGCATCACAACGTTTCGAGAACAAATCGCAA
AGCTCTCCCATCCTGGGGAAACGATATAGACCGCCAGGTTGATCTTTTTGTGCAAGGTCTGCA
GGACTGGATCATAGGATCGTTGCATTGGAGTTTCGATTCCAGGCGTTACTTTGGTTCCGAGGG
CGAGATAATGAACTCCAACGAGTGGTTCAATTAGCACCCCGTCGTAACACAAGACCTTCATC
CTCTCGTGTGCTTTGTGGTAA

Tabelle 9-3: Verwendete Primer zur Klonierung von STS aus *Cerrena unicolor*

Primer-Name	Primer-Sequenz
fwd_pCold_3157	AAAAGAGCTCATGTCTCGTCCAACGCAGTC
rev_pCold_3157	AAAAGGATCCTCAAACCTTCTTGGAAGCTAACTC
fwd_pCold_7050	AAAAGAGCTCATGCAATCTGCCACCGCTC
rev_pCold_7050	AAAAGGATCCTTAGGCACGGCGAGGC
fwd_pCold_3574	AAAAGAGCTCATGTCTCCCAAACGCTTTG
rev_pCold_3574	AAAAGGATCCTTAGGCCTCCACATCTGAC
fwd_pCold_3158	AAAAGAGCTCATGCCCGCCCTTACGAG
rev_pCold_3158	AAAAGGATCCTCAATCAAAACTCGGGGCAC
fwd_pCold_5765	AAAAGAGCTCATGAAGCACTGGCCCTTTTCTAG
rev_pCold_5765	AAAAGGATCCTCATACTCCTGGGACCAAGC
fwd_pCold_0759	AAAAGAGCTCATGGCCCGCTCAACATTCG
rev_pCold_0759	AAAAGGATCCTCAAGGTCTTGGAACGCGC
fw_pCOLD_9106	AAAAGAGCTCATGTCCACTGAGTCCTCCG
rev_pCOLD_9106	AAAAGGATCCATTCAAAACTTCAAAGGGGACACTAG
fw_pCOLD_5155	AAAAGAGCTCATGGCGAATGAATCACTAACAAC
rev_pCOLD_5155	AAAAGGATCCTCAATTCTCTTGCTTCGGCAAG
fwd_pCOLD_6114	AAAACATATGATGGTCGTCCTCGTTTTTCACATC
rev_pCOLD_6114	AAAAGGATCCTTACGATGTTTCTTTTGGTAACAAGAATACCC
fw_pCOLD_3817	AAAAGAGCTCATGGTCATGTATAAAAGGAATGCCACC
rev_pCOLD_3817	AAAAGGATCCTTACACGCTCGCCTTACTCGATCTAGG
fw_pCOLD_0773	AAAAGAGCTCATGGTGGCCACACCTTTTC
rev_pCOLD_0773	AAAAGGATCCTTACGATTGGTGTTTCTCTGAAAG
fwd_pCOLD_0716	AAAAGAGCTCATGTCTCGTTTCAATGCAGAC
rev_pCOLD_0716	AAAAGGATCCCTAGTCGCTACACGGCCC
fw_pC_7487	AAAAGAGCTCATGGCCACGTAAATTCACAC
rev_pC_7487	AAAAGGATCCTTAATCACCGCATGTGCG
fw_pCOLD_0802	AAAAGAGCTCATGGCCACCCAGACTTAC
rev_pCOLD_0802	AAAAGGATCCTTACCACAAAGCAGCACG

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name Nils Püth
22.04.1993 in Coesfeld

Schulbildung

09/1999 – 06/2003 Ludgerus-Grundschule Buldern, Dülmen

08/2003 – 06/2009 Marienschule, Dülmen
Abschluss: mittlere Reife

Weiterer Werdegang

09/2009 – 07/2012 Ausbildung, Hans-Böckler-Berufskolleg, Münster
Abschluss: Chemisch-Technischer Assistent, Fachabitur

09/2012 – 09/2015 B.Sc. Molekulare Biologie, Westfälische Hochschule,
Recklinghausen
Abschluss: Bachelor of Science
Abschlussarbeit: „Vergleichende Charakterisierung
verschiedener Expressionssysteme in *Bacillus subtilis*“

10/2015 – 08/2018 M.Sc. Biochemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Abschluss: Master of Science
Abschlussarbeit: „Heterologe Expression und
Charakterisierung von Propionyl-CoA-Transferasen in
Escherichia coli bezogen auf die Polythioester-Biosynthese“

09/2018 – 12/2022 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Lebensmittel-
chemie, Leibniz Universität Hannover

seit 02/2019 Promotionsvorhaben
Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlicht wurden:

- Püth, N; Ersoy, F; Krings, U; Berger, RG. Sesquiterpene Cyclases from the Basidiomycete *Cerrena unicolor*. *Catalysts*. 2021. 11(11). 1361. <https://doi.org/10.3390/catal11111361>
- Püth, N; Ersoy, F; Berger, RG; Krings, U. Impact of Agro-Industrial Side-Streams on Sesquiterpene Production by Submerged Cultured *Cerrena unicolor*. *Foods*. 12(3). 668. <https://doi.org/10.3390/foods12030668>

Nachfolgend gelistete Posterpräsentationen sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift:

- Püth, N; Ersoy, F; Krings, U; Berger, RG. Heterologous Generation of Sesquiterpene Cyclases from *Cerrena unicolor*, Leibniz University Chemistry Symposium, 20. Juli 2022, Hannover, Deutschland
- Püth, N; Ersoy, F; Krings, U; Berger, RG. Generation of Mono- and Multiproduct Sesquiterpene Cyclases from *Cerrena unicolor*, Bioflavour 2022, 27. – 30. September 2022, Frankfurt am Main, Deutschland