

Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover zur
Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin
Sabine Langhoff

geboren am 12.8.72 in Schwerte

2002

Referent: Prof. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. P. Winterhalter

Tag der Promotion: 21.6.2002

Datum der Veröffentlichung: August 2002

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis Mai 2002 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von *Herrn Prof. Dr. R. G. Berger* angefertigt.

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

Mein besonderer Dank gilt außerdem *Herrn Dr. Holger Zorn* für zahlreiche anregende Diskussionen, viele gute Tips sowie die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ferner

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die gute Gemeinschaft, insbesondere meinen Laborkolleg(inn)en *Frau Birgit Veddel*, *Frau Manuela Scheibner* sowie *Herrn Daniel Neddermann* für das fröhliche und kameradschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Dr. Dietmar E. Breithaupt vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim für die Durchführung der LC/MS-Messungen der Apo-Carotinoide.

Herrn Dr. Manfred Nitz von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig für das Ansequenzieren der Proteine mittels ESI-MS/MS.

der *Procter & Gamble AG* für die finanzielle Unterstützung des Projektes und die Bestimmung der Aminosäuresequenzen mittels Edman-Abbau.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich durch ihre Ermutigung und Zuversicht sehr gefördert haben und auf deren Beistand ich immer zählen kann.

Nicht zuletzt danke ich *Andreas* für die emotionale Unterstützung dieses Projektes.

Zusammenfassung

Über die oxidative Spaltung von Carotinoiden ist eine Reihe potenter Aromastoffe zugänglich. In einem neuen Ansatz zur „Co-Oxidation“ wurde β,β -Carotin mit enzymatisch synthetisierter 13-Hydroperoxy-Octadecadiensäure in organischer Lösung umgesetzt. Maximale β -Ionon-Ausbeuten von 11 mol% wurden unter drastischen Reaktionsbedingungen nach 8 h erzielt.

Um einen alternativen, effektiven und schonenden biotechnologischen Zugang zur Darstellung aromarelevanter Nor-Isoprenoide zu eröffnen, wurden 51 Pilze in einem Screeningverfahren auf ihre Fähigkeit zur Transformation von β,β -Carotin untersucht. *Hypomyces odoratus*, *Ganoderma applanatum*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Trametes suaveolens* bildeten in Submerskultur Dihydroactinidiolid als Hauptprodukt des Carotinoid-Abbaus. Bei Einsatz Exoenzym-haltiger zellfreier Kulturüberstände der Basidiomyceten *Lepista irina*, *Marasmius scorodonius*, *Ischnoderma benzoinum* und *Trametes versicolor* entstanden β -Ionon sowie die Nebenprodukte Dihydroactinidiolid, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon und β -Cyclocitral.

Kinetische Untersuchungen mit Kulturüberständen von *Lepista irina* zeigten bereits nach 30 Minuten einen nahezu vollständigen β,β -Carotin-Abbau, wobei der maximale Gehalt an β -Ionon nach einer Stunde registriert wurde. Analog wurde β,ϵ -Carotin zu α - und β -Ionon gespalten.

Nach Entwicklung eines photometrischen Assays zur Messung der Enzymaktivität wurde ein Carotinoid-abbauendes Exoenzym aus Kulturüberständen von *Lepista irina* mit Hilfe chromatographischer Verfahren isoliert. Bei einem Aufreinigungsfaktor von 42 wurde ein Enzympräparat mit einer Aktivität von $281,5 \text{ mU mg}^{-1}$ erhalten, welches frei von Fremdproteinen war. Der isoelektrische Punkt wurde zu 3,75, das Molekulargewicht zu 50 kDa bestimmt; Bei einem Temperatur-Optimum von $34 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde ein pH-Optimum 3,5 bis 3,7 ermittelt. Mittels automatisiertem Edman-Abbau bzw. ESI-MS/MS-Analysen wurde das aufgereinigte Enzym ansequenziert. Datenbankrecherchen ergaben hohe Homologien zu polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii*. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals einen direkten, nicht durch Co-Oxidation vermittelten Carotinoid-Abbau durch mikrobielle Enzyme.

Schlagworte: Carotinoide, Abbau, Pilze, *Lepista irina*, Aromastoffe, Ionone

Summary

Some highly potent natural flavors are available via the oxidative cleavage of carotenoids. In a new experimental approach, β,β -carotene was incubated with enzymatically synthesised 13-hydroperoxy-octadecadienoic acid similar to a co-oxidation reaction. Maximum yields of β -ionone (11 mol%) were achieved under extreme reaction conditions. To develop an alternative, effective and gentle biotechnological method to produce carotenoid derived aroma compounds, 51 fungi were screened for their ability to transform β,β -carotene.

In submerged cultures of *Hypomyces odoratus*, *Ganoderma applanatum*, *Kuehneromyces mutabilis* and *Trametes suaveolens* dihydroactinidiolide was formed as the main degradation product. With cell free media of *Lepista irina*, *Marasmius scorodonius*, *Ischnoderma benzoinum* and *Trametes versicolor* mainly β -ionone was detected. In addition dihydroactinidiolide, 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon and β -cyclocitral were formed as by-products.

Kinetic investigations were carried out with cell free media of *Lepista irina*. As soon as 30 min after the start of the incubation more than 90 % of the initial β,β -carotene was degraded. β,ϵ -carotene was cleaved to α -ionone and β -ionone.

After development of an enzyme assay for the quantification of carotene degrading enzyme activity, the exoenzyme was isolated by means of chromatographic methods starting from the culture supernatant. An enzyme preparation with a specific activity of 281.5 mU mg⁻¹ was cleaned to homogeneity with a purification factor of 42. The isoelectric point of the enzyme was 3.75 and the molecular weight was 50 kDa. Optimal carotene cleavage occurred at a temperature of 34°C and a pH value of 3.5 to 3.7. By means of Edman degradation and ESI-MS/MS-analysis the N-terminus of the protein was sequenced. Data base searches revealed high homologies to a polyvalent peroxidase of *Pleurotus eryngii*. In this work degradation of carotenoids by microbial enzymes is described for the first time.

Key words: carotenoids, degradation, fungi, *Lepista irina*, flavors, ionone

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bisherige Kenntnisse	2
1.1.1 Nor-Isoprenoide als Aromastoffe	2
1.1.1.1 Entstehung von Nor-Isoprenoiden aus Carotinoid-Vorläufern	2
1.1.1.2 Vorkommen von Nor-Isoprenoiden in Pflanzen	4
1.1.1.3 Bedeutung und Synthese von C-13-Nor-Isoprenoiden	7
1.1.2 Enzymatischer Carotinoid-Abbau	11
1.1.2.1 Carotinoid-Dioxygenasen im Tierreich	11
1.1.2.2 Pflanzliche Carotinoid-Dioxygenasen	18
1.1.2.3 Carotinoid-abbauende Enzyme in Mikroorganismen	21
1.2 Zielsetzung	24
2 Ergebnisse	25
2.1 Co-Oxidation von β,β-Carotin	25
2.1.1 Co-Oxidation von Carotinoiden aus Karotten im System Linolsäure/ Lipoxygenase	25
2.1.2 Umsetzung von β,β -Carotin mit 13-HPOD	26
2.1.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen	27
2.1.3.1 Abhängigkeit von der Eisen(II)-Konzentration	27
2.1.3.2 Abhängigkeit von der Menge an 13-HPOD	28
2.1.3.3 Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt	29
2.1.3.4 Abhängigkeit vom Lösungsmittel	29
2.1.3.5 Co-Oxidation unter optimierten Bedingungen	30
2.1.4 Zusammenfassung	30
2.2 Screening von Mikroorganismen auf β,β-Carotin Abbau	31
2.2.1 Auswahl der Mikroorganismen	31
2.2.2 Vorscreening	35
2.2.3 Screening in Submerskultur	36
2.2.3.1 Wachstum der Mikroorganismen	37
2.2.3.2 Identifizierung der Abbauprodukte	39
2.2.4 Zellfreies Screening	39
2.2.5 Zusammenfassung	45

2.3 UNTERSUCHUNG DES CAROTINOID-ABBAUS	45
2.3.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur	45
2.3.1.1 Carotin-Abbau durch <i>Hypomyces odoratus</i>	45
2.3.1.2 Blindversuche	48
2.3.1.3 Transformation von β -Ionon durch <i>Hypomyces odoratus</i>	50
2.3.2 Umsetzungen von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien	51
2.3.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration	51
2.3.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus	52
2.3.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin	53
2.3.2.4 Untersuchung auf Apo-Carotinoide	54
2.3.2.5 Überprüfung der Analytik	55
2.3.3 Zusammenfassung	56
2.4 ENZYM-CHARAKTERISIERUNG UND -REINIGUNG	57
2.4.1 Entwicklung eines Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität	57
2.4.1.1 Überprüfung der Anwendbarkeit des Tests	58
2.4.2 Enzymcharakterisierung	59
2.4.2.1 Enzymaktivität während des Kulturverlaufes	59
2.4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums	61
2.4.2.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	62
2.4.2.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes	63
2.4.3 Enzymreinigung	65
2.4.3.1 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	65
2.4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie	67
2.4.3.3 Ionenaustauschchromatographie	68
2.4.3.4 Gelpermeationschromatographie	70
2.4.3.5 Kombinierte Aufreinigung	72
2.4.3.6 Bilanzierung der Reinigungsschritte	74
2.4.3.7 Umsetzung von β,β -Carotin mit aufgereinigtem Enzym	74
2.4.3.8 Überprüfen der Reinheit des Enzyms	75
2.4.4 Sequenzierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms	77
2.4.5 Sequenzierung eines weiteren Enzyms aus <i>Lepista irina</i>	78
2.4.6 Untersuchung von <i>Pleurotus eryngii</i>	79
2.4.7 Zusammenfassung	79

3 Diskussion	80
3.1 CO-OXIDATION VON CAROTINOIDEN	80
3.1.1 Enzyme mit der Fähigkeit zur Co-Oxidation von Tetraterpenen	80
3.1.2 Mechanismus der Co-Oxidation	81
3.1.3 Produktspektrum der Co-Oxidation	82
3.1.4 Quantifizierung der flüchtigen Nor-Carotinoide	83
3.2 SCREENING VON MIKROORGANISMEN AUF β,β-CAROTIN-ABBAU	85
3.2.1 Auswahl der Mikroorganismen für das Vorscreening	85
3.2.1.1 Carotinoid-synthetisierende Pilze	85
3.2.1.2 Carotinoid-abbauende Pilze	86
3.2.1.3 Terpenen-transformierende und –synthetisierende Pilze	87
3.2.1.4 Stämme von terpenhaltigen Substraten	87
3.2.2 Untersuchung der Produktbildung	88
3.3 UNTERSUCHUNG DES CAROTINOID-ABBAUS	89
3.3.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur	89
3.3.2 Umsetzung von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien	91
3.3.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration	92
3.3.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus	92
3.3.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin	93
3.3.2.4 Quantifizierung der gebildeten Produkte	93
3.4 DIE POLYVALENTE PEROXIDASE AUS <i>LEPISTA IRINA</i>	94
3.4.1 Bedeutung von Peroxidasen in Basidiomyceten	94
3.4.2 Reinigung und Charakterisierung der polyvalenten Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	97
3.4.3 Carotinoid-abbauende Peroxidasen	100
3.5 AUSBLICK	109
4 Experimenteller Teil	111
4.1 MATERIALIEN	111
4.1.1 Mikroorganismen	111
4.1.2 Verwendete Chemikalien	113
4.1.3 Lösungsmittel	115
4.1.4 Gase	115
4.1.5 Sonstige Hilfsmittel	116
4.2 VERSUCHE ZUR CO-OXIDATION	117

4.2.1 Co-Oxidation von Carotinoiden aus Karotten im System Linolsäure/Lipoxygenase	117
4.2.2 Versuche zum Abbau von β,β -Carotin mit 13-HPOD	117
4.2.2.1 Synthese von 13-HPOD	117
4.2.2.2 Umsetzungen von β,β -Carotin mit 13-HPOD	118
4.3 MIKROBIOLOGIE	120
4.3.1 Kulturmedien	120
4.3.2 Kulturführung	122
4.3.2.1 Stammhaltung	122
4.3.2.2 Vorscreening	122
4.3.2.3 Screening	122
4.3.2.4 Kulturführung für weitere Untersuchungen und Proteinisolierung	123
4.3.3 Bestimmung von Kulturparametern	123
4.3.3.1 pH-Wert	123
4.3.3.2 Glucose-Gehalt	123
4.3.3.3 Biotrockenmasse	123
4.3.3.4 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit	123
4.4 Screening von Mikroorganismen auf β,β-Carotin-Abbau	124
4.4.1 Hinweise zum Umgang mit Carotinoiden	124
4.4.2 Screening in Submerskultur	124
4.4.3 Zellfreies Screening	125
4.4.3.1 Herstellen einer wässrigen β,β -Carotin-Lösung	125
4.4.3.2 Umsetzung von β,β -Carotin mit zellfreiem Kulturmedium	125
4.5 UNTERSUCHUNG DES CAROTINOID-ABBAUS	126
4.5.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur	126
4.5.1.1 Carotin-Abbau durch <i>Hypomyces odoratus</i>	126
4.5.1.2 Blindversuche	126
4.5.1.3 Transformation von β -Ionon durch <i>Hypomyces odoratus</i>	126
4.5.2 Umsetzungen von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien	127
4.5.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration	127
4.5.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus	127
4.5.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin	127
4.5.2.4 Mikro-Umsatz mit aufgereinigtem Enzym	128

4.6 PRODUKTISOLIERUNG	129
4.6.1 Produktisolierung aus Kulturmedien	129
4.6.2 Produktisolierung aus Pilzmycel	129
4.7 CHROMATOGRAPHIE	130
4.7.1 Hochleistungsflüssigchromatographie	130
4.7.1.1 Carotinoid-Analytik	130
4.7.1.2 Apo-Carotinoid-Analytik	130
4.7.2 Gaschromatographie	131
4.7.2.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	131
4.7.2.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor	131
4.7.3 Fast Protein Liquid Chromatographie	132
4.7.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie	132
4.7.3.2 Ionenaustauschchromatographie	133
4.7.3.3 Gelpermeationschromatographie	133
4.8 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	134
4.9 GELELEKTROPHORESE	134
4.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	134
4.9.2 Isoelektrische Fokussierung	136
4.10 Proteinanalytik	137
4.10.1 Aktivitätsbestimmung	137
4.10.2 Bestimmung des Proteingehaltes	138
4.10.3 Enzymcharakterisierung	138
4.10.3.1 pH-Optimum	138
4.10.3.2 Temperaturoptimum	138
4.10.3.3 Isoelektrischer Punkt	138
4.10.3.4 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE	139
4.10.4 Isolierung und Reinigung des Enzyms	140
4.10.4.1 Probenvorbereitung	140
4.10.4.2 Reinigungsschritte	140
4.10.4.3 Ammoniumsulfat-Fällung	141
4.10.4.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie	141
4.10.4.5 Ionenaustauschchromatographie	141
4.10.4.6 Gelpermeationschromatographie	142

4.11 ENTSORGUNGSHINWEISE	143
4.11.1 Biologisches Material	143
4.11.2 Lösungsmittel und Chemikalien	143
5 Literatur	144

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorptions-Einheiten
bidest.	bidestilliert
BIS	Bisacrylamid
BTM	Biologische Trockenmasse
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
chem. rein.	chemisch rein
DAD	Dioden-Array-Detektor
DEAE	Diethyl-Aminoethyl
dest.	destilliert
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
et al.	und Mitarbeiter
eV	Elektronenvolt
f. Mikrobiol.	für die Mikrobiologie
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSU	Friedrich Schiller Universität
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
GPC	Gelpermeationschromatographie
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
13-HPOD	13-Hydroperoxy-Octadecadiensäure
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ISTD	innerer Standard
k.A.	keine Angabe
kDa	kilo Dalton
kU	kilo Units
Lit.	Literatur

LMW	low molecular weight
m/V	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NCED	9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RPE	Retinal Pigment Epithel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
t-BME	tert-Butylmethylether
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
UF	Ultrafiltration
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
Wag.	Wageningen

1 Einleitung

Der Bedarf an „natürlichen Aromastoffen“ hat den Ansprüchen der Verbraucher folgend stark zugenommen. Unter diesem Begriff versteht man chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, die durch physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft gewonnen werden (Aromenverordnung 1998). Die Isolierung der Aromastoffe aus natürlichen Quellen ist meist aufwendig und kann die Nachfrage nicht immer befriedigen. Daher werden für die Herstellung in den letzten Jahren vermehrt mikrobiologische und enzymatische Verfahren angewendet, während der vor einigen Jahren noch geförderte Einsatz von pflanzlichen Zellkulturen nicht die Erwartungen der Praxis erfüllt hat (Gatfield und Sommer 1993). Diese biotechnologischen Verfahren bieten gegenüber chemischen Synthesen den Vorteil Ressourcenunabhängig und zum Teil (stereo)spezifischer und selektiver zu sein.

Von großer wirtschaftlicher Relevanz sind Aromastoffe, die aus Carotinoid-Vorstufen gebildet werden. Carotinoide sind in der Natur weit verbreitet – hauptsächlich in photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen. Hier sind sie an der Photosynthese beteiligt, schützen die Pflanze vor photo-oxidativen Effekten und dienen insbesondere in Blütenblättern als Lockfarbstoff. Jährlich werden etwa 10 Millionen Tonnen Carotinoide gebildet (Britton et al. 1998). Tetraterpene sind aber nicht nur die bedeutsamsten Pflanzenpigmente, sondern kommen auch in Tieren und Mikroorganismen vor. Tiere sind nicht in der Lage Carotinoide zu biosynthetisieren, sondern sind darauf angewiesen, sie mit der pflanzlichen Nahrung aufzunehmen. Im tierischen Organismus dienen einige Carotinoide als Provitamin A. Darüber hinaus wirken sie als Radikalfänger und schützen so vor degenerativen Erkrankungen (v. D. Berg et al. 2000). Beispielsweise schreibt man ihnen eine Schutzfunktion vor Herz- und Kreislauferkrankungen sowie Krebs zu. In Mikroorganismen üben Carotinoide eine Schutzwirkung vor Photooxidation aus. Daher sind insbesondere die sogenannten „Luftkeime“ wie Bakterien der Gattung *Micrococcus*, *Corynebacterium* und *Nocardia* sowie Hefen der Gattung *Rhodotorula* pigmentiert (Schlegel 1985).

Eine Rolle als Vorläufer von Aromastoffen spielen Carotinoide in vielen Früchten und Gemüsen, wo man eine große Anzahl der sogenannten Nor-Isoprenoide gefunden hat. Unter ihnen weisen hauptsächlich die C-13-Spaltprodukte sensorisch interessante Eigenschaften auf.

Die enzymatische Nor-Isoprenoid-Bildung wird in den letzten Jahren intensiv untersucht. Carotinasen aus Pflanzen, die durch Spaltung des Kohlenstoffgerüsts zwischen C₉ und C₁₀ selektiv die aromarelevanten C-13-Verbindungen freisetzen, sind bislang nur in Anfängen charakterisiert.

1.1 Bisherige Kenntnisse

1.1.1 Nor-Isoprenoide als Aromastoffe

1.1.1.1 Entstehung von Nor-Isoprenoiden aus Carotinoid-Vorläufern

Nor-Isoprenoide sind in der Natur weit verbreitet und tragen einen wesentlichen Anteil zum Aroma vieler pflanzlicher Lebensmittel bei. Es gibt in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass es sich hierbei um Abbauprodukte von Carotinoiden handelt (Winterhalter 1996). So geht die Abnahme der Carotinoid-Konzentration in pflanzlichen Lebensmitteln während der Reife oder Fermentation mit der Zunahme der entsprechenden Nor-Isoprenoide einher (Sanderson et al. 1971; Razungles et al. 1988). Auch das Auffinden von Di-Apo-Carotinoiden, die aus dem Zentrum des Carotinoid-Gerüsts stammen, ist ein Hinweis für die Nor-Isoprenoid-Bildung aus Carotinoid-Vorstufen (Abb. 1.1) (Märki-Fischer und Euster 1988; Lutz et al. 1991). Außerdem verfügen die Nor-Carotinoide über die gleiche Stereochemie wie die Carotinoid-Precursoren (Enzell et al. 1977).

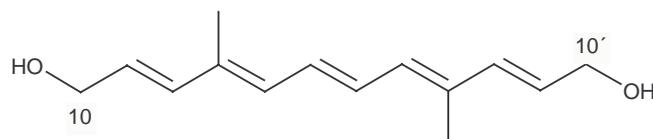


Abb. 1.1 10,10'-Diapocarotin-10,10'-diol (Rosaflluin) ein Di-Apo-Carotinoid aus Rosenblüten

Bedeutende Nor-Isoprenoide in Pflanzen sind sowohl Produkte mit 9 Kohlenstoffatomen, die durch Spaltung zwischen C₆ und C₇ des Carotinoid-Moleküles entstehen, als auch Fragmente mit 10 oder 13 Kohlenstoffatomen, die durch einen Kettenbruch zwischen Position 7 und 8 bzw. 9 und 10 gebildet werden. In der Natur wichtig sind außerdem C-15-Nor-Isoprenoide, die das Grundgerüst des Phytohormons Abscisinsäure besitzen. Einen Überblick über die möglichen Abbauege von Carotinoiden in höheren Pflanzen gibt Abbildung 1.2.

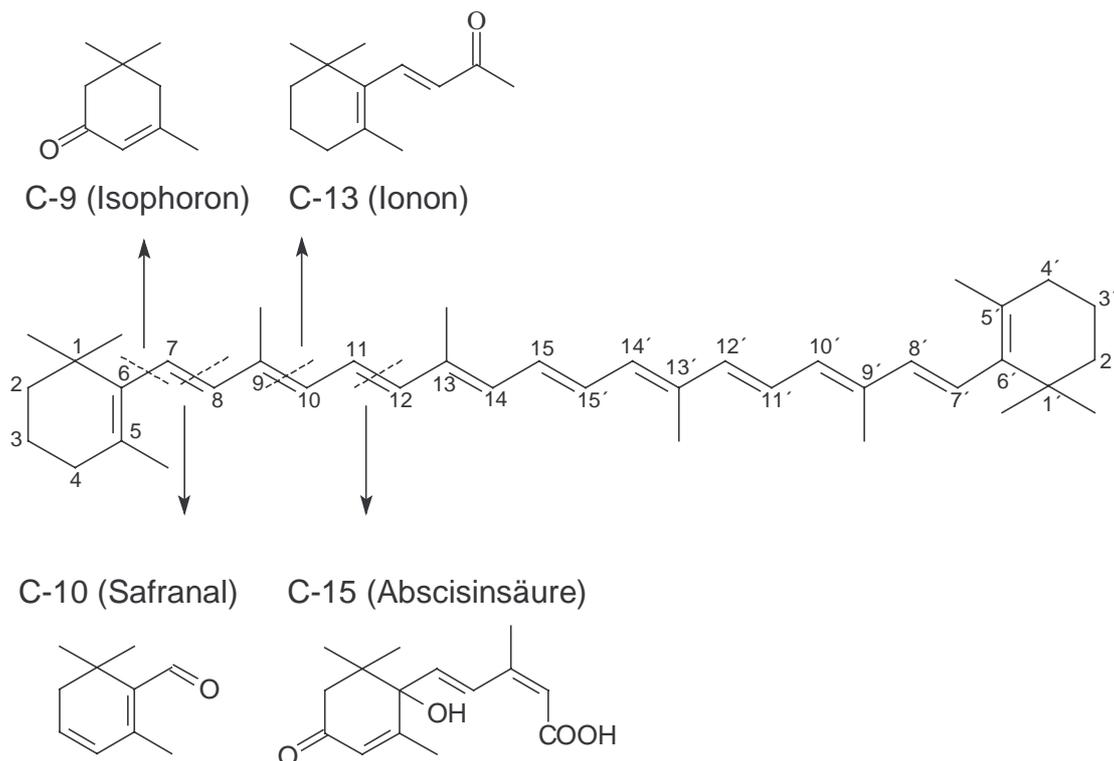


Abb. 1.2

Abbau von Carotinoiden zu C-9-, C-10-, C-13- und C-15-Nor-Isoprenoiden

Als Carotinoid-spaltende Enzyme in Pflanzen sind 11,12-Dioxygenasen beschrieben, die selektiv Epoxy-Carotinoide umsetzen und die Bildung von C-15-Nor-Isoprenoiden katalysieren. Das Vorkommen weiterer pflanzlicher Enzyme, die für die Entstehung von C-10-, C-11- oder C-13-Nor-Carotinoiden verantwortlich sind, wurde bislang lediglich postuliert (Schreier 1995).

1.1.1.2 Vorkommen von Nor-Isoprenoïden in Pflanzen

Beispiele für aromarelevante Apo-Carotinoïde finden sich in der Natur zahlreich. Dabei sind nicht nur die primären Spaltprodukte der Carotinoïde wie Ionone bedeutsam, sondern auch Sekundärprodukte, die durch Oxidation oder Umlagerung entstehen (Winterhalter 1992). Hier sind vor allem Damascenone und Damascone sowie Theaspirane, Vitispirane und Edulane zu nennen (Abb. 1.3). Die flüchtigen Carotinoid-Spaltprodukte sind hierbei oft glykosidisch gebunden und werden erst bei der Behandlung der Pflanzen durch Hydrolyse freigesetzt.

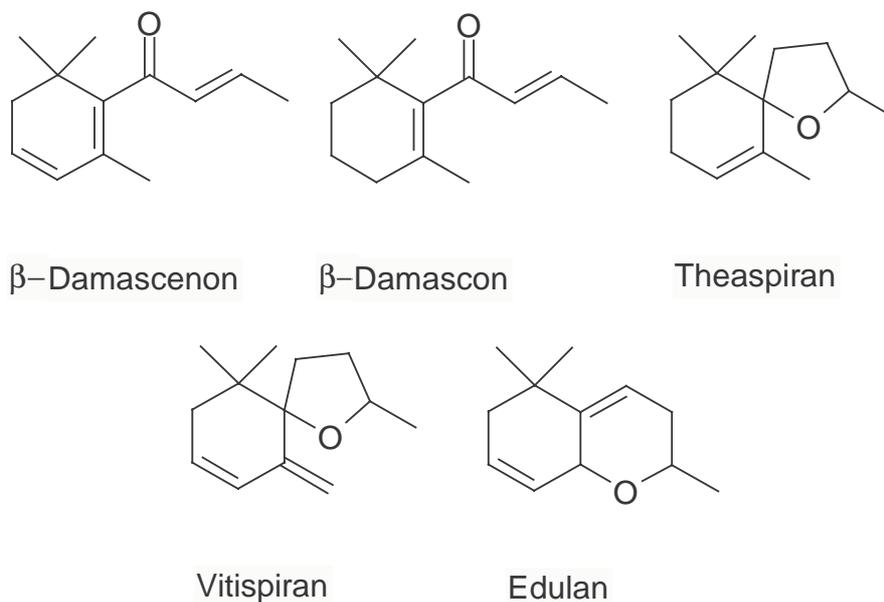


Abb. 1.3 Sekundärprodukte des Carotinoid-Abbaus

Auf diese Weise entstehen in Tee (*Camellia sinensis* L.) unter anderem α - und β -Ionon, Dihydroactinidiolid, Theaspiron und 2,2,6-Trimethylcyclohexanon-Derivate (Sanderson et al. 1971). In Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) sind die C-13-Nor-Isoprenoïde Megastigmatrienon und Damascenon sowie Dihydroactinidiolid für das Aroma mitverantwortlich (Abb. 1.4).

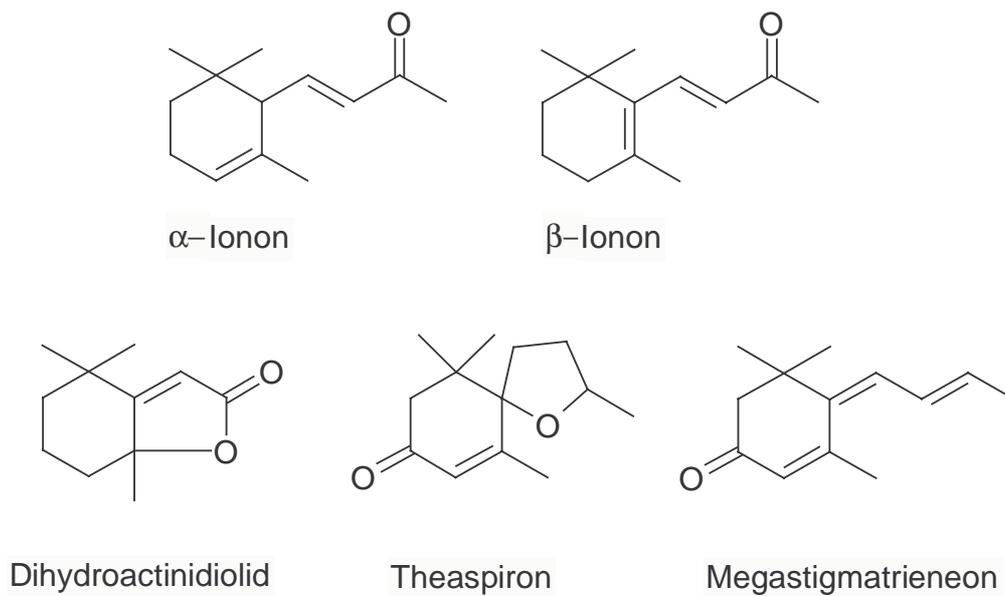


Abb. 1.4 Abbauprodukte von Carotinoiden in Tee und Tabak

Auch in Früchten spielen Carotinoid-Abkömmlinge eine bedeutende Rolle. So detektierte man in der Quitte (*Cydonia oblonga* Mill.) neben C-13-Nor-Isoprenoiden mit Ionon-Struktur und C-15-Verbindungen, die Derivate des Pflanzenhormons Abscisinsäure darstellen, auch Terpene mit 12 oder 10 Kohlenstoffatomen, die aus dem Mittelteil des Carotinoid-Gerüsts stammen (Lutz und Winterhalter 1992; Lutz et al. 1991; Winterhalter et al. 1991). Letztere fungieren als Vorstufen zu Marmelo-Lactonen und -Oxiden (Abb. 1.5), die als charakteristische Aromabestandteile der Quitte gelten (Tsyneya et al. 1980; Tsyneya et al. 1983).

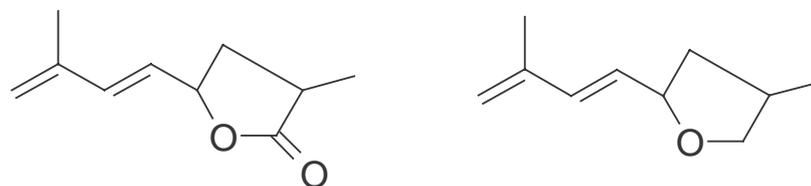


Abb. 1.5 Marmelo-Lactone und -Oxide

In Sternfrucht (*Averrhoa carambola* L.) wurden sowohl C-13-Nor-Isoprenoide wie Ionon- und Ionol-Derivate als auch C-15-Verbindungen mit Abscisinsäure-Grundgerüst nachgewiesen (Winterhalter und Schreier 1995).

In Trauben (*Vitis vinifera* L.) entstehen ebenfalls Aromastoffe durch Spaltung der Carotinoide zwischen C₉ und C₁₀. Im Wein wurden vor allem Verbindungen nachgewiesen, die durch oxidativen Abbau von Lutein, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin gebildet werden (Abb. 1.6) (Williams et al. 1992).

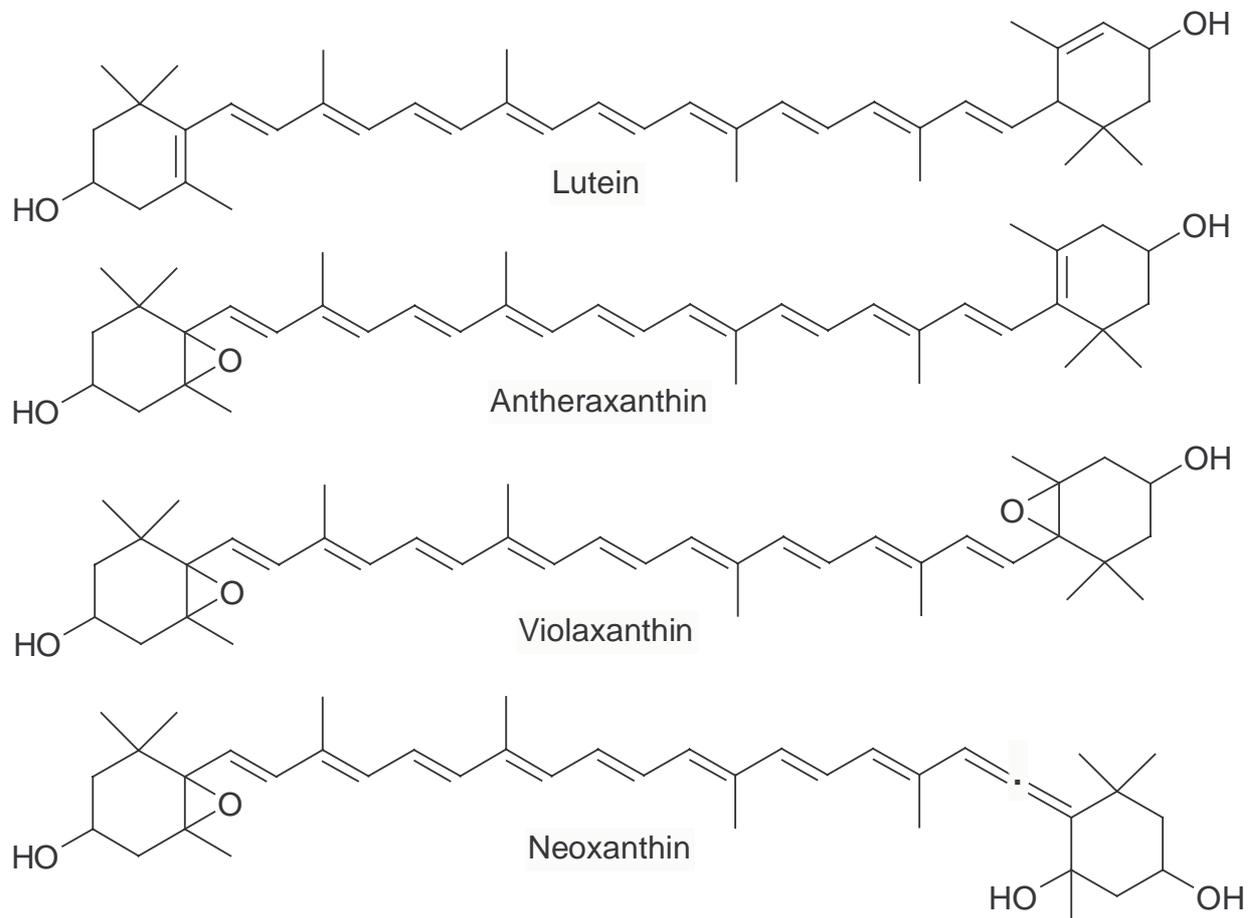


Abb. 1.6

Carotinoide in Trauben (*Vitis vinifera* L.)

Eine bedeutende Rolle spielen aromarelevante Nor-Isoprenoide außerdem in Safran (*Crocus sativus* L.). Hier bestimmen vor allem Nor-Isoprenoide mit 9 und 10 Kohlenstoffatomen wie Safranal und Isophoron das charakteristische Aroma (Winterhalter und Straubinger 2000).

1.1.1.3 Bedeutung und Synthese von C-13-Nor-Isoprenoiden

Unter den möglichen Carotinoid-Spaltprodukten sind insbesondere die C-13-Nor-Isoprenoide von wirtschaftlichem Interesse. Tabelle 1-1 fasst die Geruchsschwellenwerte einiger interessanter C-13-Ketone zusammen.

Tab. 1-1 Geruchsschwellenwerte von C-13-Nor-Isoprenoiden

Aromastoff	Geruchsschwelle [$\mu\text{g L}^{-1}$ Wasser]	Literatur
β -Ionon	0,007	Buttery et al.1971
R (+) α -Ionon	0,4	Keith und Powers 1968
β -Damascon	0,09	Ohloff 1994
β -Damascenon	0,009	Ohloff 1978

Die Rosenketone Damascon und Damascenon stellen die Schlüsselverbindungen im Rosenöl (*Rosa damascena* Miller) dar (Demole et al. 1970). Beide Ketone besitzen einen narkotisch-würzigen Geruch nach exotischen Blüten, der von einem schweren, an schwarze Johannisbeeren und Backpflaumen erinnernden, fruchtigen Unterton begleitet wird. Gemeinsam mit dem strukturverwandten β -Ionon bilden sie den Hauptanteil der Basisnote des Rosenöls. Obwohl diese Nor-Carotinoide nur in Anteilen von weniger als 1 % im etherischen Rosenöl enthalten sind, bilden sie aufgrund ihrer sehr niedrigen Geruchsschwellenwerte im wesentlichen das riechende Prinzip (Ohloff und Demole 1987).

Die Entdeckung der Damascenone im bulgarischen Rosenöl initiierte eine Vielzahl synthetischer Arbeiten und bereicherte die Riechstoffindustrie um neue Kompositions-Möglichkeiten. In Parfüms werden synthetisch hergestellte Rosenketone zum Teil in bis zu 1000-fach höherer Konzentration als im etherischen Öl eingesetzt. β -Damascon und β -Damascenon sind synthetisch aus β -Ionon oder

β -Cyclocitral zugänglich (Hoffman 1978). Die Rosenketone stellen Sekundärprodukte des Carotinoid-Abbaus dar. Biochemisch lässt sich die Bildung von β -Damascenon aus der Spaltung von Neoxanthin zwischen C_9 und C_{10} zum *Grashopper-Keton* erklären. Durch Reduktion und Umlagerung entsteht β -Damascenon (Abb. 1.7).

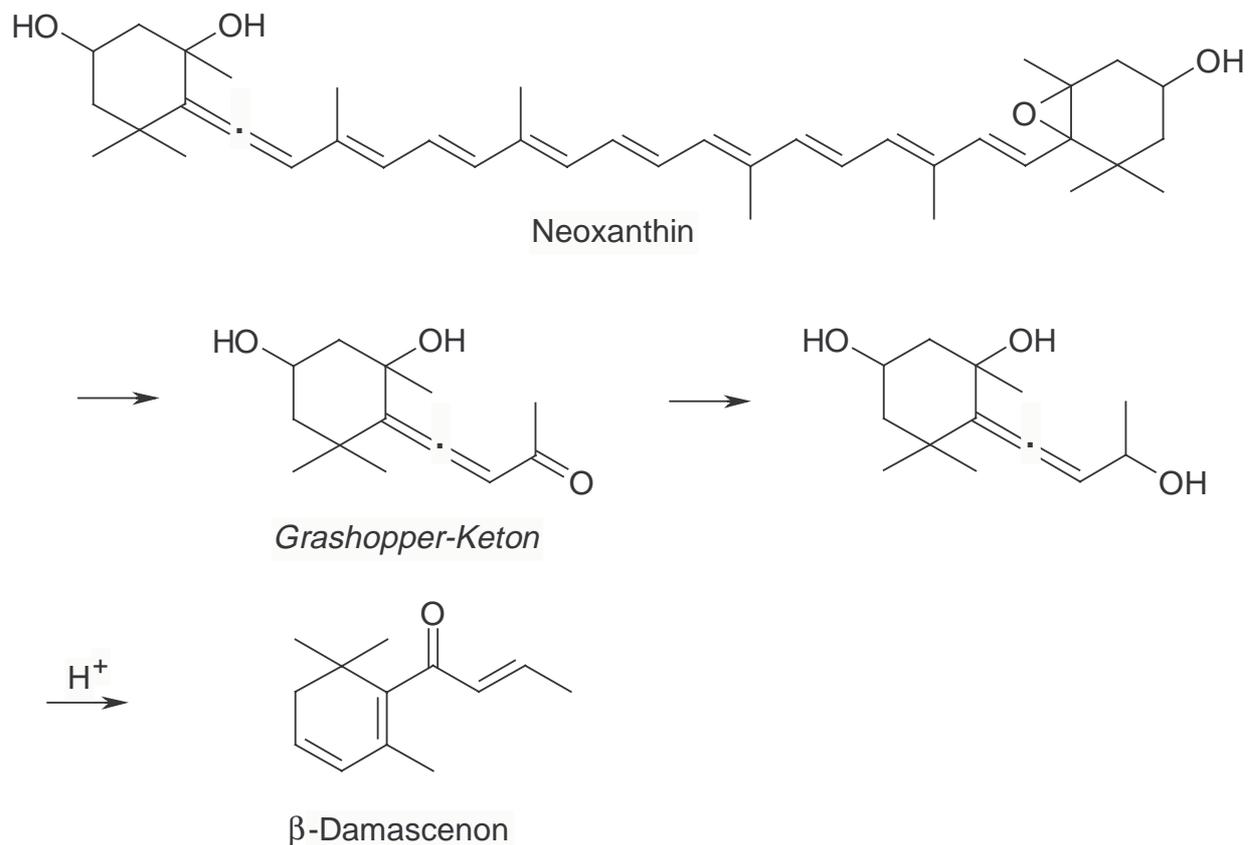


Abb. 1.7 Bildung von β -Damascenon aus Neoxanthin

Als primäre Abbauprodukte spielen die Ionone eine wichtige Rolle. α - und β -Ionon sowie deren 7,8-Dihydroverbindungen sind mit 22 % die Hauptkomponenten im Veilchenblütenöl, wobei R-(+)- α -Ionon den größten Anteil ausmacht (Uhde und Ohloff 1972). Biochemisch entstehen α -Ionon und β -Ionon aus β,ϵ -Carotin (α -Carotin) bzw. β,β -Carotin (β -Carotin). R-(+)- α -Ionon wird als veilchenartig, blumig, fruchtig, mit holzigem Unterton beschrieben, wogegen β -Ionon holzige, fruchtige und himbeerartige Geruchseigenschaften zugesprochen werden. In großen Anteilen sind Ionone weiterhin in etherischen Ölen von *Boronia megastigma* Nees. und *Osmanthus fragrans* Lour. vertreten. Doch auch als Minorkomponenten tragen sie

aufgrund der niedrigen Schwellenwerte nicht unerheblich zum Duft von anderen in der Parfümindustrie eingesetzten etherischen Ölen wie Lavendelöl (*Lavendula officinalis* Chaix), Petitgrainöl (*Citrus* sp.) sowie Eichenmoosextrakt (*Evernia prunastri* L.) bei (Ohloff 1994).

Erstmalig wurden Ionone 1893 synthetisiert (Tiemann und Krüger 1893). Seither werden sie mit steigender Beliebtheit von der Aromen- und Parfümindustrie eingesetzt. Begünstigt wurde diese Entwicklung durch die Abhängigkeit der Vitamin-A- und Carotinoid-Chemie von den als Zwischenprodukten notwendigen Iononen. Die C-13-Ketone werden vor allem in Seifen, Lotionen und anderen Körperpflegemitteln in Konzentrationen von 0,03 % bis 0,3 % eingesetzt. In Parfüm ist ein Anteil von bis zu 1,5 % üblich (Opdyke 1975).

Die erste Synthese von Iononen, die *Tiemann-Synthese*, die zum Teil heute noch angewandt wird, geht von Citral aus, das durch Aldol-Kondensation mit Aceton zu Pseudoionon umgesetzt wird (Tiemann und Krüger 1893; Mimoun 1996). Die Kondensation zum thermodynamisch stabileren β -Ionon gelingt mit konzentrierter Schwefelsäure, während Verwendung von Phosphorsäure zu 80%igem α -Ionon führt. Citral ist durch Zugabe von Trialkyl-Vanadat aus Dihydrolinalool zugänglich. In einem anderen Verfahren, der *Caroll-Reaktion*, wird Dihydrolinalool durch Einwirken von Acetessigester oder Diketen zu einem Acetoacetyl-Derivat umgesetzt, das sich thermisch zu Pseudoionon umlagert (Hoffmann 1978). Abbildung 1.8 fasst die Möglichkeiten zur Synthese von Iononen zusammen.

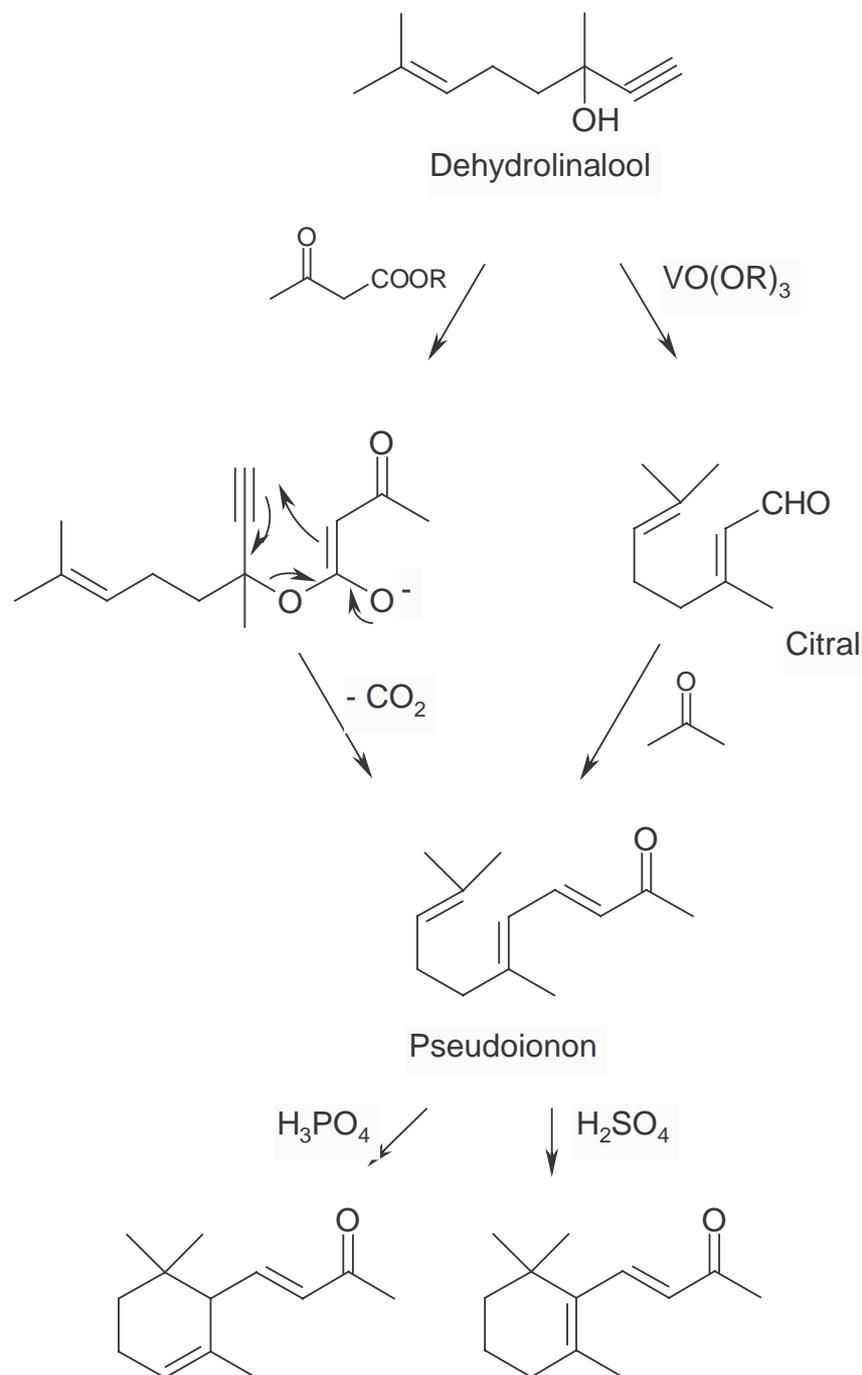


Abb. 1.8

Synthese von Iononen nach *Caroll* bzw. *Tiemann*

Möglichkeiten zur biotechnologischen Gewinnung von C-13-Nor-Isoprenoiden sind bisher rar. Da die Apo-Carotinoide in Pflanzen meist als Glykoside vorliegen, ist der Einsatz von Glykosidasen und Hydrolasen zur Steigerung der Ausbeute möglich. So nimmt beispielsweise der Gewinn an aromarelevanten Nor-Carotinoiden aus fermentierten Iriswurzeln (*Iris pallida*) durch Einwirken von hydrolytischen Enzymen zu (Berger 1995).

Über die enzymatische Gewinnung der Aromastoffe durch Abbau der Carotinoid-Vorläufer ist bislang wenig bekannt. Oxidierend wirkende Enzyme, die durch Bildung radikalischer Intermediate in unspezifischen Nebenreaktionen die oxidative Bleichung der Tetraterpene bewirken, sind beschrieben. Diese als Co-Oxidation bezeichnete Reaktion kann zu C-13-Nor-Isoprenoiden führen. Ein biotechnologischer Prozess, mit dem wirtschaftlich interessante Mengen an C-13-Apo-Carotinoiden zugänglich wären, ist bisher nicht entwickelt worden.

Über den Einsatz mikrobieller Enzyme liegen bislang nahezu keine Arbeiten vor. Obwohl Mikroorganismen als Destruenten in großen Mengen pflanzliche und so auch Carotinoid-haltige Substrate verstoffwechseln können, sind hier bisher keine Carotinoid abbauenden Enzyme beschrieben. Das vor allem durch Carotinoide gefärbte Laub fällt im Herbst in großen Mengen auf den Waldboden und dient Bakterien und Pilzen als Substrat. Ein Teil der Carotinoide wird dabei vermutlich photo-oxidativ abgebaut, doch ein anderer Teil unterliegt möglicherweise einer enzymatischen Spaltung durch Mikroorganismen.

1.1.2 Enzymatischer Carotinoid-Abbau

1.1.2.1 Carotinoid-Dioxygenasen im Tierreich

Im tierischen Organismus spielen Carotinoide eine wichtige Rolle als Vorläufer von Retinoiden, die durch enzymatische Spaltung von Tetraterpenen entstehen. Der Bedarf an Vitamin A beträgt beim Menschen 1,5 bis 1,8 mg am Tag und wird etwa zu 75 % durch Retinol und zu 25 % durch Provitamin A wirksame Carotinoide gedeckt (Belitz und Grosch 1992). 11-cis-Retinal ist als Bestandteil wichtiger Chromoproteine in den Stäbchen und Zapfen im Auge für den Sehprozess von grundlegender Bedeutung (Rando 1996). Bei Belichtung kommt es zu einer photochemischen Isomerisierung zu all-trans-Retinal. Die damit einhergehende Konformationsänderung des Rhodopsins führt über eine Reaktionskaskade schließlich zum Nervenimpuls. Bei Wirbeltieren beeinflussen Vitamin A und Retinsäure darüber hinaus durch Bindung an Retinoid-Rezeptoren die Transkription

und wirken somit auf das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellen. Dies ist insbesondere für den Proteinstoffwechsel von Haut und Schleimhäuten relevant.

Tiere sind nicht zur *de novo* Synthese von Retinoiden aus Isoprenoid-Vorstufen fähig und sind daher darauf angewiesen, die Diterpene aus der Spaltung von Carotinoiden zu bilden. Als Vitamin A-Vorstufen kommen Carotinoide in Frage, die einen unsubstituierten β -Iononring tragen. Neben β,β -Carotin sind hier beispielsweise β,ϵ -Carotin (α -Carotin), β,ψ -Carotin (γ -Carotin) oder β,β -Carotin-3-ol (Cryptoxanthin) nennenswert.

Das für die Carotinoid-Spaltung verantwortliche Enzym wurde erstmals in der Mitte der 50er Jahre benannt. 1967 wurde die Carotin-15,15'-Dioxygenase unter der EC-Nummer 1.13.11.21 in das Handbuch der Enzyme aufgenommen (Goodman et al. 1967). Das Protein wurde als lösliches, cytosolisches Enzym beschrieben, das Eisen als Cofaktor benötigt und Thiol-Gruppen enthält, die für die enzymatische Aktivität essentiell sind (Fidge et al. 1969; Lakshmanan et al. 1972). Enzymaktivität wurde in verschiedenen Organen von Huhn, Maus, Ratte, Schildkröte, Meerschweinchen, Kaninchen, Affe, Mensch, Frettchen sowie Süßwasserfischen nachgewiesen. Bei Pflanzenfressern war die Enzymaktivität am höchsten, während bei reinen Karnivoren wie der Katze keine Carotin-Dioxygenase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Das Enzym kommt beim Menschen in der Darmschleimhaut, in Leber, Niere, Lunge sowie im Fettgewebe und im Hirn vor (Duszka et al. 1996, During et al. 1996).

Eine molekulare Charakterisierung der β,β -Carotin-Dioxygenase gelang zunächst nicht. Zahlreiche erfolglose Reinigungsversuche wurden unternommen. Problematisch war die Instabilität des Enzyms in wässrigen Lösungen, die durch seine amphiphilen Eigenschaften erklärt wurde.

Die molekulare Charakterisierung und die cDNA-Klonierung der β,β -Carotin-15,15'-Dioxygenase verlief schließlich bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und dem Haushuhn (*Gallus gallus*) erfolgreich (von Lintig und Vogt 2000; Wyss et al. 2000). Die Ansätze führten zu einer 70 bzw. 60,4 kDa schweren Dioxygenase, die eine zentrale Spaltung von β,β -Carotin zu zwei Molekülen Retinal katalysiert. Fliegen

nutzen im Gegensatz zu Wirbeltieren 3-Hydroxyretinal für den Sehprozess. Trotzdem wurde Zeaxanthin durch die Dioxygenase aus der Fruchtfliege nicht gespalten. Somit scheint die Hydroxylierung von Retinal an Position 3 des β -Iononringes der einzige Weg zu 3-Hydroxyretinal zu sein.

Kürzlich wurden auch Enzyme aus Säugetieren auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert. Während das entsprechende Enzym aus Huhn vorwiegend im Zwölffingerdarm exprimiert wird, wies man die 62 kDa schwere humane β,β -Carotin-15,15'-Dioxygenase vor allem im Retinal-Pigment-Epithel nach, was auf die entscheidende Bedeutung im Sehprozess hindeutet (Yan et al. 2001). Das Protein ist für die Umsetzung von β,β -Carotin spezifisch. Lutein oder Lycopin wurden wie bei dem Enzym aus der Fruchtfliege nicht gespalten.

Weiterhin gelang die Klonierung einer β,β -Carotin-15,15'-Dioxygenase aus der Maus. Das 63 kDa schwere Protein kommt in der Leber, Niere und im Dünndarm vor und katalysiert die Spaltung von β,β -Carotin, während auch hier andere Carotinoide wie Lycopin nicht umgesetzt werden (Redmond et al. 2001).

Die Aminosäuresequenzen der genannten Proteine zeigen untereinander zum Teil stark ausgeprägte Homologien. Alle Mitglieder der „Dioxygenase Familie“ beinhalten einige Histidin- und Säure-Reste, die hoch konserviert sind. Man vermutet, dass diese Regionen für die Bindung des für die Aktivität essentiellen, nicht Häm-gebundenen Eisenions verantwortlich sind. Homologien bestehen auch zu den sogenannten Retinal-Pigment-Epithel-exprimierten Proteinen (RPE 65) der jeweiligen Wirbeltiere (von Lintig und Wyss 2001). Diese membrangebundenen Proteine kommen ausschließlich im Retinal-Pigment-Epithel vor und sind vermutlich für die Isomerisierung von all-trans- zu 11-cis-Retinal verantwortlich (Hamel et al. 1993).

Der Reaktionsmechanismus der Carotinoid-Spaltung im tierischen Organismus wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Verschiedene Autoren fanden nicht nur Retinoide als Spaltprodukte sondern auch verschiedene längerkettige Apo-Carotinoide. In neueren Arbeiten wurde in der Maus ein zweiter Typ von Carotinoid-Dioxygenasen identifiziert (Kiefer et al. 2001). Das Enzym spaltet β,β -Carotin spezifisch zwischen C_9 und C_{10} und führt damit zu β -Apo-10'-Carotinal und β -Ionon.

Diese β,β -Carotin-9,10-Dioxygenase kommt auch in anderen Wirbeltieren wie Mensch und Zebrafisch, nicht aber in Insekten wie der Fruchtfliege vor. In Insekten dient 3-Hydroxyretinal ausschließlich als Chromophor in Sehpigmenten, während der Vitamin A-Metabolismus in Wirbeltieren wesentlich komplexer ist. Hier ist neben Retinal auch Retinsäure bedeutsam, welche nicht nur aus dem Aldehyd, sondern auch über Apo-Carotinoide, die aus der exzentrischen Spaltung von β,β -Carotin entstehen, gebildet werden kann. Letzteres verläuft vermutlich ähnlich der β -Oxidation von Fettsäuren, wobei die Apo-Carotinoide schrittweise zu Retinsäure abgebaut werden (Wang et al. 1996). Die asymmetrische Spaltung stellt somit einen alternativen Weg zu Retinsäure dar. Abbildung 1.9 fasst die im Wirbeltier ablaufenden Reaktionen zusammen.

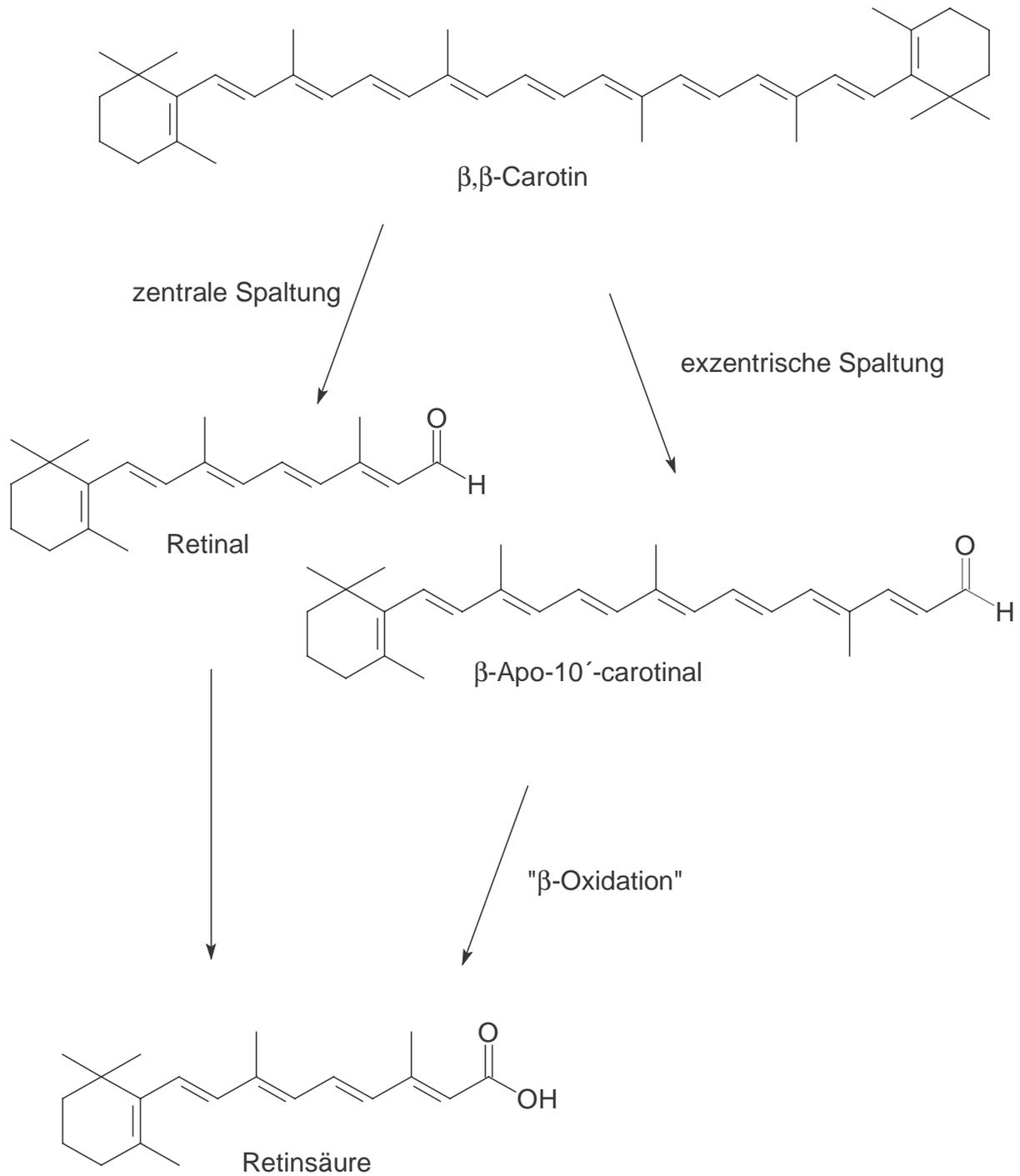


Abb. 1.9

Symetrische und asymetrische Spaltung von β,β -Carotin in Wirbeltieren

Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei dem Enzym, das die zentrale Spaltung von β,β -Carotin zu zwei Molekülen Retinal katalysiert, um eine Dioxygenase handelt. Jüngste Arbeiten untersuchten die enzymatische Spaltung von β,ϵ -Carotin unter einer Atmosphäre von markiertem Sauerstoff ($^{17}\text{O}_2$) in markiertem Wasser (H_2^{18}O) durch die Dioxygenase aus Huhn (Leuenberger et al. 2001). Überraschenderweise fand man heraus, dass je ein Molekül Sauerstoff aus dem Wasser und eines aus dem molekularen Sauerstoff eingebaut wird. Es kann sich daher nicht um eine Dioxygenase handeln, da in diesem Falle in jedem Molekül Retinal die ^{17}O -Markierung vorhanden sein müsste. Der vorgeschlagene Mechanismus der Monooxygenase-Reaktion wird in Abbildung 1.10 wiedergegeben.

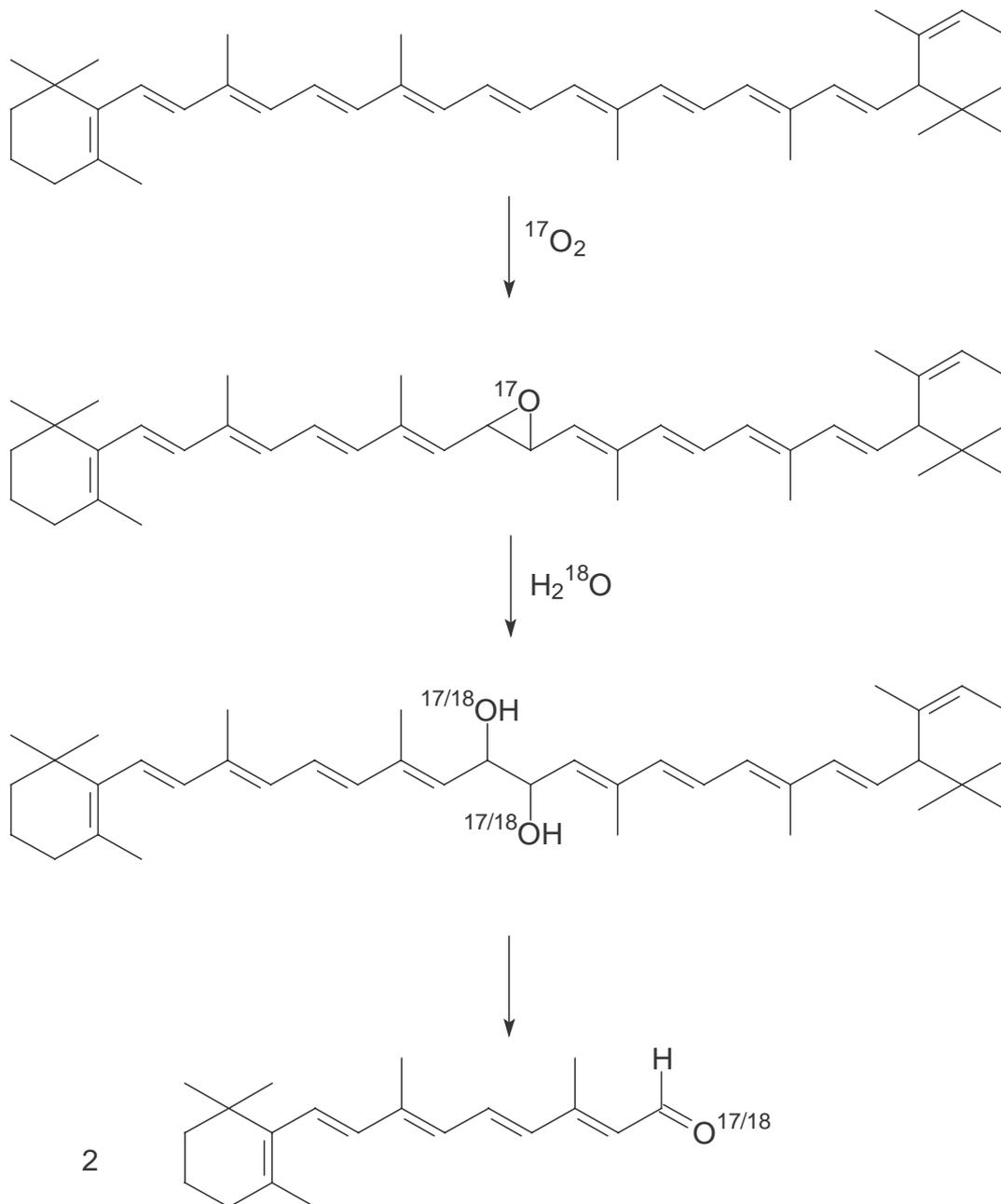


Abb. 1.10

Postulierter Mechanismus der zentralen Spaltung von β,ϵ -Carotin durch eine Monooxygenase aus Hühnerdarmschleimhaut (nach Leuenberger et al. 2001)

1.1.2.2 Pflanzliche Carotinoid-Dioxygenasen

In Pflanzen spielt das Apo-Carotinoid Abscisinsäure eine wichtige Rolle im Stoffwechsel (Abb. 1.11).

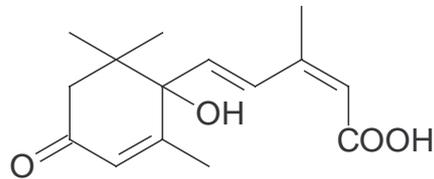


Abb. 1.11 Abscisinsäure

Das Phytohormon reguliert die Samenreifung und macht die Pflanze widerstandsfähig gegen umweltbedingten Stress. Während der Reifung von Früchten kommt es zu einem Anstieg des Abscisinsäure-Gehaltes (Adato et al. 1976). In Blättern bewirkt Abscisinsäure unter Wasserarmut das Schließen der Stomata (Zeevaart und Creelmann 1988). Das pflanzliche Hormon wird aus Carotinoiden gebildet. Diese Vorstufen sind in den meisten photosynthetisch aktiven Geweben im Vergleich zu Abscisinsäure in großen Mengen vorhanden (Parry et al. 1990). Biochemische und genetische Untersuchungen belegen, dass die Spaltung von 9-cis-Epoxy-Carotinoiden der Schlüsselschritt in der Abscisinsäure-Synthese ist (Zeevaart und Creelman 1988; Koorneef et al. 1998):

Der direkte Beweis für ein Carotinoid-spaltendes Enzym in der Abscisinsäure-Biosynthese fehlte lange Zeit. Schließlich wurde in Mais das entsprechende Gen (VP 14) identifiziert und das rekombinante Protein charakterisiert (Schwartz et al. 1997). VP 14 wird in Embryonen und Wurzeln exprimiert und durch Wassermangel in den Blättern induziert (Tan et al. 1997). Als Substrate werden ausschließlich 9-cis-Isomere der Carotinoide akzeptiert, die zwischen Position 11 und 12 gespalten werden. Beim Umsatz von 9-cis-Neoxanthin oder 9-cis-Violaxanthin wird dabei Xanthoxin, der Vorläufer der Abscisinsäure gebildet. Für die Aktivität erwiesen sich Eisenionen und molekularer Sauerstoff als essentiell. Abbildung 1.12 fasst die Biosynthese von Abscisinsäure aus Violaxanthin zusammen. Auch andere Carotinoide wie z.B. 9-cis-Zeaxanthin werden abgebaut.

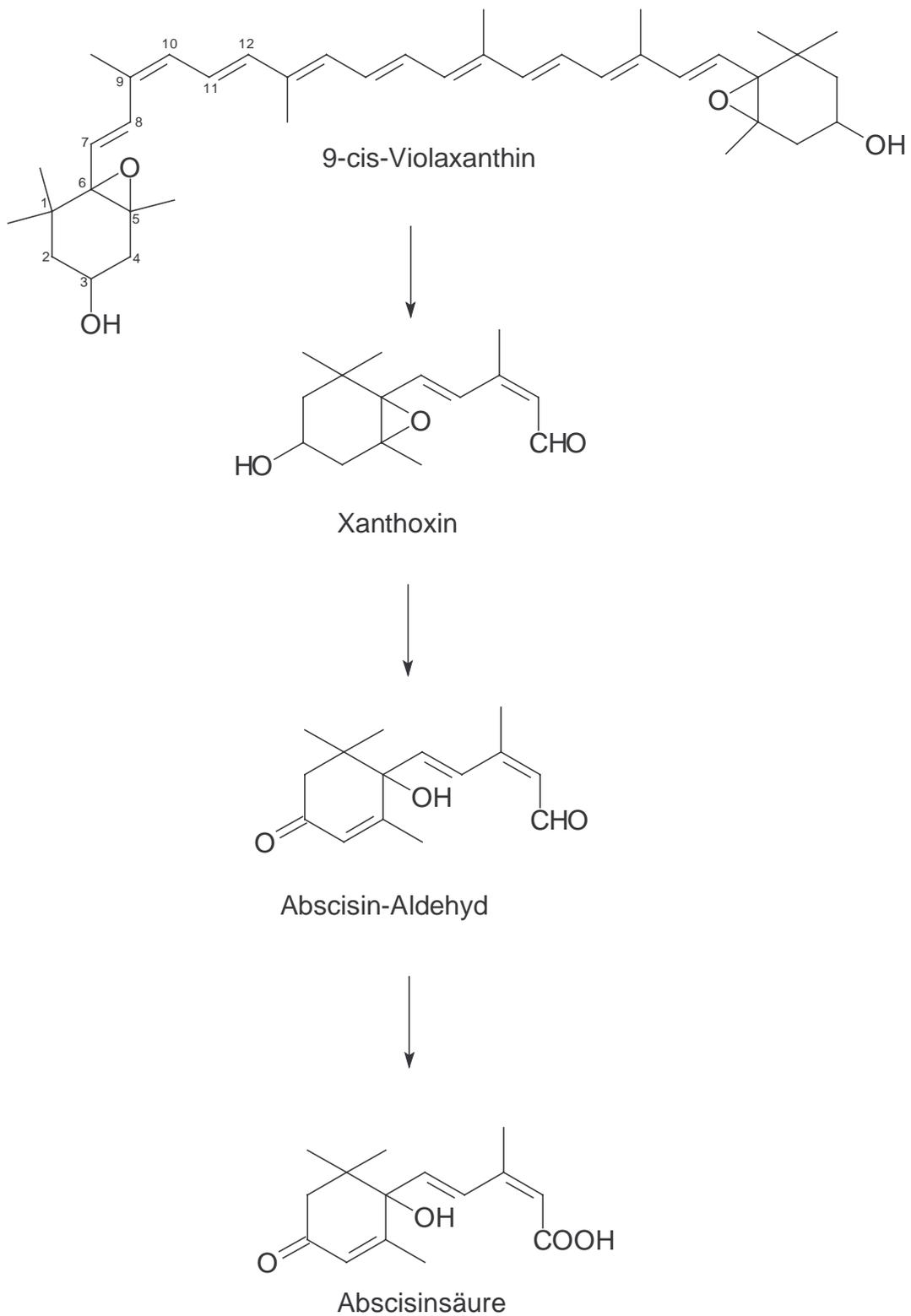


Abb. 1.12

Biosynthese von Abscisinsäure aus Violaxanthin

In Avocado (*Persea americana* Mill) wurden zwei Gene identifiziert, die eine 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase (NCED) codieren und während der Reifung der Frucht induziert werden (Chernys und Zeevaart 2000). Die rekombinanten Proteine waren zur Spaltung von 9-cis-Epoxy-Carotinoiden *in vitro* fähig. In der Aminosäuresequenz bestand eine Homologie von 60 % zu dem entsprechenden Enzym aus Mais.

Aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) wurde ebenfalls ein Gen, welches eine 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase codiert, geklont und charakterisiert (Thompson et al. 2000; Burbidge et al. 1999). Unter Wassermangel nahm der Gehalt an NCED-mRNA sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern der Pflanze stark zu. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit der Sequenz der NCED aus Mais ergab eine Identität von 63,3 %.

Auch die 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase aus der Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.) wird bei Wassermangel induziert (Qin und Zeevaart 1999). Das 68 kDa große Enzym hat einen isoelektrischen Punkt von 6,77 und zeigt hohe Homologie zu den Enzymen aus Mais und Tomate. Auch die Substratspezifität entspricht der des Mais-Enzyms. Das Protein ist an den Thylakoid-Membranen der Chloroplasten assoziiert, dem Ort, an dem auch die Substrate der NCED lokalisiert sind. Die N-terminale Sequenz hat die Eigenschaften eines Chloroplasten-Transport-Peptides, welches gewährleistet, dass das Enzym in die Plastiden transportiert wird.

In der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wurde neben einer 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase auch ein neues Carotinoid-spaltendes Enzym charakterisiert (Neill et al. 1998; Schwartz et al. 2001). Nach Überexpression in *Escherichia coli* spaltet das rekombinante Protein verschiedene Carotinoide zwischen C₉ und C₁₀ und erzeugt so einen C-14-Dialdehyd sowie zwei C-13-Ketone. Sowohl β,β-Carotin, Lutein, Zeaxanthin und all-trans-Violaxanthin als auch 9-cis-Violaxanthin und 9-cis-Neoxanthin wurden als mögliche Substrate untersucht. Alle untersuchten Carotinoide wurden als Substrat akzeptiert. Bindungsbrüche angrenzend zu einer cis-Doppelbindung wurden jedoch nicht beobachtet. 9-cis-Violaxanthin und 9-cis-Neoxanthin werden somit nur an einer Stelle gespalten, und es entsteht die C-13-Verbindung und ein C-27-Apo-Carotinal.

1.1.2.3 Carotinoid-abbauende Enzyme in Mikroorganismen

Für Pilze wird ein anderer biosynthetischer Weg zur Bildung von Abscisinsäure postuliert (Yamamoto und Oritani 1997). Während Pflanzen Abscisinsäure durch die Spaltung von Carotinoiden synthetisieren, bilden Pilze das Phytohormon direkt aus Farnesyl-Pyrophosphat. Insbesondere phytopathogene Pilze sind zur Biosynthese von Abscisinsäure befähigt. Die biochemische Funktion besteht in der Beeinflussung des hormonellen Gleichgewichtes des Wirtes. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Abscisinsäure einen hormonellen Effekt auf die Sporenbildung von Pilzen hat.

Carotinoid-spaltende Enzymaktivitäten wurden auch in Prokaryonten beschrieben. In dem Cyanobacterium *Microcystis* spaltet eine β,β -Carotin-7,8-Oxygenase die Bindung zwischen C₇ und C₈ des Carotinoid-Gerüsts, was zu dem C-10-Aldehyd β -Cyclocitral und Crocetinindial führt (Jüttner und Höflacher 1985). Neben der Umsetzung von β,β -Carotin wurde auch die Spaltung von Zeaxanthin beobachtet. Untersuchungen mit markiertem Sauerstoff ($^{18}\text{O}_2$) zeigten, dass der Sauerstoff der Aldehyd-Gruppe aus dem molekularem Sauerstoff stammt. Bei dieser membrangebundenen Oxygenase wurde die Reaktion durch chelatbildende Reagenzien gehemmt und durch Zugabe von Eisenionen aktiviert. Eine weitergehende biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des Enzyms erfolgte nicht.

Ein weiteres Enzym, welches Sequenz-Homologien zu pflanzlichen Carotinoid-Dioxygenasen zeigt, ist eine Lignostilben-Dioxygenase aus *Pseudomonas paucimobilis* (Kamoda und Saburi 1993). Das Enzym ist am Ligninabbau beteiligt und katalysiert die Spaltung der zentralen Doppelbindung von Lignostilben, woraus zwei Moleküle Vanillin resultieren (Abb. 1.13).

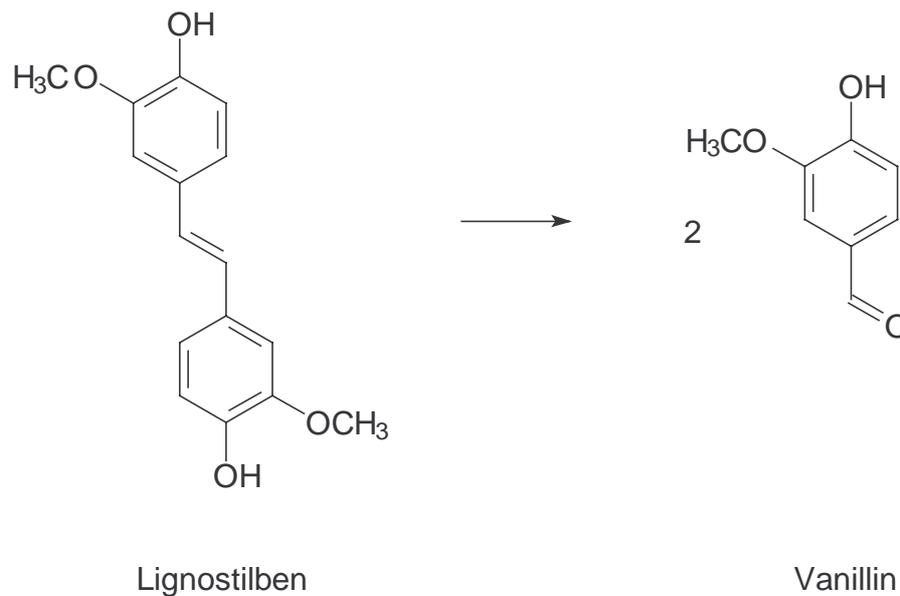
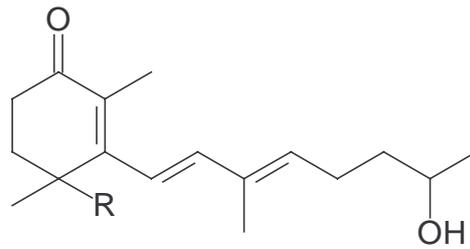


Abb. 1.13 Reaktion von Lignostilben zu Vanillin katalysiert durch Lignostilben-Dioxygenase

Zwischen den Carotinoid-spaltenden Enzymen aus Pflanzen und denen aus Tieren bestehen schwache Homologien. VP 14 war die erste pflanzliche Carotinoid-Dioxygenase, die auf molekularer Ebene charakterisiert wurde. Die weite Verbreitung von Carotinoid spaltenden Enzymaktivitäten sowohl im Pflanzen- und Tierreich als auch unter den Prokaryonten lässt auf einen stammesgeschichtlich frühen Ursprung schließen. Vor diesem Hintergrund erscheint die nähere Untersuchung von Pilzen auf das Vorkommen von Carotinoid-spaltenden Enzymen angezeigt.

Doch nicht nur phylogenetische Gründe, sondern auch biochemische Gesichtspunkte sprechen für das Vorhandensein von Carotinoid-Dioxygenasen in Pilzen.

Modifizierte Apo-Carotinoide wurden in Zygomyceten nachgewiesen. Zu dieser Substanz-Gruppe zählen die C-18-Nor-Carotinoide Trisporsäure sowie Trisporine und Trisporole (Abb. 1.14). Die physiologische Funktion von Trisporsäure und ihren Derivaten besteht in der Kontrolle der sexuellen Reproduktion dieser Organismen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Apo-Carotinoide die Bildung der Zygosporen in (+) und (-) Stämmen von *Blakeslea trispora* stimulieren. Die Biosynthese von Trisporsäure-Derivaten verläuft über die Spaltung von Carotinoiden zu Retinal. Über die beteiligten Enzyme ist noch wenig bekannt (Porter und Spurgeon 1983).



Trisporsäure: R = COOH, Trisporol: R = CH₂OH; Trisporin: R = CH₃

Abb. 1.14 Trisporsäure-Derivate

Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Carotinoiden existieren nur in Ansätzen. In einer Arbeit wurde der Abbau von Lutein mit Mikroorganismen zu flüchtigen Produkten beschrieben (Sanchez-Contreras et al. 2000). Hier wurde Tagetes-Extrakt (*Tagetes erecta* L.) mit einer Mischkultur von *Bacillus* sp. und *Geotrichum* sp. umgesetzt. Als Hauptkomponente wurde β -Ionon neben 7,8-Dihydro- β -Ionol, 7,8-Dihydro- β -Ionon sowie 3-Hydroxy- β -Ionon nachgewiesen. Dieser Befund wurde auf das Einwirken von Dehydroxylasen, Oxidasen und Reduktasen zurückgeführt. Die Notwendigkeit einer Mischkultur lässt sich aus dem Carotinoid-Spektrum des Tagetes-Extraktes ableiten. Hier kommen ausschließlich veresterte Carotinoide vor (Breithaupt et al. 2002). Vermutlich liefert ein Organismus Lipasen zum Freisetzen der Carotinoide und der andere Oxydasen, die den Bindungsbruch des Polyengerüstes katalysieren. In der oben beschriebenen Arbeit wurden weder die eingesetzten Mikroorganismen, noch die Enzyme, Gene oder Mechanismen genau spezifiziert.

1.2 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die biotechnologische Produktion von Aromastoffen aus dem Carotinoid-Abbau durch Mikroorganismen zu untersuchen. Um einen Vergleich für die Effizienz eines mikrobiologischen Verfahrens zu erhalten, sollte zunächst die Produktion von Aromastoffen aus dem Carotinoid-Abbau mittels Co-Oxidation erprobt werden.

Für den mikrobiologischen Prozess standen die Ausbeuten an C-13-Nor-Isoprenoiden, das Spektrum der gebildeten Produkte und die Analyse der zugrundeliegenden biochemischen Eigenschaften der Carotinoid-abbauenden Mikroorganismen im Vordergrund des Interesses. Als Modellsubstanz sollte zunächst β,β -Carotin als Ausgangsstoff dienen. Der Einsatz von β,ϵ -Carotin und die Möglichkeit zur α -Ionon-Gewinnung sollte ebenfalls erprobt werden.

Folgende Pläne wurden für die Arbeit formuliert:

1. Untersuchung des Carotinoid-Abbaus in einem neuen Ansatz zur Co-Oxidation.
2. Screening einer möglichst großen Anzahl von Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit zum Carotinoid-Abbau und zur Synthese aromarelevanter C-13-Verbindungen.
3. Ermittlung des Produktspektrums am Beispiel des β,β -Carotin-Abbaus und Quantifizierung der gebildeten C-13-Norisoprenoide.
4. Charakterisierung der dem Abbau zugrunde liegenden Reaktionen.
5. Isolierung und proteinbiochemische Charakterisierung der β,β -Carotin-spaltenden Enzyme.

2 Ergebnisse

2.1 Co-Oxidation von β,β -Carotin

Die Umsetzung von β,β -Carotin mittels Co-Oxidation im System Lipoxygenase/Linolsäure lieferte β -Ionon als Hauptprodukt (Hohler 1996; Grosch 1976). Über die Ausbeuten an flüchtigen Abbauprodukten liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor. Mit eigenen Versuchen wurde untersucht, welche maximalen Ausbeuten an flüchtigen C-13-Verbindungen mittels Co-Oxidation erhalten werden können.

2.1.1 Co-Oxidation von Carotinoiden aus Karotten im System Linolsäure/ Lipoxygenase

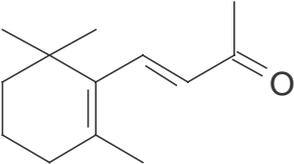
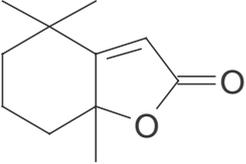
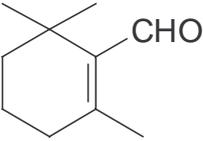
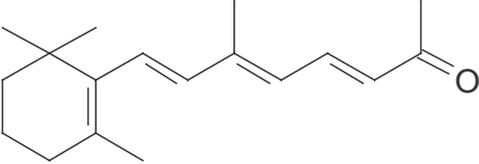
In einem französischen Patent wird ein Verfahren zur Herstellung von α -Ionon aus Karottensaft mittels Lipoxygenase-Reaktion beschrieben (Belin et al. 1994). Dabei wird ein α -Iononanteil von 230 mg kg^{-1} bezogen auf die Reaktionsmasse erhalten, während der β -Ionongehalt nur im Spurenbereich liegt. In einem eigenen Versuch sollte die Anwendbarkeit dieser Methode unter praktischen Bedingungen zunächst erprobt werden.

Laut Patentschrift werden 55,5 % konzentrierter Karottensaft mit 37,5 % Sojamehl, 5,75 % Safloröl, 500 kU Lipase und 0,72 % Calciumchlorid umgesetzt. Durch diese Mischung sollten 40 Stunden unter Rühren 10 mL min^{-1} Luft geleitet werden (siehe 4.2.1). Der Ansatz erwies sich jedoch als nicht praxistauglich. Die Mischung wurde so fest, dass ein Rühren nicht möglich war und es zu keiner gleichmäßigen Verteilung der eingeleiteten Luft kommen konnte. Auch der Zusatz von 500 mL Wasser erbrachte keine wesentliche Verbesserung. Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung mittels Wasserdampfdestillation konnten nur geringe Spuren an β -Ionon detektiert werden, α -Ionon war nicht nachweisbar.

2.1.2 Umsetzung von β,β -Carotin mit 13-HPOD

Zunächst wurde 13-Hydroperoxy-Octadecadiensäure mittels Lipxygenase-Reaktion aus Linolsäure hergestellt (siehe 4.2.2). Das Hydroperoxid wurde in einem Gemisch aus n-Hexan/Ethylacetat gelöst und mit β,β -Carotin versetzt. Als Radikal-Initiator diente Eisen(II)sulfat. Die Analyse der flüchtigen Reaktionsprodukte zeigte neben zahlreichen Produkten des oxidativen Fettsäure-Abbaus wie Hexanal, Heptanal, 2,4-Decadienal etc. mehrere β,β -Carotin-Abbauprodukte (Tab. 2-1). Die Verbindungen wurden durch Vergleich mit Massenspektren aus der Literatur bzw. Spektren-Datenbanken (siehe 4.7.2.2) identifiziert. Hauptprodukt der Co-Oxidation mit isoliertem 13-HPOD war β -Ionon.

Tab. 2-1 Produkte der Co-Oxidation von β,β -Carotin mit 13-HPOD

Produkt		MS-Vergleich
β -Ionon		Spektren-Datenbank, Standardsubstanz
Dihydroactinidiolid		Spektren-Datenbank
β -Cyclocitral		Spektren-Datenbank, Standardsubstanz
β -Apo-13-Carotinon		Literaturspektrum (Handelmann et al. 1991)

2.1.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Um die Reaktion in Hinblick auf maximale Produktausbeuten an β -Ionon zu optimieren, wurden die Reaktionsbedingungen variiert.

2.1.3.1 Abhängigkeit von der Eisen(II)-Konzentration

Das System 13-HPOD und Eisen(II)sulfat bildet einen Redox-Initiator. Die gebildete Menge an Radikalen ist direkt von der Konzentration an Eisenionen abhängig. Um die Auswirkungen auf die Produktbildung zu untersuchen, wurde β,β -Carotin in Ethylacetat/n-Hexan (1:1) gelöst und mit der vierfachen molaren Menge an 13-HPOD versetzt. Unterschiedliche Mengen an Eisen(II)sulfat-Stammlösung wurden zugesetzt (siehe 4.2.2.2.1). Da sich nur geringe Anteile dieser Lösung mit der organischen Phase mischten, konnte im Verhältnis zu β,β -Carotin maximal die vierfache molare Menge an Eisenionen eingesetzt werden. Die Mischung wurde acht Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt.

Der Eisengehalt in der Reaktionsmischung hatte einen erheblichen Einfluss auf die Produktausbeute (Abb. 2.1). Erst bei einem vierfachen molaren Überschuss an Eisenionen wurden Produkte in nennenswerten Mengen gebildet.

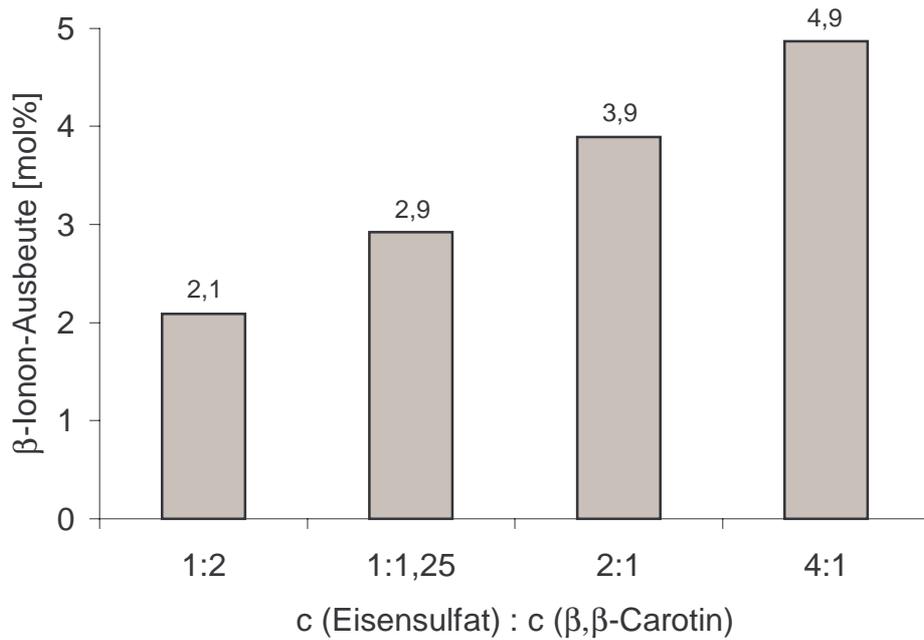


Abb. 2.1 Ausbeute an β -Ionon in Abhängigkeit von der Menge an zugesetztem Eisen(II)sulfat

2.1.3.2 Abhängigkeit von der Menge an 13-HPOD

Um den optimalen Gehalt an 13-HPOD in der Reaktionsmischung zu ermitteln, wurde eine β,β -Carotin-Lösung mit der vierfachen molaren Menge an Eisen(II)sulfat versetzt, unterschiedliche Mengen an 13-HPOD zugegeben und acht Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt (siehe 4.2.2.2). Mit steigendem Gehalt an 13-HPOD stieg die Ausbeute an β -Ionon deutlich an (Abb. 2.2).

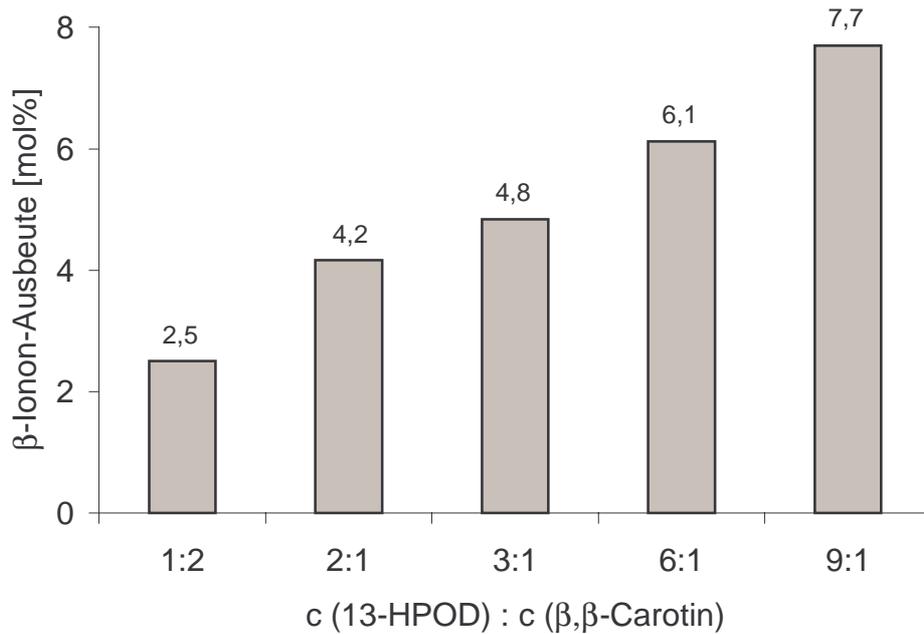


Abb. 2.2 Ausbeute an β -Ionon in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an 13-HPOD

2.1.3.3 Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt

Zur Erhöhung der Sauerstoffzufuhr wurde β,β -Carotin in Hexan/Ethylacetat (1:1) gelöst, mit der zweifachen molaren Menge an 13-HPOD und der vierfachen Menge an Eisen(II)sulfat versetzt und zwei Stunden zum Sieden erhitzt, wobei ein Luftstrom (2 mL min^{-1}) durch die Lösung gesaugt wurde (siehe 4.2.2.2.3). Bei diesem Ansatz wurden 8 mol% β -Ionon erhalten, während die Ausbeute bei dem entsprechenden Ansatz ohne Erhöhung des Sauerstoffgehaltes bei 2,6 mol% lag.

2.1.3.4 Abhängigkeit vom Lösungsmittel

Um den Einfluss verschiedener Lösungsmittel zu untersuchen, wurde β,β -Carotin in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst, mit dem zweifachen molaren Überschuss an 13-HPOD und dem vierfachen molaren Überschuss an Eisen(II)sulfat versetzt und acht Stunden erhitzt (siehe 4.2.2.2.4). Dabei lieferte die Umsetzung in *tert*-Butylmethylether die höchste Ausbeute an β -Ionon (Abb. 2.3). Dieser Effekt kann durch die größere Stabilität der Peroxyradikale in polareren Lösungsmitteln erklärt

werden. Möglicherweise spielt auch die bessere Mischbarkeit der wässrigen Eisensulfat-Lösung mit steigender Polarität der organischen Phase eine Rolle.

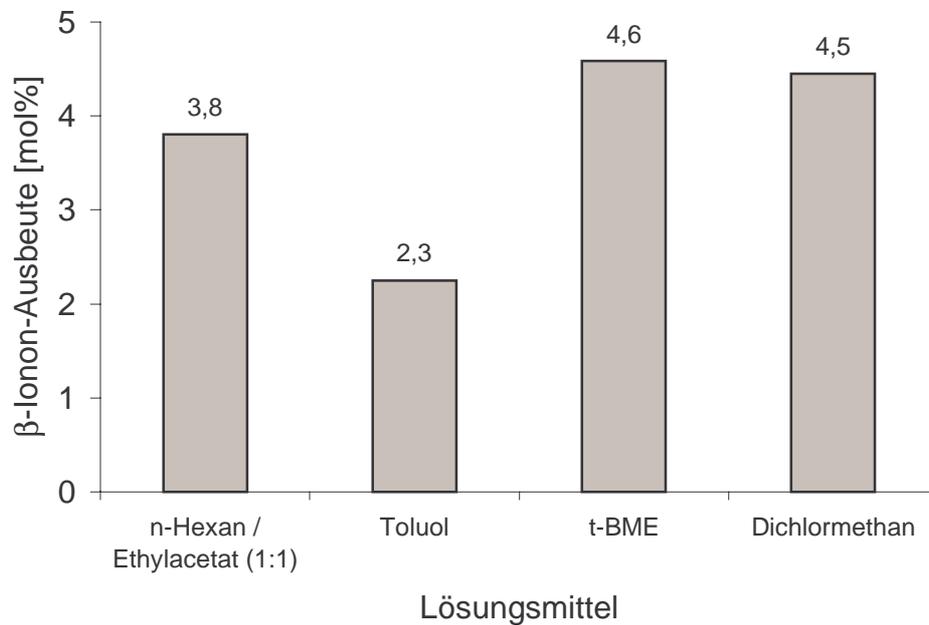


Abb. 2.3 Ausbeute an β -Ionon in Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel

2.1.3.5 Co-Oxidation unter optimierten Bedingungen

β,β -Carotin wurde in tert-Butylmethylether gelöst, mit der 9-fachen molaren Menge an 13-HPOD und der 4-fachen molaren Menge an Eisen(II)sulfat versetzt und acht Stunden zum Sieden erhitzt. Dabei wurde ein Luftstrom durch die Lösung gesaugt (siehe 4.2.2.2.5). Unter diesen optimierten Bedingungen betrug die Ausbeute an β -Ionon 11,4 mol%.

2.1.4 Zusammenfassung

β,β -Carotin konnte in Gegenwart von Eisen(II)sulfat und Luftsauerstoff mit isoliertem 13-HPOD zu flüchtigen Nor-Isoprenoiden abgebaut werden. Das Hauptprodukt war dabei β -Ionon. Nennenswerte Mengen des C-13-Ketons konnten jedoch nur bei hoher Temperatur, einer Reaktionszeit von mehreren Stunden und einem großen Überschuss an Fettsäure-Hydroperoxid und Eisen(II)sulfat erhalten werden.

2.2 Screening von Mikroorganismen auf β,β -Carotin-Abbau

2.2.1 Auswahl der Mikroorganismen

Unter der Vielzahl der kommerziell erhältlichen Pilzstämmen wurden Stämme ausgewählt, die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllten:

- Die Art ist zur Biosynthese von Carotinoiden befähigt.
- Die Art ist für die Fähigkeit Carotinoide abzubauen bekannt.
- Die Art oder die Gattung ist für die Biosynthese von Terpenen bekannt (Janssens et al. 1995).
- Die Art oder die Gattung transformiert Terpene.
- Der Stamm wurde von Terpen- bzw. Carotinoid-haltigem Substrat isoliert.

Tabelle 2-2 fasst die im Screening verwendeten Mikroorganismen zusammen.

Tab. 2-2 Verwendete Mikroorganismen für das Screening

Art	Einteilung	Auswahl-Kriterium	Literatur
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Fungi imperfecti	Carotinoid-Abbau, isoliert v. Pomeranze	(Prasad und Singh 1995)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Hefe	Carotinoid-Biosynthese (β,β -Carotin)	(Feofilowa 1994)
<i>Curvularia lunata</i>	Ascomycet	Carotinoid-Abbau	(Prasad und Singh 1995)
<i>Cyathus africanus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	(Ayer et al. 1978)
<i>Cyathus pallidus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Ayer et al. 1978)
<i>Cyathus striatus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Ayer et al. 1978)
<i>Cystoderma carcharias</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	(Breheret et al. 1997)
<i>Drechslera spiciferum</i>	Fungi imperfecti	Carotinoid-Abbau	(Prasad und Singh 1995)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Basidiomycet	isoliert v. Fichtenholz	
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Fungi imperfecti	Carotinoid-Biosynthese (Neurosporoxanthin)	(Feofilova 1994)
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fungi imperfecti	Carotinoid-Abbau	(Prasad und Singh 1995)
<i>Ganoderma applanatum</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese u. – transformation	(Abraham und Berger 1994; Busmann und Berger 1994)
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	(Hanssen und Abraham 1987)
<i>Guignardia citricarpa</i>	Ascomycet	isoliert v. Pomeranze, Bildung v. hellem Hof	(Snowdon 1990)
<i>Hypomyces odoratus</i>	Ascomycet	Terpen-Biosynthese	(Kühne und Sprecher 1989)
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese isoliert von Nadelholz	(Berger et al. 1987)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese	(Drawert und Barton 1978)
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese u. – transformation	(Abraham und Berger 1994; Busmann und Berger 1994)
<i>Lentinellus cochleatus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	(Hanssen und Abraham 1987)
<i>Lentinellus deliciosus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Hanssen und Abraham 1987)
<i>Lentinus lepideus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	(Hanssen 1985)

<i>Lepista irina</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Abraham et al. 1991)
<i>Lepista nuda</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Abraham et al. 1991)
<i>Marasmius alliaceus</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biotransformation Aromastoffsynthese	(Schindler u. Schmid 1982; Busmann und Berger 1994)
<i>Marasmius scorodonius</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biotransformation Aromastoffsynth. (Gattung)	(Schindler u. Schmid 1982; Busmann und Berger 1994)
<i>Microbotryum violaceum</i>	Zygo- mycet	Carotinoid-Biosynthese (β,β -Carotin)	(Feofilova 1994)
<i>Omphalotus olearius</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Nair et al. 1973)
<i>Paxillus involutus</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Breheret et al. 1997)
<i>Penicillium citrinum</i>	Fungi imperfecti	Carotinoid-Abbau	(Prasad und Singh 1995)
<i>Penicillium digitatum</i>	Fungi imperfecti	isoliert v. Zitrusfrüchten	(Snowdon 1990)
<i>Penicillium italicum</i>	Fungi imperfecti	isoliert v. Orangen	(Snowdon 1990)
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	Basidio- mycet	isoliert v. Kiefernholz	
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Hefe	Carotinoid-Biosynthese (Astaxanthin)	(Feofilova 1994)
<i>Phellinus igniarius</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Collins und Halim 1972)
<i>Phlebia radiata</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Gross et al. 1989)
<i>Pholiota populnea</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Abraham und Berger 1994)
<i>Pholiota squarosa</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biotransf. u. –synth. (Gattung), isol. v. Nadelholz	(Abraham und Berger 1994; Busmann und Berger 1994)
<i>Phycomyces blakesleanus</i>	Zygo- mycet	Carotinoid-Biosynthese (β,β -Carotin)	(Feofilova 1994)
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese u. – transformation (Gattung)	(Busman et al. 1994)
<i>Pleurotus euosmus</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese u. -transformation (Gattung)	(Drawert et al. 1983; Busmann und Berger 1994)
<i>Pleurotus lampas</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese u. -transformation (Gattung)	(Drawert et al. 1983; Busmann und Berger 1994)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese u. – transformation	(Drawert et al. 1983, Busmann und Berger 1994)
<i>Pleurotus sapidus</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese u. – transformation	(Drawert et al. 1983; Busmann und Berger 1994)

<i>Polyporus umbellatus</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Berger et al. 1986)
<i>Rhizoctonia carotae</i>	Fungi imperfecti	isoliert v. Karotten	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Hefe	Carotinoid-Biosynthese (β,β -Carotin)	(Feofilova 1994)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese	(Hock et al. 1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese u. -transformation	(Hock et al. 1984)
<i>Trametes hirsuata</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Birkinshaw et al. 1944)
<i>Trametes suaveolens</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese	(Birkinshaw et al. 1944)
<i>Trametes versicolor</i>	Basidio- mycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	(Birkinshaw et al. 1944)

2.2.2 Vorscreening

Um eine möglichst große Anzahl von Mikroorganismen im Hinblick auf die Fähigkeit zum β,β -Carotin-Abbau zu untersuchen, wurde eine Schnellmethode entwickelt, in der die Farbigkeit des β,β -Carotins für eine optische Auswertung genutzt wurde. Hierzu wurden die Mikroorganismen auf β,β -Carotin-haltigem Nähragar kultiviert (siehe 4.3.2.2). Der Abbau von β,β -Carotin zeigte sich durch die Bleichung des Agars in der Umgebung des Pilzmycels (Abb. 2.4). In einigen Fällen bildete sich ein deutlicher Hof außerhalb des Mycels. Teilweise war aber nur der Nährboden unmittelbar im Bereich des Mycels aufgehellert, so dass keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein von Carotinoid-spaltenden Exoenzymen möglich war. In Tabelle 2-3 sind alle im Vorscreening positiv getesteten Mikroorganismen aufgeführt.

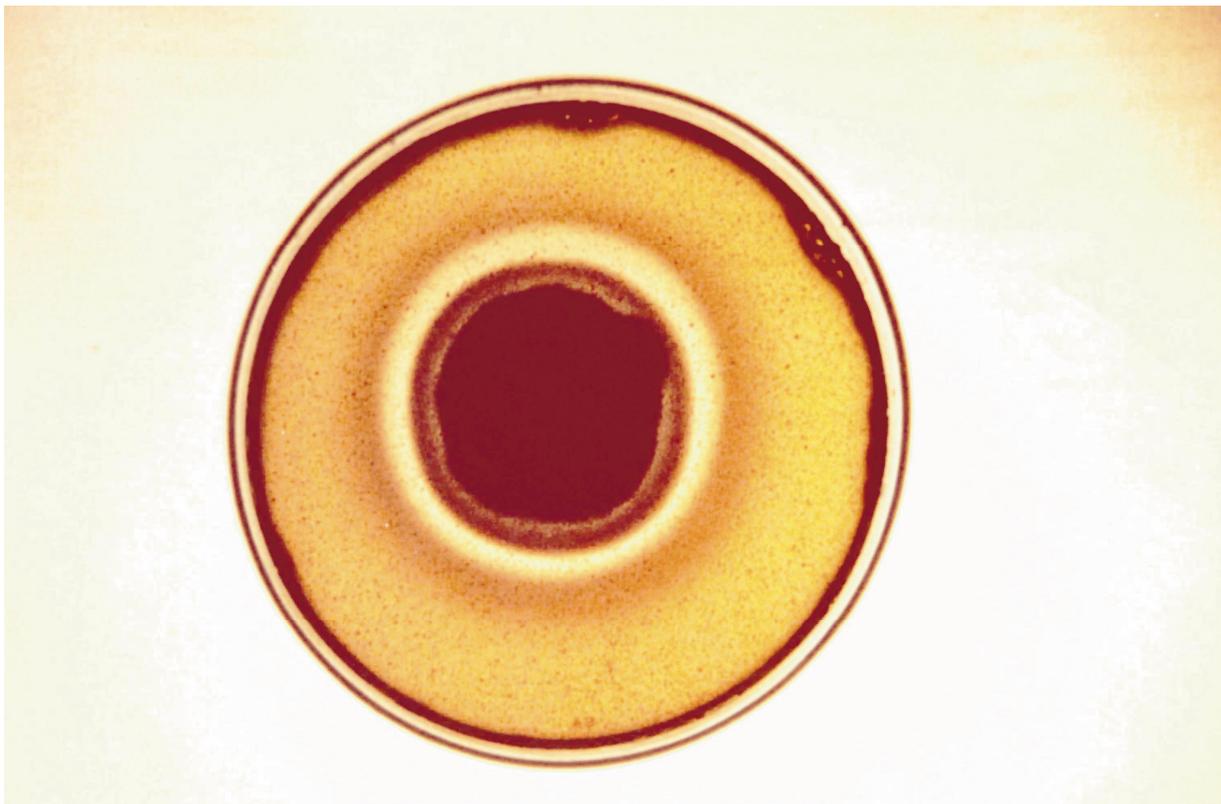


Abb. 2.4

Entfärbung des β,β -Carotin-Agars durch *Lepista irina*

Tab. 2-3 Carotin-abbauende Pilze (+ mit Hofbildung, +/- Aufhellung unmittelbar im Bereich des Mycels)

Art	Entfärbung des β,β -Carotin-Agars
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+/-
<i>Cyathus pallidus</i>	+
<i>Ganoderma applanatum</i>	+
<i>Hypomyces odoratus</i>	+
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	+
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	+
<i>Lepista irina</i>	+
<i>Marasmius scorodonius</i>	+
<i>Phaffia rhodozyma</i>	+/-
<i>Pleurotus eryngii</i> (siehe 2.4.6)	+
<i>Trametes suaveolens</i>	+
<i>Trametes versicolor</i>	+

2.2.3 Screening in Submerskultur

Alle Stämme, die im Vorscreening eine Bleichung des β,β -Carotin-Agars bewirkten, wurden in flüssiges Standard-Nähr-Medium überführt. Die Submerskulturen wurden dabei mit Mycelstücken direkt von den β,β -Carotin-Agar Platten angeimpft. Die Kulturen wurden, nachdem sie in dem flüssigen Medium angewachsen waren, mit einer Emulsion aus 20 mg β,β -Carotin und 200 mg Tween 40 in Ethanol versetzt und je nach Wachstumsgeschwindigkeit bis zu drei Wochen unter Ausschluss von Licht kultiviert (siehe 4.4.2). Ein Verhältnis von β,β -Carotin zu Tween 40 von 1:10 war für diese Versuche ausreichend, da sich β,β -Carotin als unpolares Substrat im Verlauf der Kultivierung an den lipophilen Zellmembranen anreicherte, was optisch und mikroskopisch beobachtet werden konnte. Es war somit davon auszugehen, dass das Substrat in gut zugänglicher Form vorlag. Als chemischer Blindwert diente unbeimpftes und mit β,β -Carotin-Emulsion versetztes Standard-Nähr-Medium. Die Probenahme erfolgte außer bei den Hefen, die täglich untersucht wurden, in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit alle zwei bis vier Tage, beginnend mit dem dritten oder fünften Kulturtag.

2.2.3.1 Wachstum der Mikroorganismen

Das Wachstum der Mikroorganismen wurde durch den Verbrauch an Glucose im Medium (siehe 4.3.3.2) und durch die Zunahme der Trockenmasse (siehe 4.3.3.3) verfolgt. Um sicherzustellen, dass durch Zugabe der β,β -Carotin-Emulsion kein wesentlicher Wachstumsrückgang auftrat, wurde zunächst je eine Kultur mit Zusatz von Tween 40 in Ethanol ohne β,β -Carotin und eine völlig un-supplementierte Kultur mitgeführt. Abbildung 2.5 zeigt, dass die Supplementierung keinen wesentlichen Einfluss auf die Zunahme der Biotrockenmasse während des Kulturverlaufs hatte. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher auf das Mitführen der β,β -Carotin-freien Kulturen verzichtet. Dies erlaubte das Screening einer größeren Anzahl von Mikroorganismen in kürzerer Zeit.

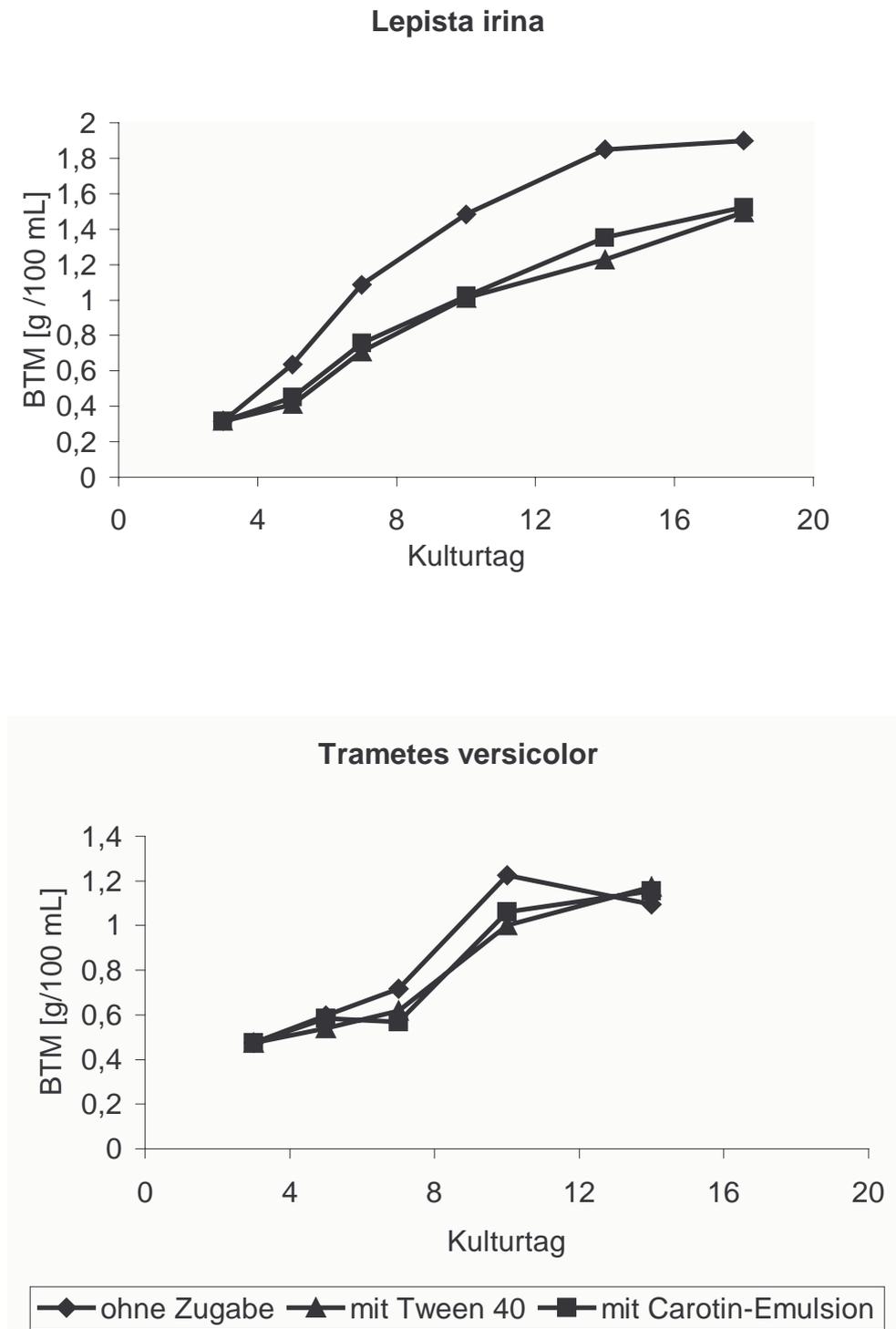


Abb. 2.5

Kulturverlauf von *Lepista irina* und *Trametes versicolor*

2.2.3.2 Identifizierung der Abbauprodukte

Um flüchtige β,β -Carotin-Abbauprodukte während des gesamten Kulturverlaufes zu erfassen, wurde je Probenahmetag eine Kultur (100 mL) vollständig extraktiv aufgearbeitet (siehe 4.4.2). Die Identifizierung der flüchtigen Metabolite erfolgte gaschromatographisch und massenspektrometrisch über den Vergleich mit Referenzmassenspektren und zum Teil anhand von Retentionszeiten authentischer Standardsubstanzen. Unter den gewählten Screening-Bedingungen konnte Dihydroactinidiolid als Abbauprodukt identifiziert werden (Tab. 2-4).

Tab. 2-4 Identifizierte Produkte des β,β -Carotin-Abbaus durch Pilze

Art	flüchtige β,β -Carotin-Abbauprodukte
Blindwert	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-
<i>Cyathus pallidus</i>	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	Dihydroactinidiolid
<i>Hypomyces odoratus</i>	Dihydroactinidiolid
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	-
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Dihydroactinidiolid
<i>Lepista irina</i>	-
<i>Marasmius scorodonius</i>	-
<i>Phaffia rhodozyma</i>	-
<i>Trametes suaveolens</i>	Dihydroactinidiolid
<i>Trametes versicolor</i>	-

2.2.4 Zellfreies Screening

Dihydroactinidiolid ist als Oxidationsprodukt von β -Ionon bzw. 5,6-Epoxy- β -Ionon beschrieben (Bossler et al. 1995). Daher erschien eine schnellere Screening-Methode zum Auffinden primärer Abbauprodukte vielversprechend. Zur Lokalisierung der Enzyme wurde ein zellfreier Ansatz gewählt. Hierzu wurde das Medium nach erfolgter Kultivierung vom Mycel abgetrennt und mit β,β -Carotin versetzt. Die Möglichkeit zur Anreicherung des Carotinoids in den lipophilen Zellmembranen

entfiel bei diesen zellfreien Versuchen. Um eine ausreichende Emulgierung des unpolaren Substrates zu erreichen und eine optimale Bioverfügbarkeit zu gewährleisten, wurde der Emulgatoranteil im Vergleich zum Screening in Submerskultur erhöht. In der Literatur wird zum Solubilisieren von β,β -Carotin ein Verhältnis von 1:100 von β,β -Carotin zu Tween als optimal bewertet (Hohler 1986). Die mit solubilisiertem β,β -Carotin (siehe 4.4.3) versetzten Kulturüberstände wurden nach 14 Stunden Inkubation extraktiv aufgearbeitet. Um den autoxidativen Abbau des Substrates zu ermitteln, wurde unbeimpftes und mit β,β -Carotin versetztes Nährmedium parallel mitgeführt. Außerdem wurden Kulturmedium der Pilze ohne Zusatz von β,β -Carotin-Emulsion untersucht, um eine *de novo* Synthese flüchtiger Komponenten auszuschließen. Die Ergebnisse der Analyse der flüchtigen Metabolite und des nicht umgesetzten β,β -Carotins fasst Tabelle 2-5 zusammen.

Tab. 2-5 Produktbildung und Abbaurate (in 14 h) bei Umsetzung von β,β -Carotin mit Kulturmedien

Art	Abbaurate [%]	flüchtige Abbauprodukte
Blindwert	<8	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	9	-
<i>Cyathus pallidus</i>	85	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	24	-
<i>Hypomyces odoratus</i>	9	-
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	95	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	10	-
<i>Lepista irina</i>	>99	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Marasmius scorodonius</i>	93	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Phaffia rhodozyma</i>	7	-
<i>Trametes suaveolens</i>	60	-
<i>Trametes versicolor</i>	98	β -Ionon, Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon

Cyathus pallidus und *Trametes suaveolens* bauten β,β -Carotin weitgehend ab, jedoch konnten hier keine flüchtigen Metabolite nachgewiesen werden. Bei *Ischnoderma benzoinum*, *Lepista irina*, *Marasmius scorodoni* und *Trametes versicolor* wurden dagegen verschiedene β,β -Carotin-Abbauprodukte detektiert (Tab. 2-6). In den zellfreien Kulturmedien der Pilze ohne Zusatz der β,β -Carotin-Emulsion waren diese Produkte nicht nachweisbar, wodurch eine *de novo* Synthese ausgeschlossen werden konnte. Da als Standardsubstanz nur β -Ionon zur Verfügung stand, wurden die Responsfaktoren zur Quantifizierung der Verbindungen 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon, Dihydroactinidiolid und β -Cyclocitral gleich eins gesetzt.

Tab. 2-6 Quantifizierung flüchtiger β,β -Carotin-Abbauprodukte in mol% bezogen auf eingesetztes β,β -Carotin (Inkubationszeit: 14 h) (n.b. = nicht bestimmt)

Art	β -Ionon	2-Hydroxy- 2,6,6-Trimethyl- cyclohexanon	Dihydro- actinidiolid	β -Cyclocitral
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	8	5	n.b.	n.b.
<i>Lepista irina</i>	13	6	4	2
<i>Marasmius scorodoni</i>	8	n.b.	4	n.b.
<i>Trametes versicolor</i>	10	6	4	2

In allen vier Fällen war β -Ionon Hauptprodukt der Biotransformation. Ein typisches Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse zeigt Abbildung 2.6. Bemerkenswert war, dass alle Kulturen, die im Screening in Submerskultur das Abbauprodukt Dihydroactinidiolid produzierten, im zellfreien Screening keine Bildung flüchtiger Metabolite erkennen ließen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

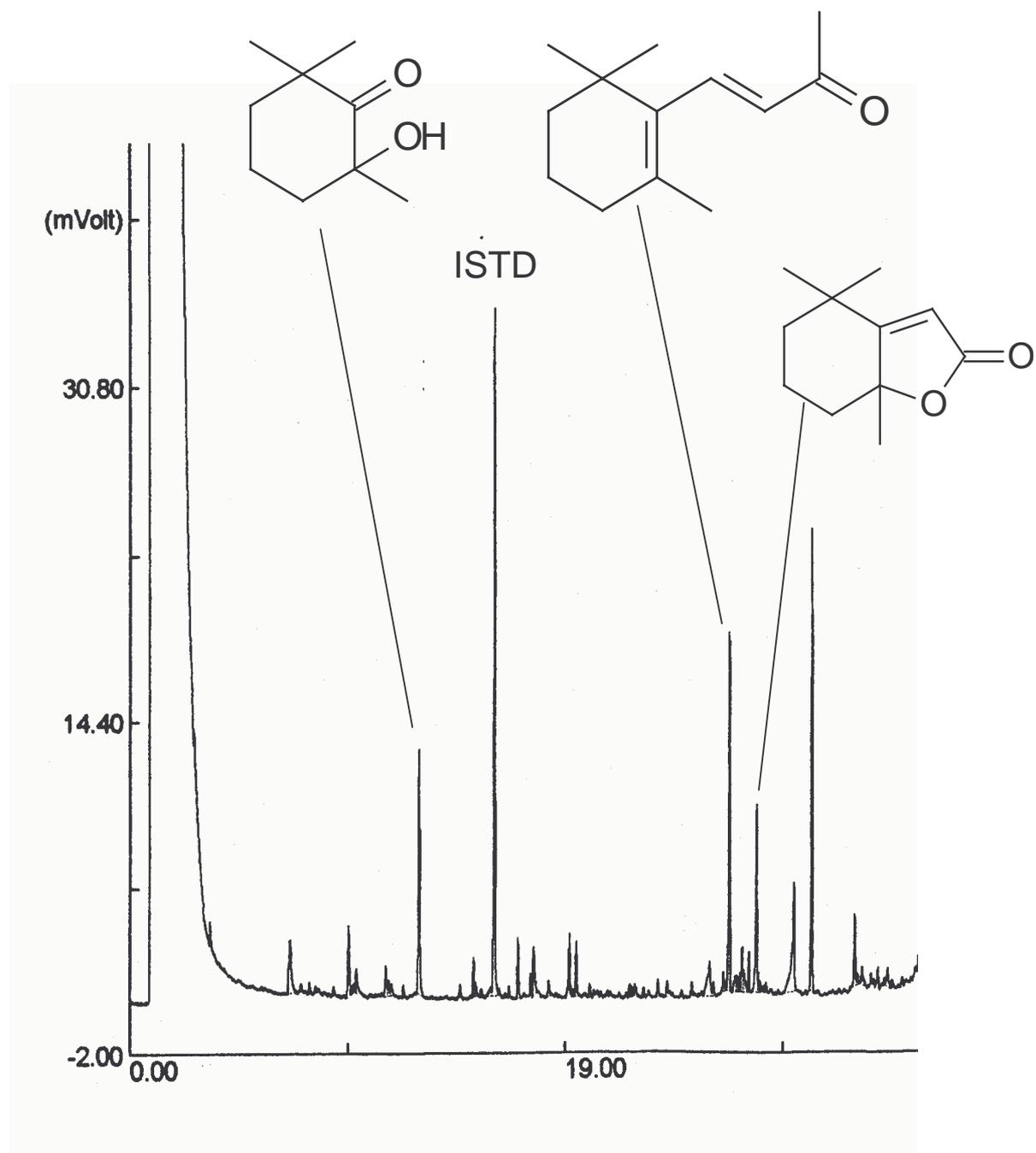


Abb.2.6

GC-Chromatogramm der flüchtigen Nor-Isoprenoide aus dem β,β -Carotin-
Abbau durch *Lepista irina*

2.2.5 Zusammenfassung

51 Pilze wurden auf ihr Potential zur Bildung von aromarelevanten Nor-Isoprenoiden durch den Abbau von β,β -Carotin untersucht. *Lepista irina*, *Marasmius scorodoni*, *Ischnoderma benzoinum* und *Trametes versicolor* setzten das Substrat in zellfreien Ansätzen zu β -Ionon als Hauptprodukt um. *Hypomyces odoratus*, *Ganoderma applanatum*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Trametes suaveolens* zeigten in zellhaltigen Versuchen die Bildung von Dihydroactinidiolid.

2.3 Untersuchung des Carotinoid-Abbaus

2.3.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur

2.3.1.1 Carotin-Abbau durch *Hypomyces odoratus*

Die Untersuchung des β,β -Carotin-Abbaus im Verlauf der Kultivierung erfolgte mit einem Stamm aus der Gruppe der Pilze, die im Submerskultur-Screening Dihydroactinidiolid bildeten. Da Dihydroactinidiolid möglicherweise ein Sekundärprodukt der Carotin-Spaltung darstellt, wurde verstärkt Augenmerk auf die Erfassung potentieller Intermediate gelegt. Um alle potentiellen Zwischenprodukte zu erfassen, wurden Medium und Mycel untersucht. Außerdem erfolgte abweichend von den Screening-Versuchen die erste Probenahme bereits nach 24 Stunden Kultivierung.

Beim Screening in Submerskultur reicherte sich β,β -Carotin im Verlauf der Kultivierung in den lipophilen Zellmembranen der stetig zunehmenden Biomasse an. In den ersten Stunden und Tagen der Kultivierung war zunächst wenig Biomasse vorhanden, die das Substrat aufnehmen konnte. Um eine ausreichende Bioverfügbarkeit von β,β -Carotin zu gewährleisten, wurde der Emulgatoranteil im Vergleich zu den Screening-Versuchen erhöht.

Für diesen Versuch wurde der Ascomycet *Hypomyces odoratus* ausgewählt, der sich durch relativ rasches Wachstum auszeichnete. Der Pilz bildete außerdem im Unterschied zu anderen Vertretern aus dieser Gruppe keine Exopolysaccharide, welche die Aufarbeitung erschweren. Zur Enzyminduktion wurde auf β,β -Carotin-haltigen Agarplatten vorkultiviert. Die Anzucht der experimentellen Kulturen erfolgte in β,β -Carotin-Medium nach 4.5.1.1. Es wurden jeweils Kulturkolben, die 12,5 mg solubilisiertes β,β -Carotin in 250 mL Medium enthielten, mit Mycel beimpft. Die Probenahme erfolgte nach 1, 3, 6, 9 und 13 Tagen. Nach Trennung von Mycel und Kulturmedium wurde die Biomasse nach 4.6.2 aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte enzyminhibierend mit einem Methanol/ Wasser-Gemisch um Artefaktbildung während der Aufarbeitung auszuschließen. Das Medium wurde wie unter 4.6.1 aufgearbeitet. Die Analytik erfolgte nach 4.7.1.1 und 4.7.2.

Um das Wachstum während der Kultivierung in β,β -Carotin-Medium zu überprüfen und die zur Umsetzung des β,β -Carotins nötige Biomasse zu bestimmen, wurde die Feuchtmasse vor dem Aufschluss ausgewogen (Abb. 2.7). Abbildung 2.8 gibt den β,β -Carotin-Abbau während des Kulturverlaufes von *Hypomyces odoratus* im Medium und Mycel wieder.

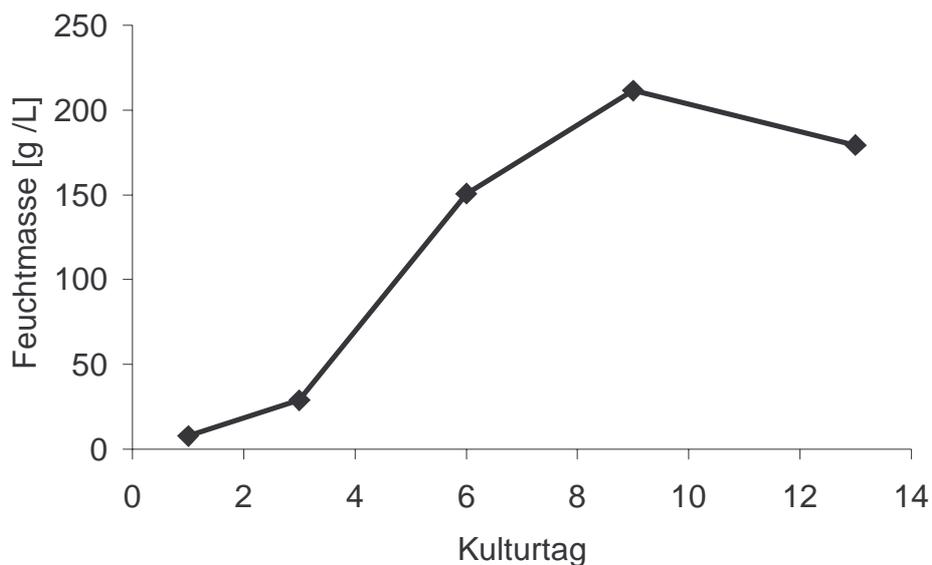


Abb. 2.7

Feuchtmasse während des Kulturverlaufes von *Hypomyces odoratus* in β,β -Carotin-Medium

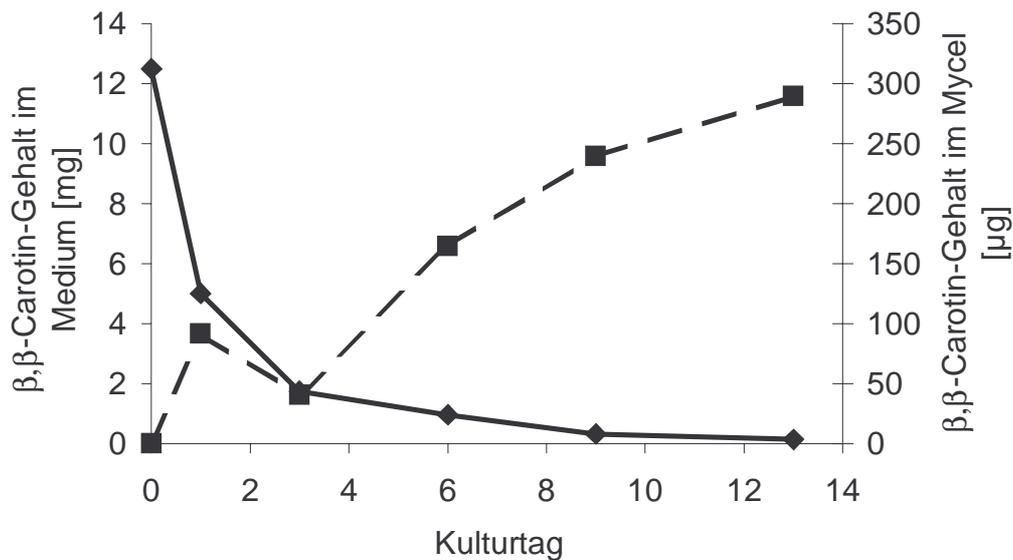


Abb. 2.8 β,β -Carotin-Gehalt im Medium (—◆—) und Mycel (- -■- -) von *Hypomyces odoratus*

Bereits nach 24 Stunden Kultivierung war ein signifikanter β,β -Carotin-Abbau zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass bereits bei geringen Zelldichten (Feuchtmasse 8 g L^{-1}) Enzymaktivität vorhanden war. Das Substrat lag in den ersten 24 Stunden der Kultivierung im 50-fachen Überschuss im Medium vor. Jedoch nahm der Anteil des β,β -Carotins im Mycel im Verlauf der Kultivierung durch die Bildung von Biomasse und die Anreicherung des Substrates in den lipophilen Zellmembranen zu. In der Kultur von *Hypomyces odoratus* blieben bis zum letzten Probenahmetag β,β -Carotin-Mengen von etwa 1 mg unverbraucht.

Neben Dihydroactinidiolid wurden im Medium auch geringe Mengen an β -Ionon nachgewiesen (Abb. 2.9). Die entsprechenden Werte im Mycel lagen zu allen Zeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,3 mol%.

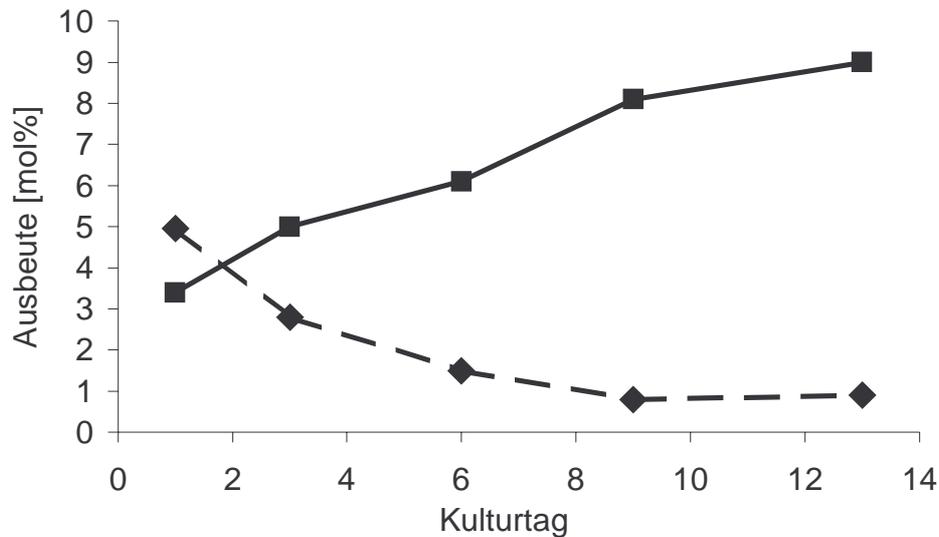
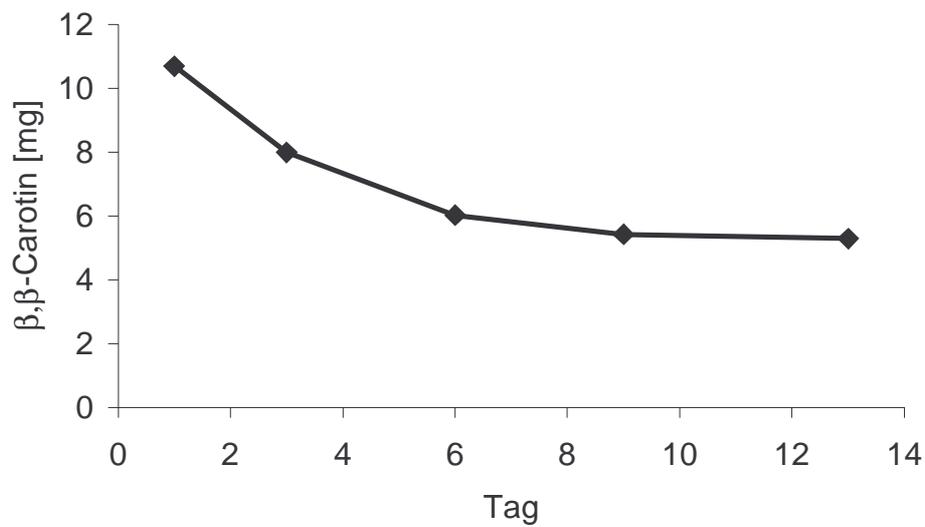
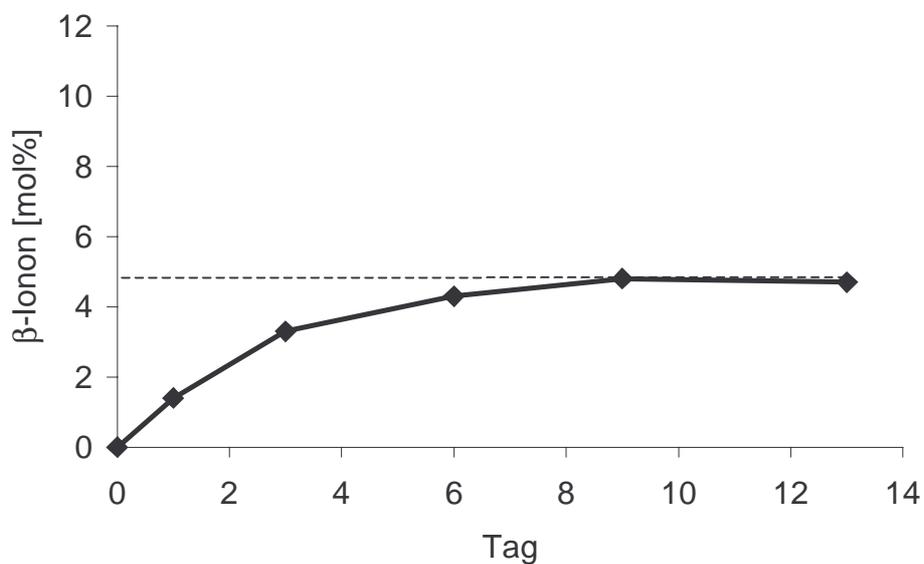


Abb. 2.9 Gehalt an β -Ionon und Dihydroactinidiolid während der Kultivierung von *Hypomyces odoratus* bezogen auf eingesetztes β,β -Carotin (- \blacklozenge - β -Ionon, — \blacksquare — Dihydroactinidiolid)

2.3.1.2 Blindversuche

Als typische Polyene sind Carotinoide sehr empfindlich gegen Wärme und Luftsauerstoff. Darüber hinaus können Medienbestandteile wie z.B. Eisensalze autoxidative Prozesse fördern. β -Ionon ist als thermisches Abbauprodukt von β,β -Carotin in wässrigem Medium bekannt (Kanasawud und Crouzet 1990). Als Autoxidationsprodukte bei 20 °C unter Sauerstoff sind außerdem Dihydroactinidiolid, 5,6-Epoxy- β -Ionon, β -Cyclocitral und 2,2,6-Trimethyl-cyclohexan-carboxaldehyd beschrieben (Beatriz und Gloria 1993). Mit einem Blindversuch sollte geprüft werden, in welchem Maßstab unter den eigenen Bedingungen mit einer Autoxidation zu rechnen war.

Hierzu wurde nicht beimpftes β,β -Carotin-Medium an verschiedenen Probenahmetagen extraktiv aufgearbeitet und chromatographisch untersucht (siehe 4.5.1.2). Es wurden 12,5 mg solubilisiertes β,β -Carotin je 250 mL Medium eingesetzt (Abb. 2.10 und 2.11).

Abb. 2.10 β,β -Carotin-Gehalt im BlindversuchAbb. 2.11 β -Ionon-Gehalt im Blindversuch bezogen auf eingesetztes β,β -Carotin

Aufgrund der höheren Emulgator-Konzentration war das Substrat in diesem Ansatz oxidationsempfindlicher als in den Versuchen zum Screening in Submerskultur, was auf eine Oberflächenvergrößerung zurückzuführen ist. Die β,β -Carotin-Konzentration fiel bis zum dritten Tag steil ab und der Abbau stagnierte erst, nachdem etwa 50 %

des Initialgehaltes umgesetzt waren. Entsprechend stieg der Gehalt an β -Ionon bis zum dritten Tag und erreichte schließlich etwa 5 mol%. Der auf diese Weise ermittelte chemische Blindwert kann aber nur als grober Anhaltspunkt dienen. Es ist zu erwarten, dass in einer aktiven Kultur durch die erhöhte Sauerstoffzehrung andere Verhältnisse vorliegen. Daher wurden die Werte für den β,β -Carotin-Abbau bzw. die Produktbildung während des Kulturverlaufes von *Hypomyces odoratus* nicht um den Blindwert korrigiert.

2.3.1.3 Transformation von β -Ionon durch *Hypomyces odoratus*

Um zu untersuchen, ob β -Ionon einen direkten Precursor für Dihydroactinidiolid darstellt, wurden Kulturen von *Hypomyces odoratus* mit je 1 μmol β -Ionon versetzt (siehe 4.5.1.3). Diese Menge entsprach etwa dem während des β,β -Carotin-Abbaus entstandenen Anteil. Das von der Biomasse befreite Medium wurde extraktiv aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht. Abbildung 2.12 zeigt den relativen Gehalt der im Medium nachweisbaren flüchtigen Substanzen bezogen auf eingesetztes β -Ionon.

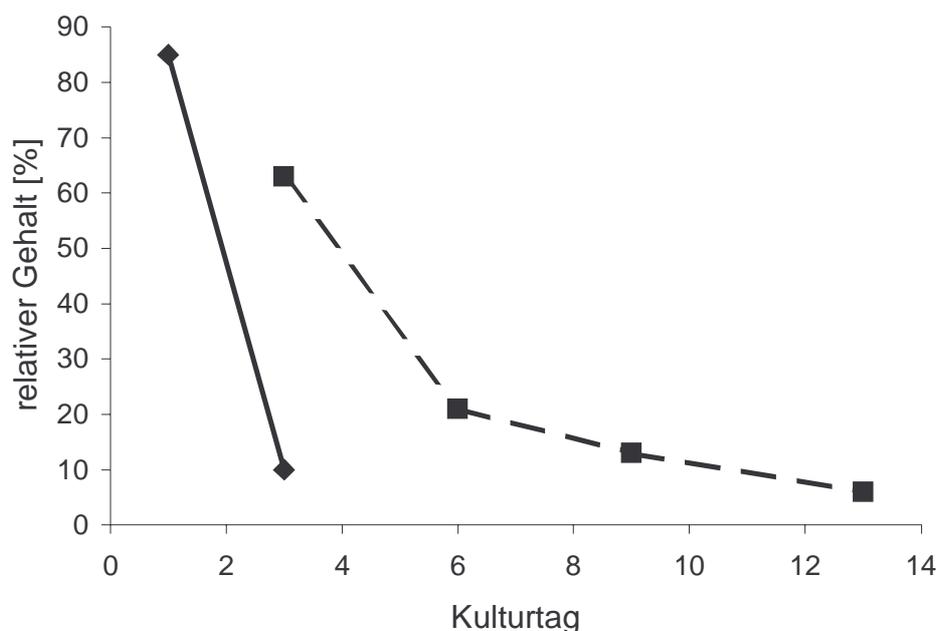


Abb. 2.12

Transformation von β -Ionon durch *Hypomyces odoratus* Gehalt an β -Ionon (—◆—) und 7,8-Dihydro- β -Ionon (- -■ -) bezogen auf eingesetztes β -Ionon

Als einziges Transformations-Produkt wurde 7,8-Dihydro- β -Ionon nachgewiesen. Bereits nach einer Kulturdauer von drei Tagen war β -Ionon bis auf 10 % der eingesetzten Menge hydriert. Im weiteren Verlauf der Kultivierung sank auch der Gehalt von 7,8-Dihydro- β -Ionon ab, was vermutlich auf eine Weitermetabolisierung zurückzuführen ist.

2.3.2 Umsetzungen von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien

2.3.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten β,β -Carotin-Abbau tatsächlich um einen enzymatischen Prozess handelt, wurde das zellfreie Medium einer Ultrafiltration unterzogen. Diese Methode bietet einen effizienteren Nachweis für die enzymatische Aktivität, als das Erhitzen des Mediums, da bei der Ultrafiltration keine chemischen Veränderungen der Probelösung wie z.B. die Zerstörung von Peroxiden auftreten können. Bei einer gewählten Ausschlussgrenze von 10 kDa wurde das Medium im Verhältnis 1:10 aufkonzentriert. Sowohl mit dem rückverdünnten Retentat als auch mit dem Permeat wurde ein Umsatz von solubilisiertem β,β -Carotin durchgeführt (siehe 4.5.2.1). Die Analyse der Extrakte zeigte für das Permeat einen β,β -Carotin-Abbau im Bereich des Blindwertes, während für das Retentat ein deutlicher Abbau sowie das Auftreten flüchtiger Spaltprodukte nachgewiesen wurde (Tab. 2-7).

Tab. 2-7 Abbau und Produktbildung bei der Umsetzung von β,β -Carotin mit durch Ultrafiltration aufkonzentrierten Kulturmedien (Inkubationszeit: 14 h)

	Abbau [%]	flüchtige Abbauprodukte
Retentat <i>Lepista irina</i>	93	β -Ionon (8 mol%), Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6,-Trimethylcyclohexanon
Permeat <i>Lepista irina</i>	10	-
Retentat <i>Marasmius scorodoni</i>	54	β -Ionon (5 mol%), Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6,-Trimethylcyclohexanon
Permeat <i>Marasmius scorodoni</i>	16	-

Die im Vergleich zu den vorausgegangenen zellfreien Umsetzungen geringeren Abbauraten und Produktausbeuten sind vermutlich auf Adsorptionsverluste von Proteinen an der Ultrafiltrations-Membran zurückzuführen.

2.3.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus

Das zellfreie Medium einer Submerskultur von *Lepista irina* wurde mit 2 mg solubilisiertem β,β -Carotin versetzt und inkubiert (siehe 4.5.2.2). Nach 30 Minuten, 1, 2, 3 und 6 Stunden wurde die Reaktion gestoppt und die Mischung extraktiv aufgearbeitet (Abb. 2.13).

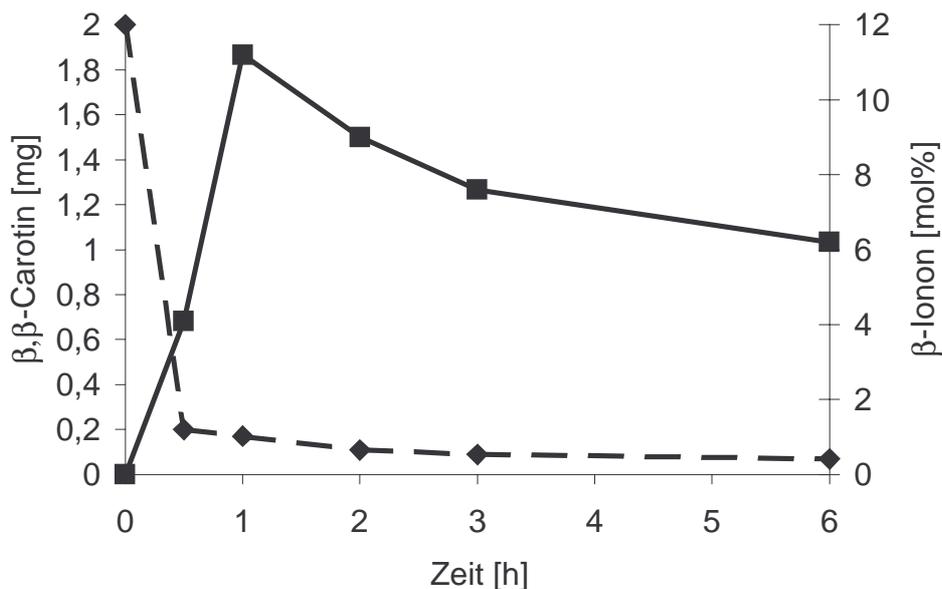


Abb. 2.13 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus (---◆---) und der β -Ionon-Bildung (—■—) in zellfreiem Kulturmedium von *Lepista irina*

Bereits nach 30 Minuten war das Substrat nahezu vollständig abgebaut. Das Maximum der β -Ionon-Konzentration trat nach einer Stunde auf.

2.3.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin

Um die Substratspezifität der am Abbau beteiligten Enzyme zu untersuchen und festzustellen, ob auf diesem Wege auch andere interessante Aromastoffe wie α -Ionon biotechnologisch zugänglich sind, wurde β,ϵ -Carotin (α -Carotin) mit zellfreiem Kulturmedium von *Lepista irina* umgesetzt (siehe 4.5.2.3).

β,ϵ -Carotin wurde aus Pflanzenmaterial isoliert. Unter den möglichen pflanzlichen β,ϵ -Carotin-Quellen wurden Karotten ausgewählt, da sie mit etwa 3,3 mg/100 g einen vergleichsweise hohen Gehalt an β,ϵ -Carotin aufweisen (Souci 1991; Mangles 1993). Da Carotinoide sehr empfindlich für Licht oder thermisch induzierte Isomerisierungen und Oxidationen sind, wurde die Extraktion unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Alle Zwischenprodukte wurden bei -20°C unter Stickstoff gelagert. Auf die Verwendung möglicherweise peroxidhaltiger Lösungsmittel wie Diethylether wurde

verzichtet. Durch Extraktion von 1 kg frischer Karotten und anschließender Verseifung wurden 310 mg Extrakt erhalten. Die Analytik mittels HPLC ergab einen Gehalt von 0,5 mg β,ϵ -Carotin in 10 mg Extrakt.

Karotten enthalten in Abhängigkeit von der Lagerungszeit geringe Mengen α - und β -Ionon (Linko et al. 1978). Im Extrakt der frischen Karotten waren diese Bestandteile jedoch nicht nachweisbar.

Für die Herstellung der wässrigen β,β -Carotin-Lösung aus Karottenextrakt war ein Extrakt / Tween 40 Verhältnis von 1:10 ausreichend, da nicht abgetrennte unverseifbare Bestandteile, wie z.B. Phytosterine die Solubilisierung erleichterten.

Zur Inkubation mit zellfreiem Kulturüberstand von *Lepista irina* wurden 10 mg des Karottenextraktes eingesetzt. Im Blindversuch wurde Standard-Nähr-Medium mit der entsprechenden Menge solubiliertem Extrakt versetzt. Nach der Inkubation konnten 15 mol% α -Ionon und 6 mol% β -Ionon nachgewiesen werden. β,ϵ -Carotin war zu 85 % und β,β -Carotin zu 89 % abgebaut.

2.3.2.4 Untersuchung auf Apo-Carotinoide

Die Umsetzungen von β,β -Carotin mit zellfreiem Medium von *Lepista irina* wurden flüssigchromatographisch auf längerkettige Apo-Carotinoide untersucht (siehe 4.7.1.2). Die dafür angewandte HPLC-Methode erlaubte eine gute Trennung von nicht flüchtigen Nor-Carotinoiden (Barua und Olson 2000). Bei der Detektion mittels DAD erschienen aber nur Spuren von längerkettigen β,β -Carotin-Bruchstücken. Bei der Untersuchung der Proben mittels LC/MS konnten geringe, nicht quantifizierbare Mengen des β -Apo-10'-Carotinal nachgewiesen werden (Abb. 2.14).

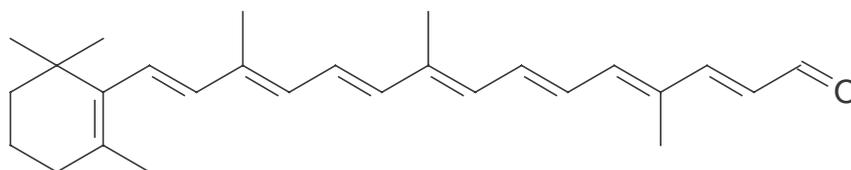


Abb. 2.14

β -Apo-10'-Carotinal

2.3.2.5 Überprüfung der Analytik

Zur Kontrolle der angewandten analytischen Methoden wurde zunächst die Wiederfindungsrate von β -Ionon bei der Flüssig/Flüssig Extraktion bestimmt. Dazu wurde Standard-Nähr-Medium mit der gleichen Menge Tween 40 versetzt, die auch bei den Umsetzungen von β,β -Carotin verwendet worden war. Nach Zugabe von β -Ionon wurde extrahiert (siehe 4.6.1). Die Wiederfindungsrate lag bei 94,3 %.

Zur Ermittlung des Verlustes von β -Ionon über die Gasphase wurde das mit Tween 40 und β -Ionon versetzte Medium im Kolben unter Kultivierungsbedingungen (24°C, 150 rpm) geschüttelt und jeweils nach 1, 3, 6, 9 und 13 Tagen extraktiv aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht. Abbildung 2.15 zeigt, dass nach 13 Tagen noch nahezu 70 % des eingesetzten β -Ionons im Extrakt nachgewiesen werden konnten.

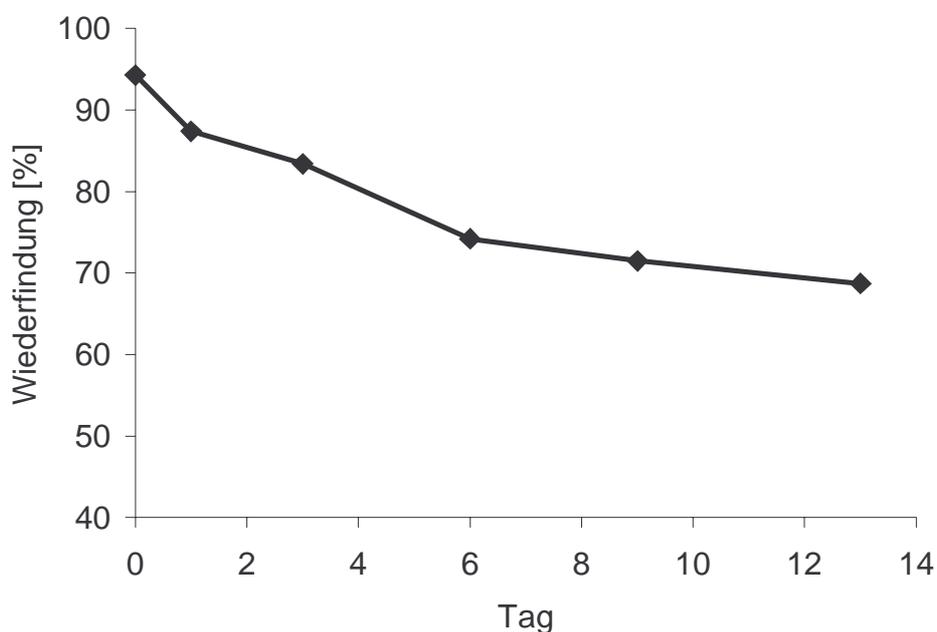


Abb. 2.15

Bilanzierung des Verlustes an β -Ionon über die Gasphase

2.3.3 Zusammenfassung

Untersuchungen in zellhaltigen Kulturen von *Hypomyces odoratus* zeigten bereits zu Beginn der Kultivierung einen β,β -Carotin-Abbau und eine Bildung von flüchtigen Produkten.

Umsetzungen von β,β -Carotin mit zellfreiem Kulturmedium, welches durch Ultrafiltration von kleineren Molekülen befreit wurde, belegten das Vorhandensein von Exoenzymen bei *Lepista irina* und *Marasmius scorodonius*. Bereits nach 30 Minuten wurde β,β -Carotin durch Kulturüberstände von *Lepista irina* nahezu vollständig abgebaut. β,ϵ -Carotin wurde zu α -Ionon gespalten.

2.4 Enzym-Charakterisierung und -Reinigung

2.4.1 Entwicklung eines Assays zur Messung der enzymatischen Aktivität

Zur Charakterisierung des Enzyms und zum Verfolgen der Aufreinigung war ein System zu schnellen und zuverlässigen Messung der Aktivität nötig. Proteinhaltige Probelösungen wurden mit wässriger β,β -Carotin-Lösung nach 4.10.1 vermischt und die Extinktionsabnahme spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen.

Bei ersten orientierenden Messungen des unverdünnten zellfreien Nährmediums einer *Lepista irina* Kultur war in 60 min eine Abnahme von bis zu 0,5 Extinktionseinheiten zu verzeichnen. Für den Blindwert wurde das Permeat von ultrafiltriertem Medium einer *Lepista irina* Kultur verwendet (Ausschlussgrenze 10 kDa). Hier betrug die Extinktionsabnahme 0,02 Einheiten in 60 min. Eine Assay-Zeit von 10 min erwies sich für die Messung der Enzymaktivität als ausreichend (Abb. 2.16).

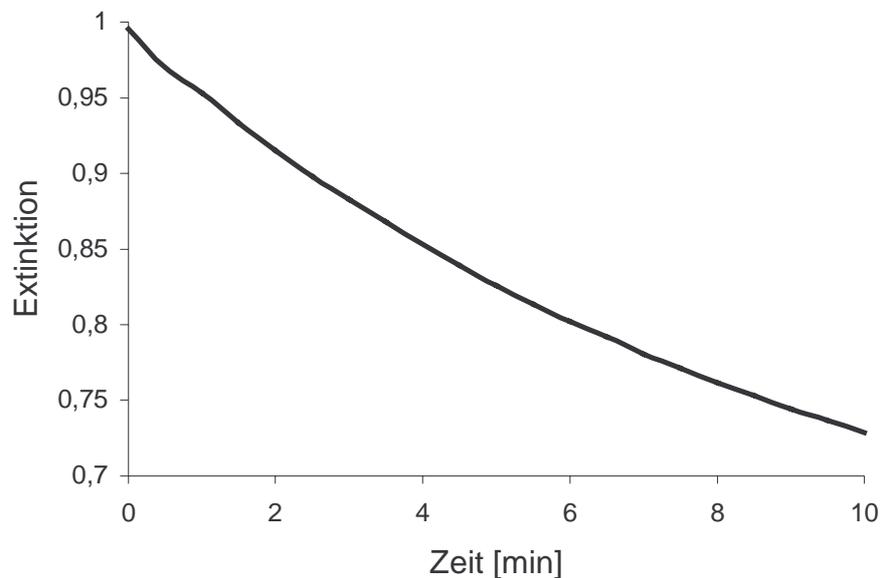


Abb. 2.16

Messung der Enzymaktivität in der β,β -Carotin enthaltenden Probelösung

2.4.1.1 Überprüfung der Anwendbarkeit des Tests

Für einen Enzymtest muss die Änderung der Extinktion mit der Zeit linear sein. Dieses Kriterium war bei ausreichend verdünnten Proben, die eine Extinktionsabnahme von bis zu 0,1 Einheiten in 10 min hervorriefen, erfüllt.

Eine weitere Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines Enzymtestes ist die Proportionalität zwischen Umsatzrate und Proteinkonzentration (Suelter 1990). Zur Überprüfung dieses Kriteriums wurden verschiedene Volumina des durch Ultrafiltration aufkonzentrierten Mediums mit Pufferlösung verdünnt und gemessen (Abb. 2.17). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass das pH-Optimum des Enzyms im sauren Bereich liegt. Daher wurde zunächst ein Citronensäure/Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 verwendet. In hinreichend verdünnten Lösungen bestand die gewünschte Proportionalität zwischen dem Volumen der eingesetzten Proteinprobe und der gemessenen Aktivität.

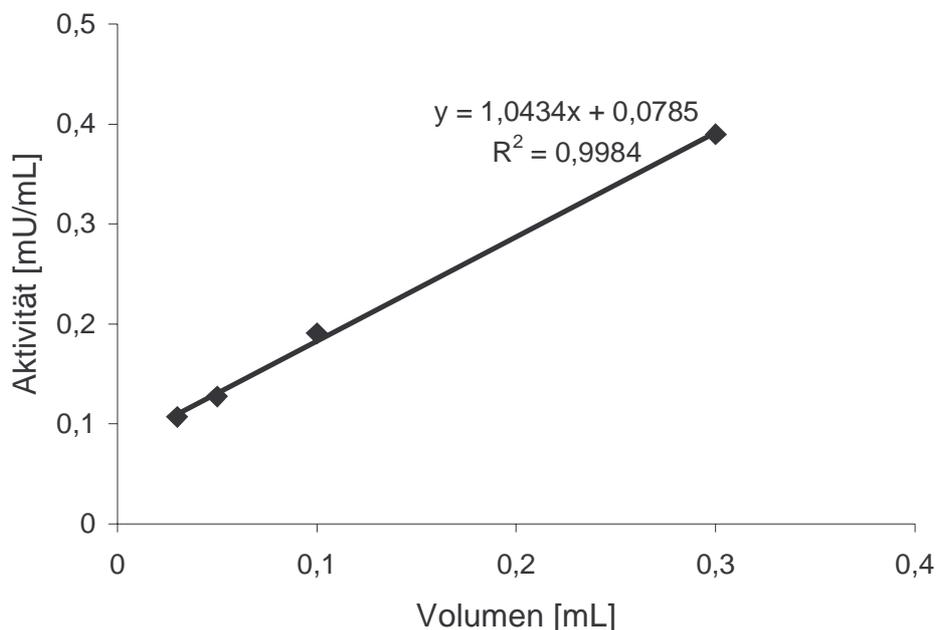


Abb. 2.17 Korrelation zwischen Volumen der eingesetzten Proteinprobe und Volumenaktivität

2.4.2 Enzymcharakterisierung

2.4.2.1 Enzymaktivität während des Kulturverlaufes

Enzymaktivität und Proteinkonzentration wurden im Verlauf der Kultivierung von *Lepista irina* in zellfreiem Nährmedium gemessen, um den optimalen Zeitpunkt für die Isolierung und Reinigung des Enzyms zu bestimmen. Da Temperatur- und pH-Optimum des Enzyms noch nicht bekannt waren, wurde der Kulturüberstand mit Citronensäure/Phosphat-Puffer auf pH 5,5 eingestellt und die Aktivität bei 24°C im temperierbaren Küvettenhalter photometrisch bestimmt.

Biomasse, Gesamtproteingehalt und Enzymaktivität waren in der ersten Woche der Kultivierung gering, wie die Abbildungen 2.18 und 2.19 zeigen. Erst ab dem achten Kulturtag nahmen Biomasse, Proteingehalt und Enzymaktivität zu.

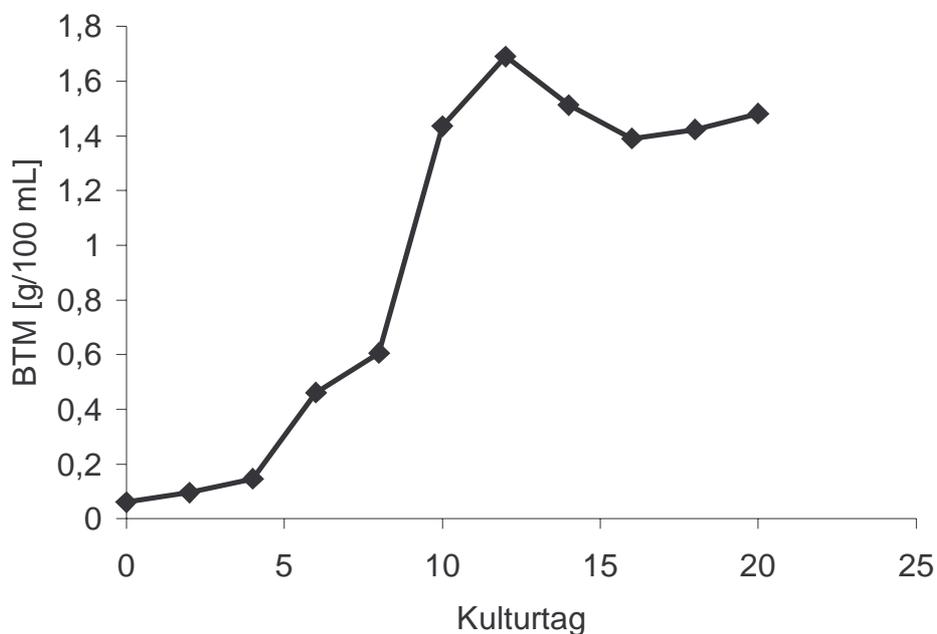


Abb. 2.18

Biologische Trockenmasse während des Kulturverlaufs von *Lepista irina*

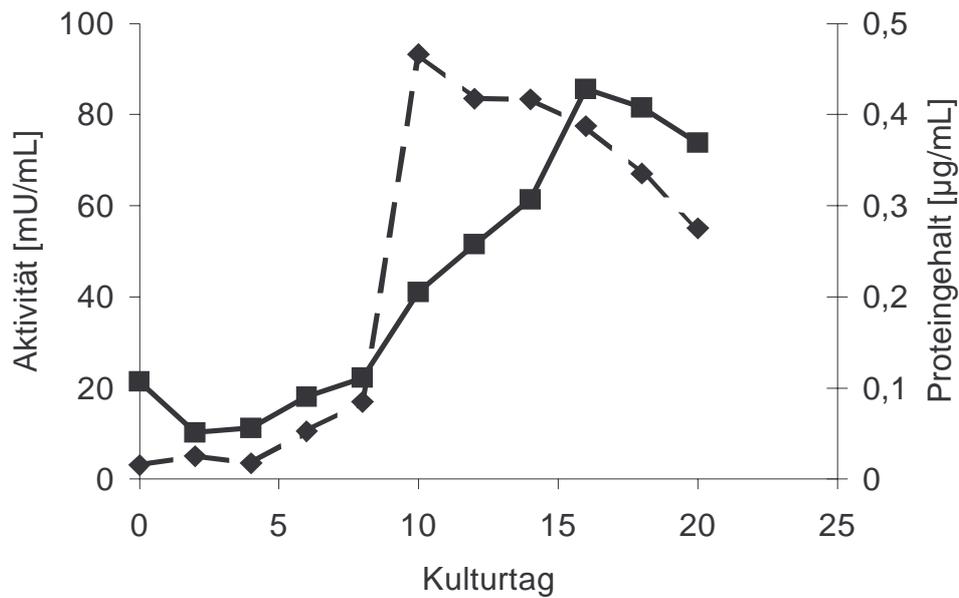


Abb. 2.19 Proteingehalt (—■—) und Volumenaktivität (- -◆- -) im Medium während des Kulturverlaufs von *Lepista irina*

Für die Aufreinigung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms sollte eine möglichst hohe spezifische Aktivität im Medium vorhanden sein. Abbildung 2.20 veranschaulicht die Änderung der spezifischen Aktivität im Verlauf der Kultivierung. Das Maximum lag am zehnten Kulturtag. Alle folgenden Versuche zur Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins wurden daher mit zellfreiem Medium einer Kultur von *Lepista irina* vom zehnten Kulturtag durchgeführt.

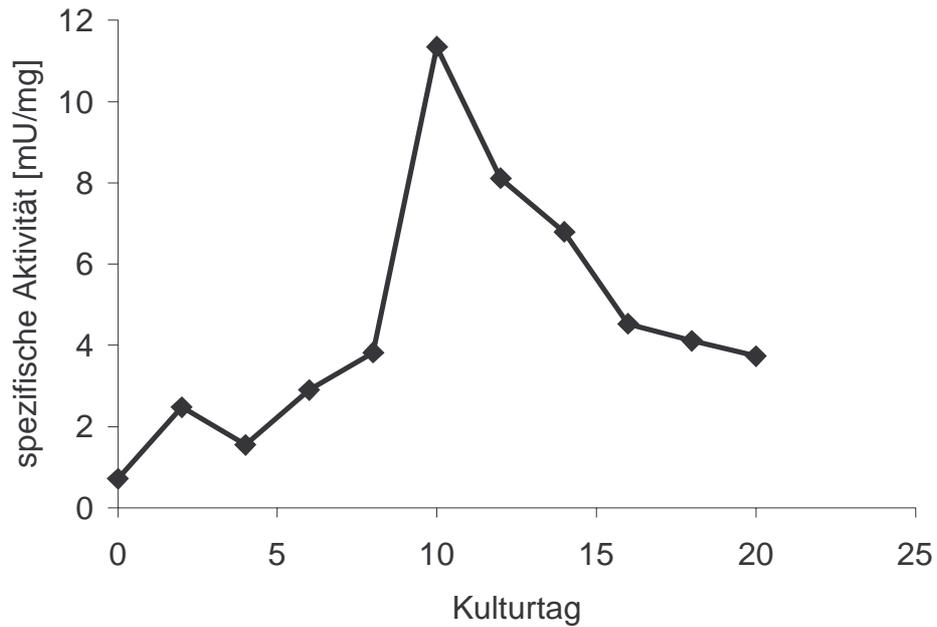


Abb. 2.20 Spezifische Enzymaktivität im Medium während des Kulturverlaufes von *Lepista irina*

2.4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde die Aktivität des zellfreien Mediums einer *Lepista irina* Kultur bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Das ermittelte pH-Optimum des Zielenzyms lag etwa bei 3,5 bis 3,7 (Abb. 2.21).

Im Verlauf der Kultivierung von *Lepista irina* stellte sich ein pH-Wert von 4,0 bis 4,5 ein. Alle folgenden Aktivitätsmessungen wurden bei einem pH-Wert von 3,5 durchgeführt.

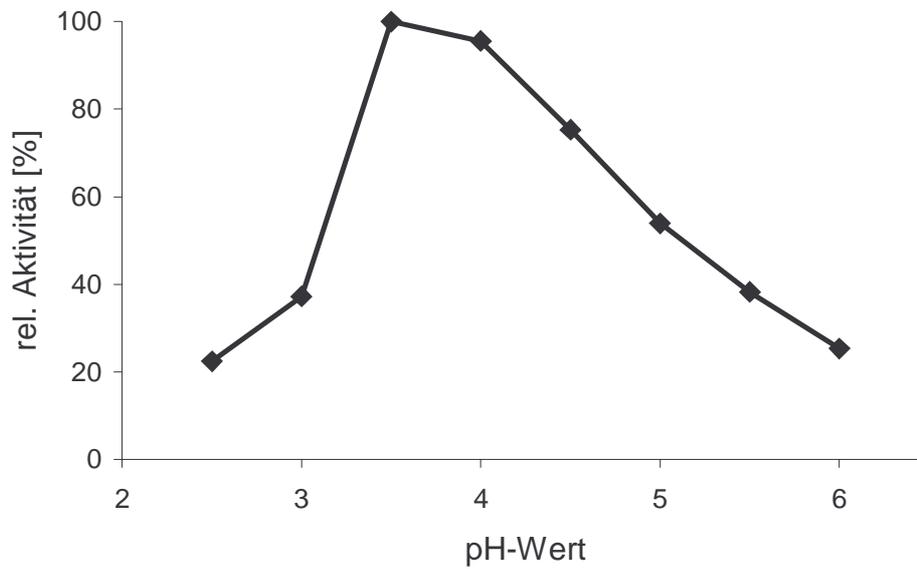


Abb. 2.21 pH-Optimum des Enzyms aus *Lepista irina*

2.4.2.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde die Aktivität des enzymhaltigen Mediums bei verschiedenen Temperaturen spektrophotometrisch gemessen. Das Temperatur-Optimum wurde zu 34°C ermittelt (Abb. 2.22). Bei allen folgenden Messungen der Enzymaktivität wurde eine Temperatur von 34°C eingestellt.

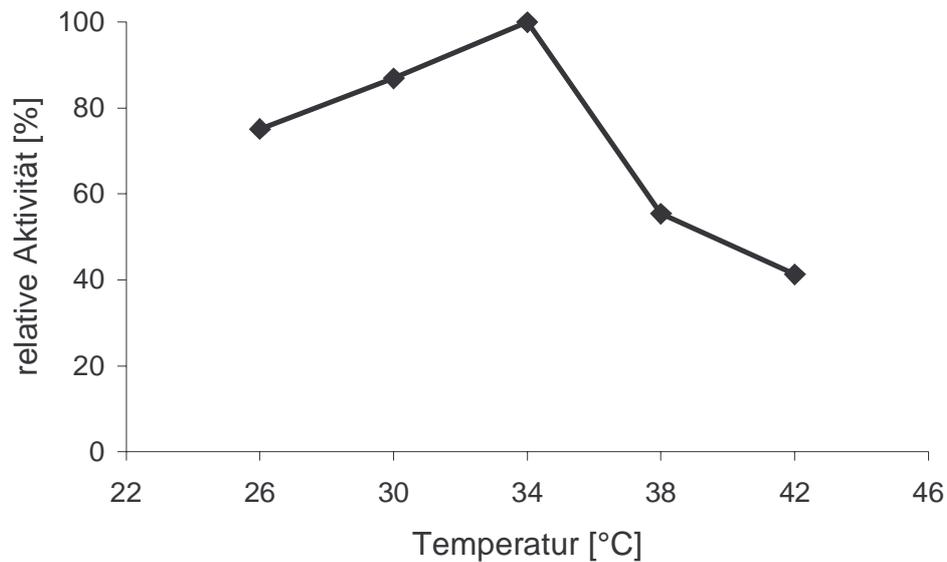


Abb. 2.22 Temperatur-Optimum des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms aus *Lepista irina*

2.4.2.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die nachfolgende Reinigung des Enzyms mittels Ionenaustauschchromatographie war die Kenntnis des isoelektrischen Punktes unerlässlich. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung und anschließender „Aktivitäts(ent)färbung“ (siehe 4.9.2). Für den pH-Gradienten wurde der Bereich pH 3 bis 10 gewählt. Nach der Elektrophorese wurde eine Gelhälfte nach Coomassie gefärbt, die andere wurde mit einem β,β -Carotin-haltigen Agarose-Gel bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 h bei 34°C zeichnete sich durch Bleichung des β,β -Carotins eine einzelne farblose Bande ab (Abb. 2.23). Nach der Markierung der entsprechenden Stelle auf dem IEF-Gel wurde auch diese Gelhälfte nach Coomassie gefärbt. Eine eindeutige Zuordnung der Bande konnte erreicht werden.

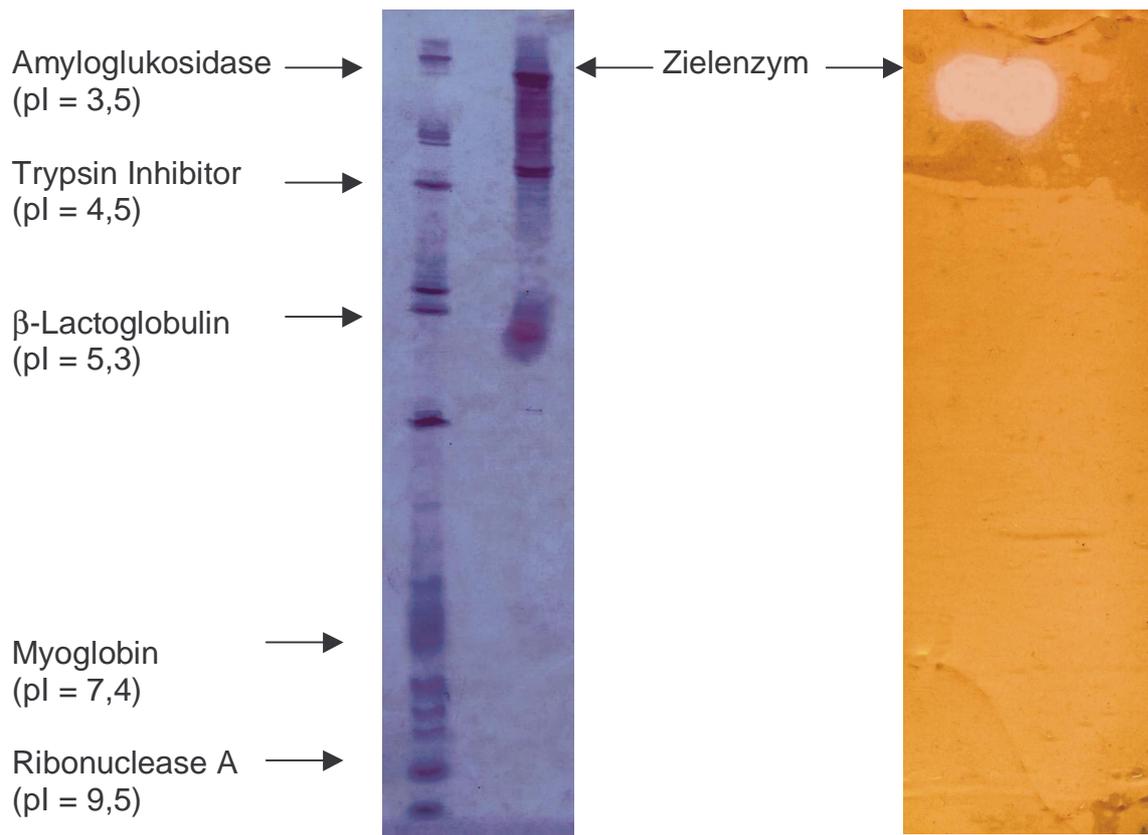


Abb. 2.23 Isoelektrische Fokussierung mit anschließender Aktivitäts(ent)färbung (links: Coomassie gefärbtes Gel mit Marker-Proteinmischung und Probe; rechts: Carotin-Gel nach Aktivitäts(ent)färbung)

Die Ermittlung des isoelektrischen Punktes erfolgte durch Auftragen der Retentionsfaktoren (R_F) von Standardproteinen gegen ihre pI-Werte (Abb. 2.24). Der isoelektrische Punkt des Proteins wurde zu 3,75 bestimmt.

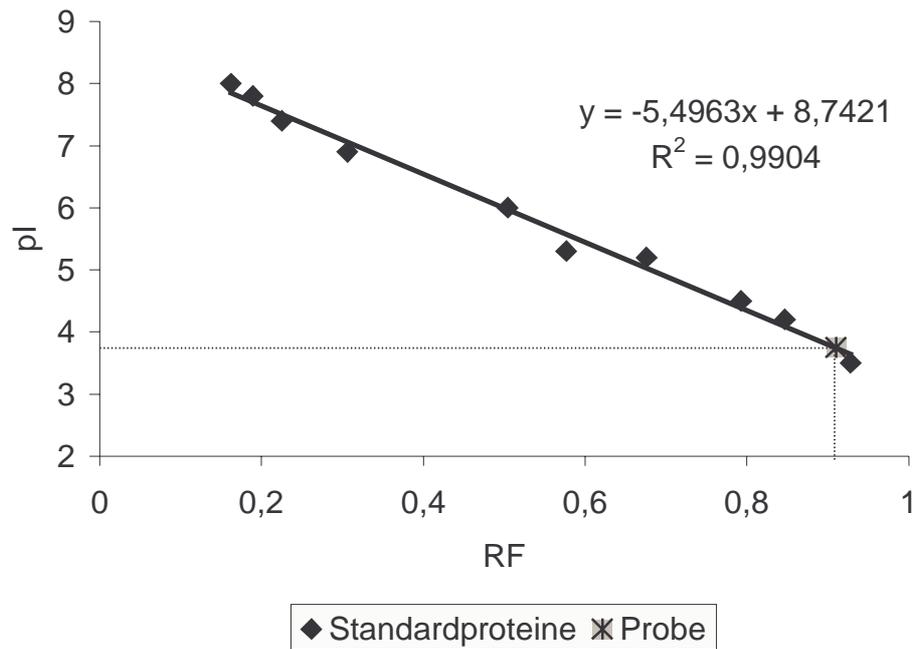


Abb. 2.24

Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels IEF

2.4.3 Enzymreinigung

Die Isolierung des Enzyms erfolgte aus Kulturüberständen von *Lepista irina* vom 10. Kulturtag, die durch Ultrafiltration aufkonzentriert wurden. Bei den chromatographischen Reinigungsschritten wurde die Elutionszeit des Zielmoleküls durch Messung der Aktivität in allen proteinhaltigen Fraktionen bestimmt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde zusätzlich durch die Bestimmung des Proteingehaltes (nach 4.10.2) verfolgt.

2.4.3.1 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Zum Aufkonzentrieren und ersten Reinigen des Zielenzym wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt (siehe 4.10.4.3). Das Zielprotein konnte in zwei Fraktionen bei einem Sättigungsgrad zwischen 45 % und 60 % sowie 60 % und 80 % weitgehend präzipitiert werden (Abb. 2.25). In beiden Fraktionen wurde aber eine geringe spezifische Aktivität gemessen (Abb. 2.26), so dass der Reinigungserfolg ungenügend erschien. Außerdem trat insgesamt ein

Aktivitätsverlust von etwa 40 % auf. Die Methode erwies sich somit als für die Enzymisolierung nicht geeignet. Daher wurde für die nachfolgenden chromatographischen Schritte das mittels Ultrafiltration aufkonzentrierte Nährmedium direkt eingesetzt.

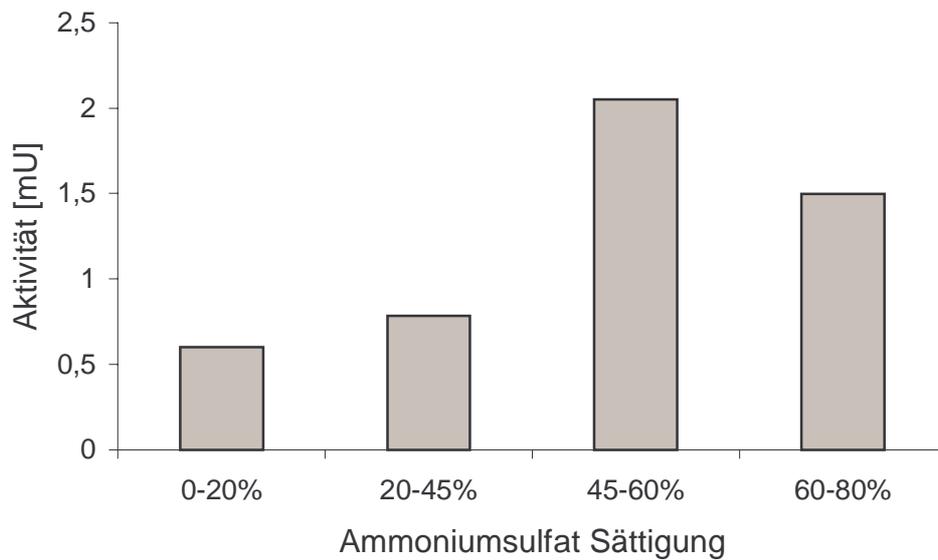


Abb. 2.25

Gesamtaktivität in den Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung

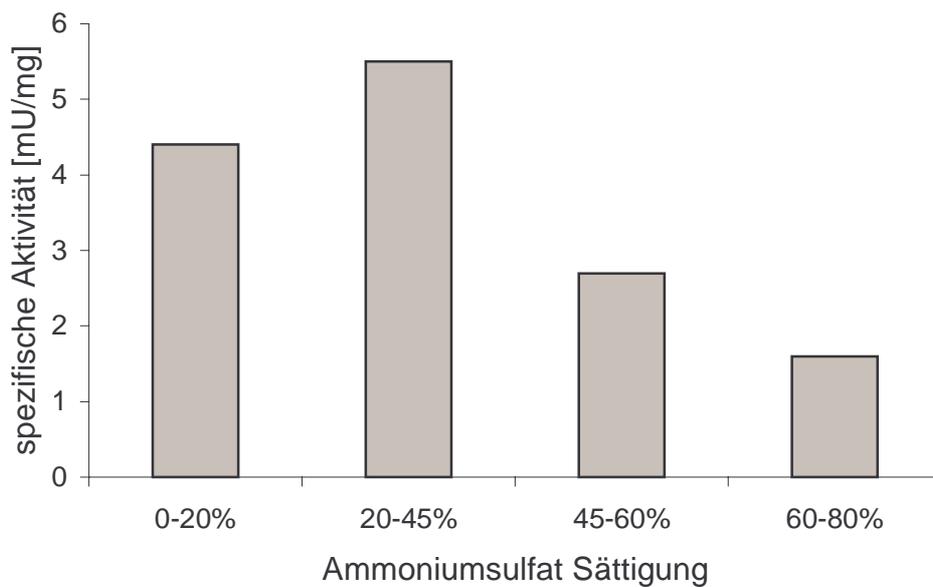


Abb. 2.26

Spezifische Aktivität in den Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung

2.4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

2.4.3.2.1 Vorversuche zur HIC

In Vorversuchen wurden verschiedene analytische HIC Säulen erprobt (siehe 4.10.4.4). Zur Verfügung standen unterschiedlich hoch substituierte Phenyl-Sepharose Säulen sowie eine Octyl- und eine Butyl-Sepharose Säule. Die Hydrophobizität der Trägermaterialien nimmt in der Reihenfolge Octyl-, Phenyl-, und Butyl-Sepharose ab. Das Protein wird unter Zusatz des antichaotropen Salzes Ammoniumsulfat an die Säulenmatrix gebunden und bei geringer Ionenstärke wieder eluiert. Der eingestellte pH-Wert von 3,5 lag nahe am isoelektrischen Punkt des Proteins und erleichterte damit die Bindung an die hydrophobe Matrix.

Bei Gebrauch der Octyl-Sepharose Säule wurde keine Elution des Zielproteins erreicht. Proteine können unter Umständen an die Octyl-Sepharose Säule so stark gebunden werden, dass sie kaum eluierbar sind (Deutscher 1990). Die Butyl-Sepharose Matrix ermöglichte dagegen unter den gegebenen Umständen keine Bindung. Erst bei Verwendung der hoch substituierten Phenyl-Sepharose Säule konnte das Zielprotein unter weitgehendem Aktivitätserhalt chromatographiert werden. Eine Bindung an ein relativ stark hydrophobes Trägermaterial steht im Einklang mit den Ergebnissen der Ammoniumsulfat-Fällung, die gezeigt hatten, dass das Zielprotein mittel bis schwach hydrophob ist.

2.4.3.2.2 Scale up

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde an einer präparativen, hoch substituierten Phenyl Sepharose Säule durchgeführt. Das Zielprotein wurde bei einem pH-Wert von 3,5 und einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 1 mol L^{-1} an die Matrix gebunden und mit abnehmender Ionenstärke eluiert. Die Enzymaktivität blieb zu über 85 % erhalten. Abbildung 2.27 zeigt das Chromatogramm der HIC mit unterlegtem Aktivitätsprofil.

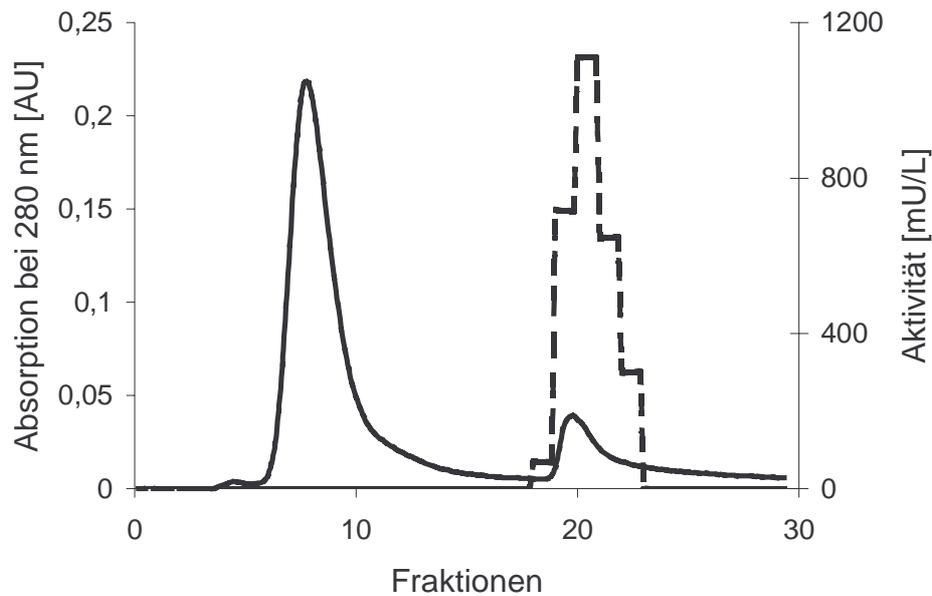


Abb. 2.27 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose (high sub); UV-Absorption (—), enzymatische Aktivität (- - -); Elution: 15 min A (Citronensäure/Phosphat-Puffer pH 3,5 mit 1M Ammoniumsulfat), 15 min B (Citronensäure/Phosphat-Puffer pH 3,5); Fraktionen: 4 mL; Flussrate: 4 mL min⁻¹

2.4.3.3 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

2.4.3.3.1 Vorversuche zur IEC

Bei der klassischen Ionenaustauschchromatographie werden Proteine bei geringer Ionenstärke durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Säulenmatrix gebunden und durch Erhöhung des Salzgehaltes eluiert.

Vorversuche ergaben Aktivitätsverluste des Zielenzym bei hohen Ionenstärken. Um diese Verluste zu vermeiden, wurde die Elution durch einen pH-Wechsel des Elutionspuffers bewirkt (siehe 4.10.4.5). Mit einem isoelektrischen Punkt von 3,75 liegt das Protein bei höheren pH-Werten als Anion vor. Demgemäß wurden - zunächst im analytischen Maßstab - verschiedene Anionenaustauscher erprobt. Das Zielenzym sollte bei einem pH-Wert von 4,5 gebunden und durch einen pH-Wechsel zu 3,5 eluiert werden, da noch kleinere pH-Werte zu deutlichem Aktivitätsverlust

führten. Es standen ein starker Anionenaustauscher mit Trimethylaminoethyl-substituierter Matrix, sowie zwei schwache Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl- bzw. Diethylaminopropyl-Sepharose zur Verfügung.

Bei Verwendung der starken Anionenaustauscher-Säule wurde das Protein zwar gebunden, konnte aber durch den Pufferwechsel nicht eluiert werden. Eine Elution wurde erst durch einen Puffer von pH 3,0 erreicht. Dabei ging über 60 % der Aktivität verloren. Auch bei Einsatz der Diethylaminopropyl-Sepharose Säule gelang die Elution des Zielproteins unter den gewählten Bedingungen nicht. Durch Gebrauch des Diethylaminoethyl-Austauschers (DEAE) konnte die Chromatographie des Zielproteins unter den oben genannten Bedingungen bei weitgehendem Erhalt der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden.

2.4.3.3.2 Scale up

Die Chromatographie wurde an einer präparativen DEAE Sepharose Fast Flow Säule durchgeführt. Das Zielprotein wurde bei pH 4,5 an die Matrix gebunden und durch einen Pufferwechsel zu pH 3,5 eluiert. Enzymaktivität war in fünf Fraktionen nachweisbar (Abb. 2.28). Nach der Chromatographie waren noch 89 % der Ausgangsaktivität vorhanden.

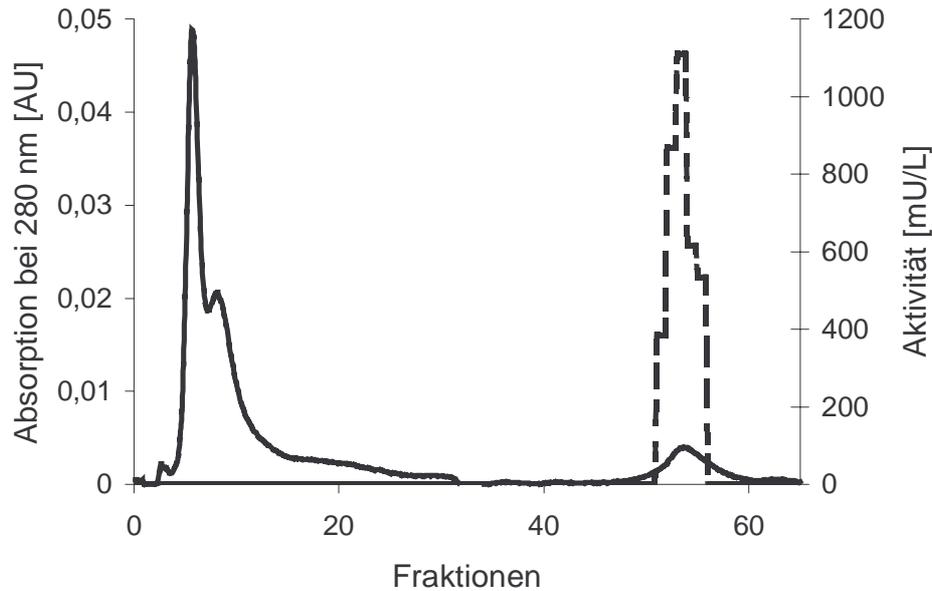


Abb. 2.28 Ionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose Fast Flow; UV-Absorption (—), enzymatische Aktivität (- - -); Elution: 25 min A (Citronensäure/Phosphat-Puffer pH 4,5), 45 min B (Citronensäure/Phosphat-Puffer pH 3,5); Fraktionen: 4 mL; Flussrate: 4 mL min⁻¹

2.4.3.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Für die GPC wurde eine analytische Superdex 200 HR10/30 Säule verwendet, die einen Trennbereich von 10-600 kDa abdeckte (siehe 4.10.4.6). Dextrangele wie Superdex können eine Affinität für Metallkationen wie Eisen oder Kupfer aufweisen (Suelter 1990). Dem Eluenten wurden zur Verhinderung von Aktivitätsverlusten geringe Mengen an Eisen-, Mangan-, Kupfer- und Zinksalzen zugesetzt. Weil die Säulenmatrix außerdem freie Carboxylgruppen enthält, welche Protein-Adsorption bewirken können, wurde ein Puffer mit einer höheren Ionenstärke als bei der IEC und HIC gewählt. Die Elution des Zielproteins erfolgte bei pH 3,5, um maximale Proteinstabilität und hohe Empfindlichkeit der Aktivitätsmessung zu gewährleisten. Der Großteil des Zielenzym eluierte unter weitgehendem Erhalt der Enzymaktivität in zwei aufeinander folgenden Fraktionen (Abb. 2.29).

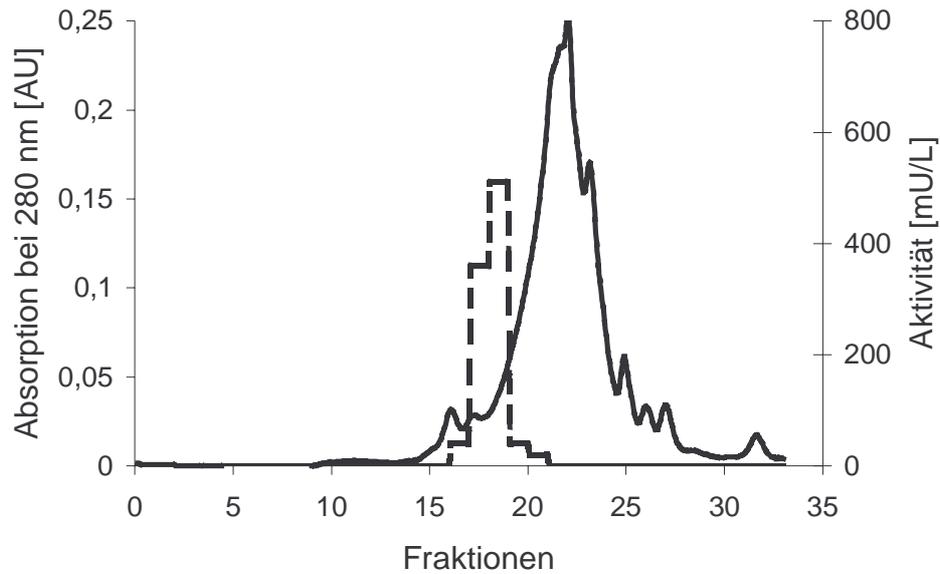


Abb. 2.29 Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 HR10/30; UV-Absorption (—), enzymatische Aktivität (- - -); Elution: Citronensäure/Phosphat-Puffer, pH 3,5 mit Spurenelementzusatz; Fraktionen: 1 mL; Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$

Molekulargewicht

Die GPC erlaubt anhand des Elutionsvolumens des Zielproteins die Bestimmung des Molekulargewichtes. Dazu wurden Standardproteine chromatographiert und deren Elutionskoeffizienten (K_{av}) gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen (siehe 4.10.4.6.1). Aus der so erhaltenen Kalibriergeraden ergab sich für das Zielenzym ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Abb. 2.30).

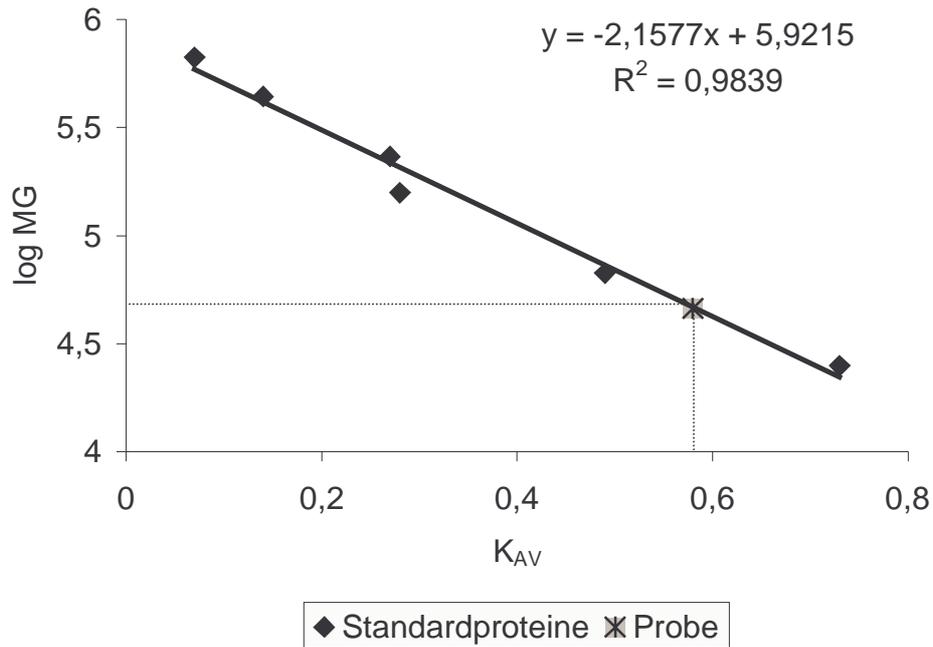


Abb. 2.30

Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GPC

2.4.3.5 Kombinierte Aufreinigung

Die drei chromatographischen Schritte HIC, IEC und GPC wurden nacheinander durchgeführt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die aktiven Fraktionen mittels Ultrafiltration bei einer Ausschlussgrenze von 10 kDa aufkonzentriert, wobei gleichzeitig eine Umpufferung mit dem für den nächsten Schritt erforderlichen Startpuffer erfolgte. Die GPC wurde am Ende der Reinigung durchgeführt, da hierfür lediglich eine analytische Säule zur Verfügung stand. Im letzten Reinigungsschritt erschien im GPC-Chromatogramm noch ein einzelner Peak (Abb. 2.31).

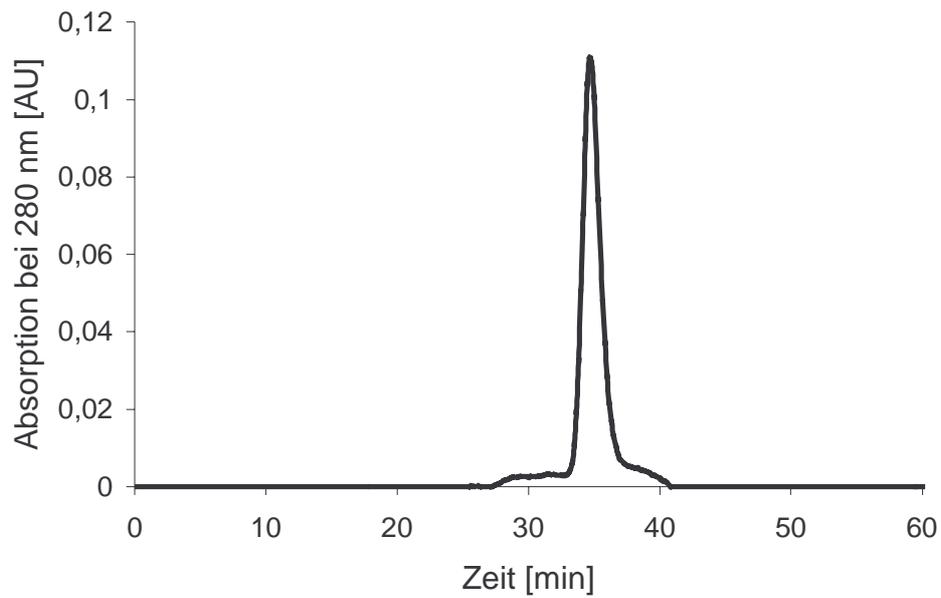


Abb. 2.31 Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 HR10/30; UV-Absorption (—); Elution: Citronensäure/Phosphat-Puffer, pH 3,5 mit Spurenelementzusatz; Fraktionen: 1 mL; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹

2.4.3.6 Bilanzierung der Reinigungsschritte

Bei einer Ausbeute von 63 % und einem Aufreinigungsfaktor von 42 wurde ein Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 281,5 mU mg⁻¹ Protein erhalten (Tab. 2-8). Das Enzym hatte einen Anteil von etwa 1,5 % am gesamten Exoproteingemisch einer Submerskultur von *Lepista irina*.

Tab. 2-8 Bilanzierung der Reinigung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms aus Submerskultur von *Lepista irina*, ausgehend von 220 mL Kulturmedium

	Proteingehalt [mg]	Aktivität [mU]	Spez. Aktivität [mU mg ⁻¹]	Ausbeute [%]	Aufreinigungs- faktor [-fach]
Medium	11,35	75,7	6,7	100	-
Retentat d. U.F.	5,996	63,6	10,6	84	1,6
HIC	0,854	55,3	64,6	73	9,6
IEC	0,468	52,6	112,4	70	16,8
GPC	0,168	47,3	281,5	63	42,0

2.4.3.7 Umsetzung von β,β -Carotin mit aufgereinigtem Enzym

Emulgiertes β,β -Carotin wurde in einem Mikroansatz mit einem Teil des aufgereinigten Enzyms umgesetzt (siehe 4.5.2.4). Die Mischung wurde drei Stunden bis zur sichtbaren Bleichung inkubiert, da nur eine geringe Enzymmenge zur Verfügung stand. Es wurden 6 mol% β -Ionon gebildet.

2.4.3.8 Überprüfen der Reinheit des Enzyms

Nach jedem chromatographischen Schritt wurden die proteinhaltigen Proben mittels SDS-PAGE sowie IEF und Aktivitäts(ent)färbung auf ihre Reinheit hin überprüft. Nach dem letzten Reinigungsschritt waren auf dem nach Coomassie gefärbten IEF-Gel noch zwei sehr eng beieinander liegende Banden zu sehen, von denen eine sehr viel intensiver ausgeprägt war als die andere. Offensichtlich handelte es sich um Proteine mit sehr ähnlichem Molekulargewicht und nahezu identischem isoelektrischen Punkt, die durch die chromatographische Reinigung nicht getrennt werden konnten. Die intensivere Bande lag bei einem isoelektrischen Punkt von 3,75, die schwach ausgeprägte Bande bei 3,5 (Abb. 2.32). Durch Aktivitätsfärbung konnte nicht festgelegt werden, ob die Bleichung von einer oder von beiden Banden ausging. Während der Inkubation kam es zu einer Diffusion der Enzyme in das β,β -Carotin-Gel und damit zu einer Verbreiterung der „Aktivitätsbanden“.

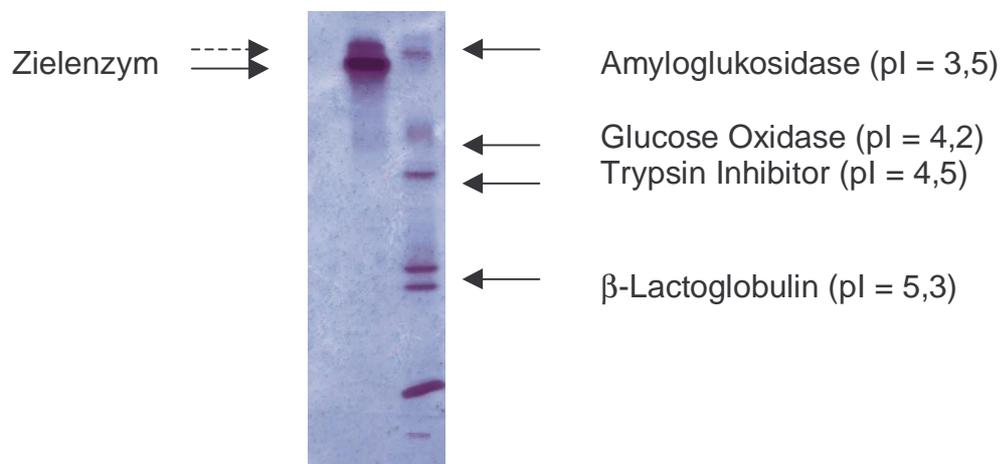


Abb. 2.32

Isoelektrische Fokussierung der aufgereinigten Enzymprobe (links: Probe; rechts: Marker-Proteinmischung)

Auf dem SDS-Gel zeigte sich eine sehr intensive und eine sehr schwach ausgeprägte Bande (Abb. 2.33).



Abb.2.33

SDS-PAGE der aufgereinigten Enzymprobe

Die SDS-PAGE des gereinigten Proteins erlaubte eine genaue Bestimmung des Molekulargewichtes. Durch Auftragen der Retentionsfaktoren (R_F) von Standardproteinen gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 2.34). Für die Hauptbande wurde ein Molekulargewicht von 50,5 kDa ermittelt, für das geringer konzentrierte Protein ein Molekulargewicht von 45 kDa.

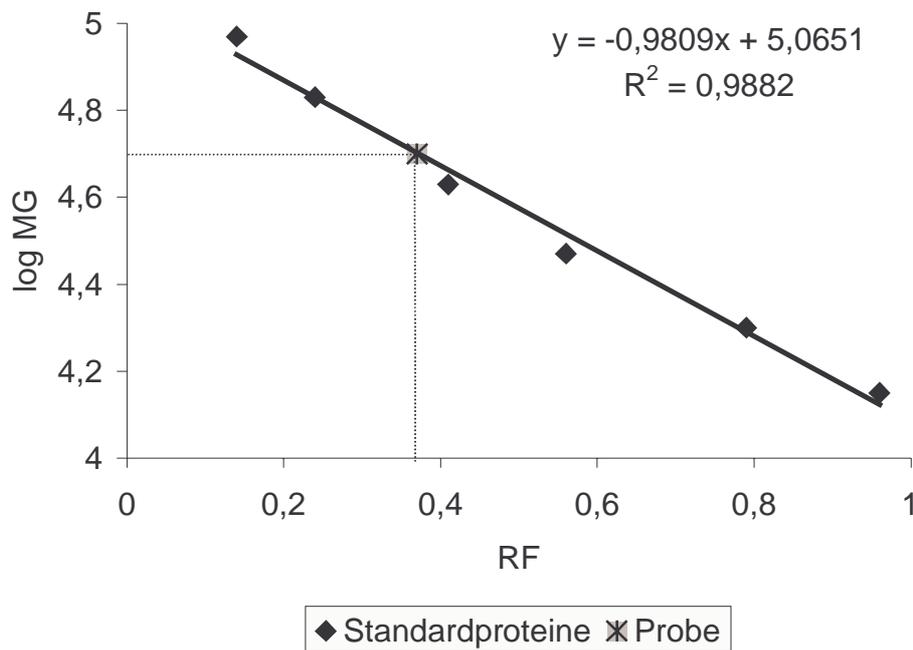


Abb. 2.34

Bestimmung des Molekulargewichtes des Zielenzym (Hauptbande) mittels SDS-PAGE

2.4.4 Sequenzierung des β,β -Carotin-spaltenden Enzyms

Nach erfolgter chromatographischer Aufreinigung und Trennung mittels SDS-PAGE wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die Aminosäuresequenz nach tryptischem Verdau bestimmt. Aus der Bande mit größter Intensität wurde mittels ESI-MS/MS eine Teilsequenz von 20 Aminosäuren (Sequenz 1) und mittels Edman-Abbau eine Teilsequenz von 37 Aminosäuren erhalten (Sequenz 2):

Sequenz 1:

**Leucin Phenylalanin Prolin Glycin Threonin Alanin Asparaginsäure Glutamin
Asparagin Glutamin Glutaminsäure Glutamin Serin Prolin Leucin Glutamin
Glycin Glutaminsäure Leucin Arginin**

Sequenz 2:

NH₂ Alanin Threonin Cystein Alanin Asparaginsäure Glycin Arginin Threonin Threonin Alanin Asparagin Alanin Alanin Cystein Cystein Valin Leucin Phenylalanin Prolin Isoleucin Leucin Asparaginsäure Asparaginsäure Isoleucin Glutamin Glutaminsäure Asparagin Leucin Phenylalanin Asparaginsäure Glycin Alanin Glutamin k.A. Glycin Glutaminsäure Glutaminsäure

Datenbankrecherchen ergaben für diese Sequenzen eine Homologie von 76 % (Sequenz 1) und 97 % (Sequenz 2) zu einem Peptid aus einer Polyvalenten Peroxidase (MnPL 1) des Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* (Datenbank: WU-BLAST2 von EMBL-EBI). Von diesem Protein sind zwei Isoenzyme beschrieben (Martinez et al. 1996). Die Homologie zu dem zweiten Isoenzym (MnPL 2) betrug 76 % (Sequenz 1) und 91 % (Sequenz 2). Die massenspektrometrische Untersuchung der schwächer ausgeprägten zweiten Bande ergab Aminosäureteilstrecken, die ebenfalls Homologien zu den genannten Proteinen aufwiesen. Somit lag kein Fremdprotein mehr in der Probe vor.

2.4.5 Sequenzierung eines weiteren Enzyms aus *Lepista irina*

Bei den Versuchen zur Proteinreinigung wurden auch die chromatographischen Reinigungsschritte IEC und GPC kombiniert und die Probe mittels SDS-PAGE untersucht. Hierbei fiel neben der Bande im Molekulargewichtsbereich von 50 kDa auch eine intensive Bande im Bereich 90 kDa auf. Diese Bande wurde ebenfalls ausgeschnitten. Nach tryptischem Verdau wurde eine Aminosäureteilstrecke mittels ESI-MS/MS bestimmt. Dabei wurde eine Sequenz von 12 Aminosäuren erhalten, die eine Homologie von 83 % zu einer Aryl-Alkohol-Oxidase aus *Pleurotus eryngii* zeigte (Guillen et al. 1992).

Sequenz 3:

**Leucin Valin Asparaginsäure Glycin Serin Valin Leucin Prolin Phenylalanin
Alanin Prolin Asparagin**

2.4.6 Untersuchung von *Pleurotus eryngii*

Aufgrund der ausgeprägten Sequenzhomologie zu dem Enzym aus *Lepista irina* wurde eine Kultur von *Pleurotus eryngii* auf β,β -Carotin-Agar kultiviert. Bereits nach zwei bis drei Tagen zeigte sich eine deutliche Entfärbung des Agars mit einer Hofbildung um das Pilzmycel.

2.4.7 Zusammenfassung

Das β,β -Carotin-spaltende Protein aus *Lepista irina* wies ein pH-Optimum von 3,5 bis 3,7 auf. Das Temperaturoptimum lag bei 34°C. Das Enzym hatte ein Molekulargewicht von 50 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 3,75. Die Aufreinigung führte bei einem Reinigungsfaktor von 42 zu einem Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 281,5 mU mg⁻¹, welches frei von Fremdproteinen war. Aminosäureteilstrecken des Zielenzyms zeigten Homologien von bis zu 97 % zu einem Peptid aus einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*.

3 Diskussion

3.1 Co-Oxidation von Carotinoiden

Mittels Co-Oxidation ist die Gewinnung von Iononen aus Carotinen möglich. Mit eigenen Versuchen sollte die Effizienz dieses Verfahrens untersucht werden. Es wurde verstärkt Augenmerk gelegt auf die Reaktionsbedingungen, mit denen größere Mengen des C-13-Ketons erhalten werden konnten. Das in der Arbeit entwickelte mikrobiologische Verfahren zur Gewinnung der flüchtigen C-13-Komponenten sollte mit den Ergebnissen der Co-Oxidations-Versuche verglichen und bewertet werden.

3.1.1 Enzyme mit der Fähigkeit zur Co-Oxidation von Tetraterpenen

Als Co-Oxidation betrachtet man unspezifische Reaktionen von Carotinoiden mit reaktiven Intermediaten, die im Verlauf der Katalyse oxidierend wirkender Enzyme entstehen können. Hierbei werden Tetraterpene oxidativ abgebaut.

Neben Lipoxygenase sind auch andere Enzyme zur Co-Oxidation von Carotinoiden fähig. Ein Beispiel ist das Enzym Xanthinoxidase. Das Flavoprotein katalysiert im Säugetierorganismus beim Abbau der Purine die Oxidation von Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure, wobei Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert und zum Hydroperoxid-Anion reduziert wird (Falbe und Regitz 1995). Bei Verwendung von Butanal oder Acetaldehyd als Substrat für die Xanthinoxidase wurde die Entfärbung von Carotinoiden beobachtet. Die Autoren stellten fest, dass dafür nicht Hydroperoxidanionen selbst verantwortlich sind, sondern sekundär entstehende Alkylradikale den Abbau bewirken (Bossert und Belin 1994).

Umfassende Studien zur Co-Oxidation von Carotinoiden befassten sich aber mit dem Enzym Lipoxygenase. Lipoxygenasen sind im Pflanzenreich weit verbreitete Dioxygenasen, die nicht Häm-gebundenes Eisen im aktiven Zentrum aufweisen. Sie

katalysieren die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die ein 1Z, 4Z-Pentadiensystem enthalten. Bereits 1934 wurde entdeckt, dass Lipoxygenase aus Soja (*Glycine max* L.) in Gegenwart von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Linol- oder Linolensäure Polyenfarbstoffe bleichen kann. Neben den Enzymen aus Soja sind auch andere pflanzliche Lipoxygenasen wie die aus Erbse (*Pisum sativum* L.) (Wu und Robinson 1999), Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) (Sanz et al. 1994) oder Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (Aziz et al. 1999) auf ihre Fähigkeit zur Co-Oxidation von Carotinoiden untersucht worden.

3.1.2 Mechanismus der Co-Oxidation

Hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Co-Oxidation von Carotinoiden sind verschiedene Lipoxygenase-Typen zu unterscheiden. Typ I Lipoxygenasen aus Soja peroxidieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit hoher Stereo-Spezifität, haben aber nur ein geringes Vermögen zur Co-Oxidation. Soja-Lipoxygenasen vom Typ II und Typ III besitzen einen größeren Bleichungseffekt. Man führt dies darauf zurück, dass intermediär gebildete Peroxyradikale nicht so schnell und vollständig in Hydroperoxide umgewandelt werden und somit durch Abstrahieren von H-Atomen die Autoxidation der Carotinoide einleiten können (Ikediobi und Snyder 1977). Die Enzyme sind nicht direkt an der Bildung der Co-Oxidationsprodukte beteiligt. Vielmehr reagieren freie Peroxyradikale erst mit dem Substrat, wenn sie sich vom Enzym gelöst haben. Den Beweis für diese Annahme erbrachten stereochemische Studien zur Co-Oxidation (Matsui et al. 1994; Waldmann und Schreier 1995). Man geht heute davon aus, dass die Oxidation von Carotinoiden an verschiedenen Stellen des konjugierten ungesättigten Systems stattfinden kann (Wu und Robinson 1999). Möglicherweise wird sie durch ein Peroxyradikal eingeleitet, das ein Carotinoid-Radikal erzeugt (Burton 1989).



Dabei werden bevorzugt Protonen in Allyl-Stellung abgespalten, da so ein resonanzstabilisiertes Carotinoid-Radikal entsteht, welches im folgenden Schritt mit Sauerstoff reagiert.



Die Primärprodukte können weiterhin als Substrate für die Co-Oxidation dienen, so dass an verschiedenen Stellen der Polyenkette oxidiert wird.

Ein anderer Vorschlag zum Mechanismus der Co-Oxidation geht davon aus, dass eine Addition des Fettsäure-Hydroperoxides an das Carotinoid-Molekül stattfindet (Samokyszyn und Marnett 1987; Burton und Ingold 1984; Mordi et al. 1993; Yamauchi et al. 1993).



Durch homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung und anschließende Umlagerungsreaktionen können aus diesem Intermediat Epoxide entstehen, die vermutlich unter Kettenbruch zu Carbonyl-Verbindungen zerfallen.

3.1.3 Produktspektrum der Co-Oxidation

Als flüchtige Co-Oxidationsprodukte der Soja-Lipoxygenase-Reaktion wurden zunächst β -Ionon, Dihydroactinidiolid, 5,6-Epoxy- β -Ionon sowie β -Cyclocitral nachgewiesen (Grosch 1976). In weiteren Arbeiten wurden daneben geringe Mengen verschiedener Trimethyl-Cyclohexan-Derivate sowie 4-Oxo- β -Ionon, 4-Hydroxy- β -Ionon und Epoxy- β -Cyclocitral nachgewiesen (Hohler 1986). Eine neuere Arbeit beschreibt neben flüchtigen Spaltprodukten zahlreiche längerkettige Apo-Carotinoide sowie deren Epoxide (Wu und Robinson 1999).

Co-Oxidationsversuche im wässrigen Medium mit emulgiertem β,β -Carotin sind durch die Zugabe an β,β -Carotin begrenzt, da nur geringe Mengen des Polyens in einer wässrigen Lösung emulgierbar sind. Darüber hinaus sind die Reaktionsprodukte durch den hohen Emulgatoranteil schwer zu isolieren. Außerdem kann der Umsatz nur bei Umgebungstemperatur erfolgen, da es sonst zu einer irreversiblen Denaturierung des Enzyms kommt.

Wie bereits erwähnt, reagiert Lipoxygenase bei der Co-Oxidation nicht direkt mit β,β -Carotin, sondern der Abbau wird durch die gebildeten Fettsäure-Hydroperoxide eingeleitet. Die oben erläuterten Nachteile der Co-Oxidation im System Lipoxygenase/Linolsäure wurden bei der eigenen Arbeit umgangen, indem β,β -Carotin mit isoliertem Fettsäure-Hydroperoxid umgesetzt wurde. Aus Linolsäure wurde reine 13-Hydroperoxy-Octadecadiensäure mittels Lipoxygenase-Reaktion hergestellt und in organischen Lösungsmitteln mit β,β -Carotin umgesetzt. Dabei konnte die Bildung von β -Ionon als Hauptprodukt neben Dihydroactinidiolid und β -Cyclocitral bestätigt werden. Außerdem wurde β -Apo-13-Carotinon nachgewiesen. Auf eine Untersuchung des Reaktionsgemisches auf längerkettige, nichtflüchtige Apo-Carotinoide wurde in diesem Rahmen verzichtet, da nicht das Produktspektrum, sondern die Menge der gebildeten aromarelevanten C-13-Verbindungen im Vordergrund stand.

3.1.4 Quantifizierung der flüchtigen Nor-Carotinoide

Literaturangaben über die Menge der durch Co-Oxidation gebildeten flüchtigen Nor-Carotinoide sind bisher rar.

Im System Xanthinoxidase/Acetaldehyd wurde aus 90 mg β,β -Carotin ein maximaler Gehalt von rund 350 μg β -Ionon erhalten, was einem Anteil von etwa 1 mol% entspricht (Bossler und Belin 1994). Die Reaktionsmischung musste dabei 3 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Die Verwendung von Butanal statt Acetaldehyd lieferte 300 μg β -Ionon nach einer Reaktionsdauer von 2 Stunden.

Als eine Möglichkeit zur biotechnologischen Gewinnung der Ionone wird ein patentrechtlich geschützter Ansatz beschrieben, in dem durch Versetzen von Karottensaft mit Safloröl als Linolsäure-Quelle und Sojamehl als Lipoxygenase-Quelle ein hoher Gehalt der C-13-Nor-Isoprenoide gewonnen wurde (Belin et al. 1994). Nach Zugabe von Lipase und Calciumchlorid zum Freisetzen der Fettsäuren und 40-stündiger Inkubation wurde ein α -Ionon-Gehalt von bis zu 230 mg kg^{-1} bezogen auf die Reaktionsmasse erhalten. Interessanterweise wurde bei diesem patentierten Ansatz kein β -Ionon nachgewiesen. Ausgehend von Karottensaft mit

einem β,ϵ -Carotin-Anteil von rund 30 % sollte aber das stöchiometrische Verhältnis von β -Ionon zu α -Ionon bei etwa 6:1 liegen.

Um die Durchführbarkeit dieses Ansatzes zu überprüfen, wurde der Versuch in der eigenen Arbeit praktisch nachvollzogen. Problematisch war dabei die ungenaue Versuchsbeschreibung, die verschiedene Interpretationsmöglichkeiten offen ließ. Bei der Durchführung wurde die Reaktionsmischung außerdem so fest, dass eine gleichmäßige Verteilung der Reaktionspartner auch nach Zugabe von Wasser nicht gewährleistet werden konnte. Es wurden schließlich nur Spuren von β -Ionon in der Mischung nachgewiesen. α -Ionon war nicht detektierbar. Wie die Autoren des Patentes eine so hohe Ausbeute an α -Ionon erhalten konnten, blieb fraglich.

In den eigenen Arbeiten zur Co-Oxidation wurde β,β -Carotin in organischen Lösungsmitteln gelöst und mit 13-HPOD umgesetzt, wobei Eisen(II)sulfat als Redox-Initiator diente. Die Reaktionsbedingungen wurden hinsichtlich der Menge an Fettsäure-Hydroperoxid und Eisen(II)sulfat optimiert und in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die maximalen Ausbeuten an β -Ionon wurden durch Erhöhung des Sauerstoffgehaltes in der Reaktionsmischung erhalten. Sie lagen dabei mit 11 mol% weit über den von Bosser im System Xanthinoxidase/Acetaldehyd gemessenen Anteilen. Die Reaktion erfolgte allerdings unter drastischen Bedingungen wie hoher Temperatur (55 °C) und langer Reaktionszeit (8 Stunden). Auch wurden befriedigende Ausbeuten an β -Ionon erst durch Zugabe von hohen Anteilen des Fettsäure-Hydroperoxides und des Redox-Initiators erhalten. Daraus kann man schlussfolgern, dass der vorgestellte Ansatz zur Co-Oxidation nicht zur Gewinnung wirtschaftlich hinreichender Mengen an C-13-Nor-Isoprenoiden einsetzbar ist.

3.2 Screening von Mikroorganismen auf β,β -Carotin-Abbau

3.2.1 Auswahl der Mikroorganismen für das Vorscreening

In einem Screening sollten zunächst Carotinoid-abbauende Pilzen selektioniert werden. Ausgewählt wurden Mikroorganismen nach verschiedenen Kriterien, die im Einzelnen näher erläutert werden (siehe 2.2.1).

3.2.1.1 Carotinoid-synthetisierende Pilze

Einige der untersuchten Stämme sind für ihre Fähigkeit zu Biosynthese von Carotinoiden bekannt. Eine Hauptfunktion von Carotinoiden in Mikroorganismen besteht darin, den durch Lichtenergie in den Singulett-Zustand überführten Sauerstoff zu quenchen und damit die Entstehung schädlicher Oxidationsprodukte zu verhindern. Bei vielen Mikroorganismen ist die Bildung von Carotinoiden lichtabhängig, da die für die Carotinoidbiosynthese zuständigen Enzyme wie Phytoin-Synthetase, Phytoin-Dehydrogenase und Lycopin-Cyclase durch Licht induziert werden (Britton et al. 1998).

Carotinoide scheinen außerdem bei der Sporenbildung von Pilzen eine Rolle zu spielen. Die Akkumulation von Carotinoiden in Pilzen geht häufig mit der Bildung von Sporopolleninen einher (Rau 1988). Diese Verbindungen ($C_{90}H_{130}O_{39}$) sind Biopolymere aus vernetzten Carotinoid-Resten, die durch oxidative Polymerisation entstehen (Shaw 1970). Sie verleihen Sporen hohe Verwitterungsfestigkeit und Stabilität gegen chemische Einflüsse. In Zygomyceten sind Carotinoide darüber hinaus als Vorstufen von Trisporsäure bekannt, die eine Funktion bei der Reproduktion dieser Mikroorganismen hat.

Vermutlich verfügen Mikroorganismen, die Carotinoide biosynthetisieren, auch über Enzyme, die den Abbau der Tetraterpene katalysieren. Bei den im Screening eingesetzten Kulturen, die zur Biosynthese von Carotenoiden in der Lage sind wurde

diese Erwartung aber nicht erfüllt. In keinem Fall konnte ein signifikanter β,β -Carotin-Abbau beobachtet werden.

Die Gattung *Phycomyces* ist nicht nur zur Biosynthese von Carotinoiden, sondern auch zur Bildung von Trisporsäure-Derivaten in der Lage. *Phycomyces blakesleanus* wurde im Screening eingesetzt, zeigte aber unter den gegebenen Bedingungen keine Bleichung des β,β -Carotin-Agars. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Enzymen, die die Bildung von Trisporsäure-Derivaten katalysieren, um intrazelluläre Enzyme handelt. Diese können möglicherweise nicht wie Exo-Proteine oder membranständige Enzyme mit dem außerhalb der Zellen vorliegenden β,β -Carotin in Kontakt treten.

3.2.1.2 Carotinoid-abbauende Pilze

In einer Studie über die Lagerung von Seidenfasern wurde beobachtet, dass eine Infektion mit verschiedenen Deuteromyceten zu einer Abnahme des Carotinoid-Gehaltes und damit zu einer Qualitätsminderung der Seidenfasern führte (Prasad und Singh 1995). Ein deutlicher Carotinoid-Abbau wurde allerdings erst nach einer Lagerung von mindestens 20 Tagen nachgewiesen.

Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde in eigenen Untersuchungen geprüft, ob die entsprechenden Mikroorganismen auch auf den β,β -Carotin-haltigen Agarplatten eine Bleichung hervorriefen. Dies traf in keinem Fall zu. Das negative Ergebnis ist vermutlich auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. Im Medium unter Laborbedingungen stehen Glucose, Aminosäuren, Vitamine und Mineralsalze in ausreichenden Mengen zur Verfügung, so dass die Nutzung anderer Nährstoffquellen wie Tetraterpene nicht notwendig wird. Den auf Seiden-Fibroin wachsenden Mikroorganismen mangelt es dagegen vermutlich an Nährstoffen. Unter Laborbedingungen konnte aber auf den Zusatz der Nährstoffe nicht verzichtet werden, da die Pilze sonst nicht anwachsen konnten.

3.2.1.3 Terpen-transformierende und –synthetisierende Pilze

Zahlreiche Basidiomyceten und auch Ascomyceten sind zur *de novo* Biosynthese terpenoider Aromastoffe befähigt. Dabei handelt es sich in der Regel um Sekundärmetabolite, die keine bekannten biochemischen Funktionen im Katabolismus oder Anabolismus besitzen. Mögliche biologische Funktionen der flüchtigen Substanzen sind das Anlocken von Insekten zur Sporenverbreitung oder die Abwehr von Schädlingen (Berger 1995). Typische Verbindungen sind Monoterpen-Kohlenwasserstoffe, aber auch Sesquiterpene und Sesquiterpen-Alkohole.

Ausgehend von verschiedenen Substraten sind viele Mikroorganismen in der Lage, Terpene zu transformieren. Beschrieben sind Oxidationen, Hydroxylierungen, Dehydratisierungen, Hydrolysen sowie Bildung von neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen und verschiedene Abbaureaktionen (Janssens et al. 1992).

Die Annahme, dass Terpen-synthetisierende oder -transformierende Mikroorganismen auch in der Lage sein können Tetraterpene umzusetzen, wurde durch das Screening bestätigt. Alle Organismen, die im Vorscreening eine deutliche Bleichung des β,β -Carotin-Agars zeigten, gehörten zu mindestens einer der beiden Gruppen.

3.2.1.4 Stämme von terpenhaltigen Substraten

Jährlich werden in der Natur etwa $1,75 \times 10^8$ Tonnen Terpene produziert, vorwiegend in Wäldern (Voishvillo et al. 1970). Diese Stoffe werden vermutlich zum großen Teil von Mikroorganismen metabolisiert. Insbesondere unter den Basidiomyceten findet man zahlreiche Stämme, die von terpenhaltigen Substraten wie z.B. Nadelhölzern isoliert wurden. Es liegt nahe, dass diese Mikroorganismen fähig sind, Isoprenoide zu verstoffwechseln. Im Screening fiel der von Nadelholz isolierte Stamm von *Ischnoderma benzoinum* als Carotinoid-abbauender Basidiomycet auf.

Insbesondere im Herbst fallen auch Carotinoide in großen Mengen an. Im Screening wurde die Annahme, dass auch diese Terpene einem mikrobiellem Abbau

unterliegen können bestätigt. Vor allem im Wald vorkommende Basidiomyceten zeigten im Screening die Fähigkeit zum Carotinoid-Abbau.

Darüber hinaus wurden auch einige Mikroorganismen untersucht, die als Substrat Carotinoid-haltige Früchte oder Gemüse bevorzugen. Der Ascomycet *Guignardia citricarpa* wächst beispielsweise auf Zitrusfrüchten unter Bildung eines hellen Hofes. Unter den gewählten Bedingungen zeigte jedoch keiner dieser Stämme eine Bleichung des β,β -Carotin-Agars. Möglicherweise sind hierfür die Kultivierungsbedingungen verantwortlich. Es ist denkbar, dass Tetraterpene erst dann metabolisiert werden, wenn ein Mangel an leichter verfügbaren Kohlenstoffquellen auftritt.

3.2.2 Untersuchung der Produktbildung

Pilze, die im Vorscreening einen β,β -Carotin-Abbau gezeigt hatten, wurden im nächsten Schritt auf die Bildung sensorisch interessanter Abbauprodukte untersucht. Dies erfolgte sowohl im zellhaltigen als auch im zellfreien System (siehe 2.2.3 und 2.2.4). Von 51 ausgewählten Pilzen bauten im Vorscreening 11 Stämme sichtbar β,β -Carotin auf den Agar-Platten ab. Im Submerskultur-Screening zeigten hiervon 8 eine Produktbildung. Diese Kulturen ließen sich in zwei Gruppen einteilen: *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Trametes suaveolens* bildeten im Screening in Submerskultur das Abbauprodukt Dihydroactinidiolid, ließen aber im zellfreien Screening keinen Abbau zu flüchtigen Metaboliten erkennen. *Ischnoderma benzoinum*, *Lepista irina*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* waren im zellfreien System zur β -Ionon Bildung fähig und zeigten im zellhaltigen Screening keine Abbauprodukte. Dieser Befund deutet darauf hin, dass zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

Möglicherweise verfügen die „Dihydroactinidiolid-Bildner“ über zelluläre Carotinoid-spaltende Enzyme, während die „ β -Ionon-Produzenten“ Enzyme ins Medium sezernieren, die den Abbau katalysieren. Im Screening in Submerskultur wurde eine Anreicherung des β,β -Carotins in den lipophilen Zellmembranen beobachtet. Das Substrat konnte somit mit zellulären Enzymen in Kontakt treten. Dies führte bei

einigen Mikroorganismen durch den (teilweisen) Abbau des β,β -Carotins zu Dihydroactinidiolid.

Bei *Ischnoderma benzoinum*, *Lepista irina*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* wurden im Screening in Submerskultur keine Produkte nachgewiesen. Grund hierfür kann die Verstoffwechslung primär gebildeter Abbauprodukte sein. In zellfreien Systemen kam es nicht oder nur in geringerem Maße zu einer Weitermetabolisierung, da hier ausschließlich Exoenzyme vorhanden waren. Daher konnte in diesem Fall das Primärprodukt β -Ionon nachgewiesen werden. Ein weiterer Grund für die fehlende Produktbildung kann die Anreicherung des β,β -Carotins in den Zellmembranen sein. Hierdurch kam es zu einer Verarmung des Mediums an β,β -Carotin, so dass das Substrat für die in die Kulturüberstände sezernierten Exoenzyme weniger gut zugänglich war.

Das Produktspektrum der zellfreien Versuche ähnelte dem der Co-Oxidationsversuche. Auch hier wurde β -Ionon als Hauptprodukt und β -Cyclocitral sowie Dihydroactinidiolid detektiert. Statt des 13-Apo-Carotinals konnte jedoch 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon nachgewiesen werden. Dieses Cyclohexanon-Derivat findet sich in Tabak und Tee (Mügler-Chevan et al. 1969), aber auch in Tomaten und Chicorée. Der sensorische Eindruck wird als heuartig beschrieben. Auch das süßlich und fruchtig riechende β -Cyclocitral kommt in der Natur beispielsweise in Tee, Tabak, Erbsen, Friesen- und Akazienblüten vor.

3.3 Untersuchung des Carotinoid-Abbaus

3.3.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur

Im Screening in Submerskultur war eine Gruppe von Pilzen aufgefallen, die das β,β -Carotin-Abbauprodukt Dihydroactinidiolid bildeten. Vermutlich liegen hier zelluläre Enzyme vor, die den Abbau katalysieren können. Dihydroactinidiolid wurde 1967 erstmals aus dem ätherischen Öl der Blätter von *Actinidia polygama* isoliert und identifiziert (Sakan et al. 1967). Seither ist es in vielen pflanzlichen Lebensmitteln als natürlicher Inhaltsstoff nachgewiesen worden. Eine bedeutende Rolle spielt

Dihydroactinidiolid im Aroma von Schwarzem Tee (Bricout et al. 1967). Es wird daher von der Aromaindustrie synthetisiert (Isoe et al. 1968; Yao et al. 1998).

Bei der Untersuchung des Kulturverlaufes von *Hypomyces odoratus* in β,β -Carotinhaltigem Medium wurde unter den gewählten Bedingungen in den ersten Stunden der Kultivierung 5 mol% β -Ionon gebildet (2.3.1.1). Der Gehalt nahm aber rasch ab und sank gegen Ende der Kultivierung auf 1 mol%, während Dihydroactinidiolid einen Anteil von 9 mol% erreichte. Das C-13-Keton ist durch sein α,β -ungesättigtes Carbonylsystem leicht für weitergehende Oxidationsreaktionen zugänglich. Dihydroactinidiolid ist als Sekundärprodukt des Carotinoid-Abbaus beschrieben (Bossler et al. 1995).

Beim Screening von *Hypomyces odoratus* in Submerskultur war β -Ionon nicht nachweisbar. Hier wurde die Untersuchung auf flüchtige Metabolite erst ab dem fünften Kulturtag durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war β -Ionon auch bei dem Versuch zur näheren Untersuchung des β,β -Carotin-Abbaus durch *Hypomyces odoratus* schon auf etwa 1 mol% abgebaut. Als weitere Begründung für die Unterschiede in den Produktspektren kann in Betracht gezogen werden, dass bei der weitergehenden Untersuchung des Abbaus ein höherer Emulgatorgehalt verwendet wurde und das Substrat besser emulgiert war. Der enzymatische Abbau war somit vermutlich erleichtert.

Um zu überprüfen, ob es sich bei Dihydroactinidiolid um ein direktes Folgeprodukt aus β -Ionon handelt, wurde eine Kultur von *Hypomyces odoratus* mit β -Ionon versetzt (2.3.1.3). Es wurde aber kein Dihydroactinidiolid nachgewiesen, sondern statt dessen 7,8-Dihydro- β -Ionon. Offensichtlich verfügt der Ascomycet über Hydrogenasen, die die Hydrierung des C-13-Ketons katalysieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, welche Enzyme den Abbau von β,β -Carotin durch *Hypomyces odoratus* katalysieren. Aus diesem Grund erscheinen Spekulationen über den Bildungsweg von Dihydroactinidiolid aus β,β -Carotin verfrüht. Die Bildung von Dihydroactinidiolid aus β,β -Carotin über einen radikalischen Mechanismus wird unter 3.4.3 diskutiert. Ob die dort gemachten Aussagen auch für die Dihydroactinidiolid-Bildung durch *Hypomyces odoratus* zutreffen können, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Isolierung und Charakterisierung der

entsprechenden Enzyme und die Aufklärung des Mechanismus kann Thema anschließender Arbeiten sein.

3.3.2 Umsetzung von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien

Unter biotechnologischen Aspekten waren besonders Speisepilze von Interesse, die das C-13-Nor-Isoprenoid β -Ionon bildeten. Unter den vier β -Ionon-Bildnern befanden sich zwei Speisepilze: *Marasmius scorodonius*, der Echte Knoblauch-Schwindling oder auch Küchen-Schwindling, wird als ausgezeichneter Gewürzpilz bezeichnet und dient als Knoblauchersatz. Auch *Lepista irina*, der Veilchen-Rötelritterling ist als ausgezeichneter und vielseitig verwendbarer Speisepilz beschrieben (Gerhardt 1997). Bemerkenswerterweise wird den Fruchtkörpern dieses Basidiomyceten ein starker süßlicher Geruch nach Veilchen zugeschrieben. Dieses Charakteristikum spiegelt sich in der Namengebung wieder, da die Bezeichnung „*irina*“ auf die Schwertlilie hindeutet. Es ist somit nicht auszuschließen, dass der Pilz unter natürlichen Verhältnissen in den Fruchtkörpern flüchtige Carotinoid-Abbauprodukte wie Ionone oder Irone bilden kann, die den Veilchenduft bewirken. Nach Literaturangaben bildet der Basidiomycet in Submerskultur unter bestimmten Bedingungen Lepistrone (Abraham und Hanssen 1991). Es handelt sich dabei um Bisabolon-Derivate (Abb. 3.1). Angaben über flüchtige Inhaltsstoffe in Fruchtkörpern fehlen bislang. Bei eigenen Untersuchungen von Submerskulturen von *Lepista irina* ohne Zusatz von β,β -Carotin wurden keine Ionon-Derivate nachgewiesen. Die *de novo* Synthese dieser flüchtigen Komponenten war dadurch auszuschließen. Die Suche nach Carotinoid-abbauenden Enzymen erschien bei *Lepista irina* besonders erfolgversprechend. Aus diesem Grund wurde dieser Basidiomycet für weitere Umsetzungen und für die Proteinaufreinigung verwendet.

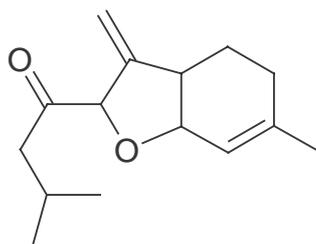


Abb. 3.1 Lepistrone

3.3.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration

Die Untersuchung des Retentates und Permeates einer Ultrafiltration auf die Fähigkeit zum Abbau von β,β -Carotin belegte eindeutig, dass es sich um einen enzymatischen Prozess handeln musste (siehe 2.3.2.1). Bei der Ultrafiltration verbleiben größere Moleküle wie Enzyme im Retentat, während kleinere Bestandteile abgetrennt werden. Bei Umsetzung von β,β -Carotin mit dem Retentat der Kulturüberstände von *Lepista irina* und *Marasmius scorodoni* war ein Abbau des Tetraterpens und die Bildung flüchtiger Nor-Isoprenoide zu verzeichnen. Die Ergebnisse von analogen Versuchen mit dem Permeat lagen im Bereich des Blindwertes.

3.3.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus

Die Kinetik des Abbaus und der Bildung flüchtiger Nor-Isoprenoide im zellfreien System mit Kulturüberständen von *Lepista irina* bestätigen das Vorhandensein von β,β -Carotin-abbauenden Exoenzymen (siehe 2.3.2.2). Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten war das Substrat weitgehend abgebaut und β -Ionon nachweisbar, während bei den Versuchen zur Co-Oxidation eine Reaktionszeit von bis zu 8 Stunden unter drastischen Bedingungen erforderlich waren, um eine nennenswerte Produktbildung zu erreichen. Die enzymatische Umsetzung von Carotinen mit Kulturüberständen von *Lepista irina* erwies sich damit im Vergleich zu den Experimenten zur Co-Oxidation als wesentlich effizienter.

Im zellfreien System war der β -Ionon-Gehalt nach 60 Minuten maximal. Zu diesem Zeitpunkt war β,β -Carotin bereits weitgehend abgebaut. Dies lässt vermuten, dass das Substrat zunächst zu größeren Bruchstücken gespalten wird. Die Abnahme der Konzentration an β -Ionon im weiteren Verlauf der Umsetzung kann mit der Weiterreaktion zu Oxidationsprodukten erklärt werden. Auch die Flüchtigkeit von β -Ionon in dem mit einem Zellulosestopfen verschlossenen Kulturkolben trägt dazu bei. Bei den Umsetzungen während des Screenings wurden nach 14 Stunden β -Ionon-Gehalte von bis zu 13 mol% gemessen. Bei der Untersuchung des kinetischen Verlaufes lag das Maximum des β -Ionon-Gehaltes bei 12 mol%, jedoch

waren nach 6 Stunden nur noch rund 6 mol% vorhanden. Biologische Schwankungen im Enzymgehalt der *Lepista irina* Kultur können für diese Unterschiede verantwortlich sein.

3.3.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin

Durch die Umsetzung von β,ϵ -Carotin mit dem Kulturüberstand von *Lepista irina* ist auch die biotechnologische Gewinnung von α -Ionon möglich (siehe 2.3.2.3). Die Untersuchung weiterer Substrate wie Capsanthin, Neoxanthin etc. wurde im Rahmen der eigenen Arbeit nicht untersucht, ist derzeit aber Thema weiterführender Arbeiten.

3.3.2.4 Quantifizierung der gebildeten Produkte

Bei allen Versuchen zur Umsetzung von Carotinoiden mit Enzymen aus Pilzen trat eine erhebliche Bilanzlücke auf. Die Umsetzung mit zellfreiem Medium von *Lepista irina* lieferte maximal 13 mol% β -Ionon sowie geringe Anteile der Nebenprodukte Dihydroactinidiolid, β -Cyclocitral und 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon. Auf der Seite der Apo-Carotinoide konnten geringe Mengen des β -Apo-10'-Carotinals nachgewiesen werden. Dieses Bruchstück entsteht neben β -Ionon bei der Spaltung von β,β -Carotin zwischen C₉ und C₁₀.

Möglicherweise fand ein Abbau zu wasserlöslichen Verbindungen wie Carboxylaten statt. Das Entstehen von Polymeren oder die Reaktion der entstandenen Carbonyl-Verbindungen mit Proteinen der Kulturüberstände zu Iminen, ist ebenfalls denkbar. Diese Verbindungen konnten unter den eingesetzten analytischen Verfahren nicht erfasst werden.

3.4 Die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Carotinoid-abbauendes Enzym aus einem Mikroorganismus beschrieben. Es wurde eine Methode entwickelt, mit der das Carotinoid-spaltende Exoenzym aus dem Kulturüberstand von *Lepista irina* isoliert werden konnte. Durch Ansequenzieren wurde das Protein als polyvalente Peroxidase identifiziert. Es wurde eine Aminosäureteilsequenz erhalten, die eine 97 %ige Homologie zu einem entsprechenden Peptid aus *Pleurotus eryngii* aufwies (siehe 2.4.4) (Ruiz-Duenas et al. 1999).

3.4.1 Bedeutung von Peroxidasen in Basidiomyceten

Die zu den Oxidoreduktasen gehörenden Peroxidasen (EC 1.11.1.) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet und oxidieren mit Hilfe von Wasserstoffperoxid verschiedene Elektronendonatoren.



Man unterscheidet eisenhaltige Peroxidasen und Flavoprotein Peroxidasen, die als prosthetische Gruppe Flavin enthalten. Unter den eisenhaltigen Peroxidasen sind die Ferri-Protoporphyrin Peroxidasen im Pflanzen- und Tierreich sowie unter den Mikroorganismen weit verbreitet. Sie enthalten Hämin als prosthetische Gruppe. Während der Katalyse ändert sich das Absorptionsspektrum des Enzyms, bedingt durch einen Valenzwechsel des Zentralatoms (Belitz und Grosch 1992). Bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid tritt intermediär zunächst eine grüne Komponente auf, in der Eisen in der Oxidationsstufe V vorliegt. Durch einen Ein-Elektronenübergang geht das Enzym in eine blass-rote Verbindung über. Durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons wird schließlich der Reaktionszyklus geschlossen. Abbildung 3.2 fasst den Reaktionsmechanismus zusammen.

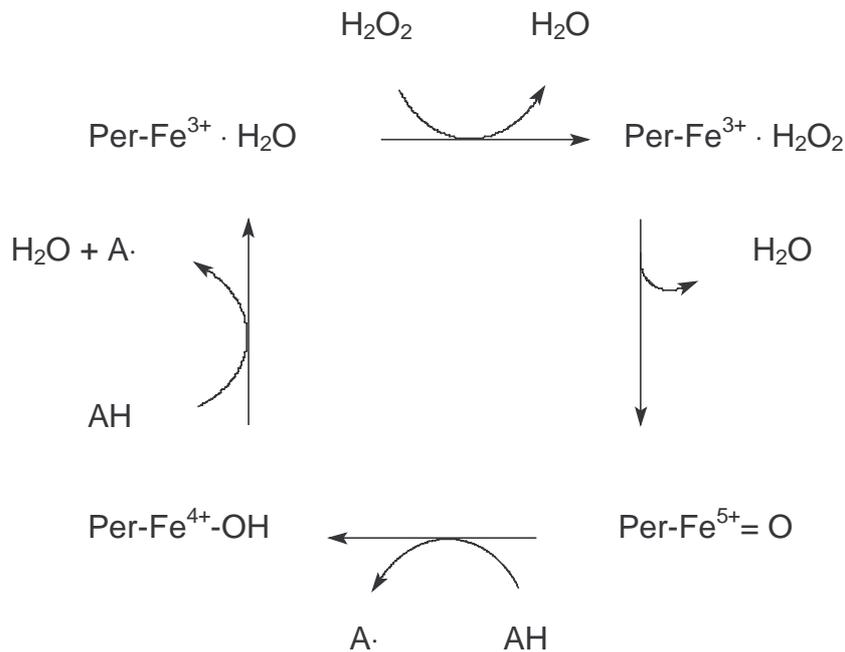


Abb. 3.2 Mechanismus der Katalyse von Peroxidasen (A=Substrat) (nach Whitaker 1972)

Die in Weißfäule-Pilzen vorkommenden Peroxidasen lassen sich im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen:

Manganperoxidasen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von Lignin. Die Enzyme haben in der Regel ein Molekulargewicht von 47 bis 60 kDa und sind glykosidiert. Die isoelektrischen Punkte liegen im sauren Bereich (Gold und Alic 1993). Manganperoxidasen enthalten zwei Calcium-Ionen, die die Struktur des aktiven Zentrums aufrechterhalten, und fünf Disulfid-Bindungen. Die Proteine sind in der Lage, Mangan (II) zu Mangan (III) zu oxidieren, welches seinerseits Phenol-Gruppen in Lignin zu Phenoxyradikalen oxidieren kann. Dies führt zum Abbau des Lignins. Als starkes Oxidationsmittel ist Mangan (III) auch in der Lage, verschiedene nicht phenolische aromatische Substrate, Thiole oder ungesättigte aliphatische Verbindungen wie Lipide zu oxidieren (Jensen et al. 1996). Mangan (III) wird durch organische Säuren wie z.B. Oxalsäure, die von vielen Weißfäule-Pilzen produziert wird, komplexiert und ist stabil genug, um in den Lignin-Cellulose-Komplex zu wandern und den Abbau einzuleiten.

Weitere Enzyme, die in Weißfäule-Pilzen vorkommen und den Abbau von Lignin bewirken, sind Lignin Peroxidasen. Diese Glykoproteine haben ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Isoelektrische Punkte und pH-Optima der katalysierten Reaktionen liegen deutlich im sauren Bereich. Die Hämproteine oxidieren mit Hilfe von Wasserstoffperoxid Ligninsubstrukturen. Die dabei entstehenden Aryl-Radikalkationen bilden bei der Reaktion mit molekularem Sauerstoff zahlreiche Produkte. Ligninperoxidasen sind aber im Gegensatz zu anderen Peroxidasen wie z.B. der Merretich-Peroxidase auch in der Lage, nicht-phenolischen Substanzen zu oxidieren.

In dem Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* wurden zwei Isoenzyme eines neuen Typs von Peroxidasen beschrieben, welche polyvalente Eigenschaften besitzen (Ruiz-Duenas et al. 1999). Vergleiche der Aminosäuresequenz dieser Proteine mit einer Ligninperoxidase und einer Manganperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* zeigten, dass diese Enzyme eine Stellung zwischen Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen einnehmen. Homologievergleiche mit den Peroxidasen aus anderen Basidiomyceten zeigen eine nahe Verwandtschaft der Enzyme zu Lignin- und Manganperoxidasen aus *Trametes versicolor* (Jönsson et al. 1994), einem Pilz, der sich im Screening auch durch die Bleichung des Carotinoid-Agars auszeichnete und die Bildung der gewünschten Abbauprodukte zeigte. Daneben bestehen hinsichtlich der Aminosäuresequenzen Homologien zu Lignin- und Manganperoxidasen aus *Poria subvermispora*, *Phlebia radiata* und *Bjerkandera adusta* (Lobos et al. 1998) (Mester und Field 1998).

Hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften unterscheiden sich die Enzyme aus *Pleurotus eryngii* von anderen Manganperoxidasen (Martinez et al. 1996). Die polyvalenten Peroxidasen oxidieren Mangan (II) zu Mangan (III) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Dadurch können phenolische Substrate wie 2,6-Dimethoxyphenol oxidiert werden. Auch NADPH und NADH können als Substrat dienen. 2,6-Dimethoxyphenol wurde ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid oxidiert, wenn Mangan (II) und NADH in der Reaktionsmischung vorhanden waren (Martinez et al. 1996). Dies führte man darauf zurück, dass durch die Oxidation von NADH Hydroxid-Radikale entstehen, die Mangan (II) zu Mangan (III) oxidieren, welches mit

dem Substrat reagiert. Interessanterweise wurde aber auch eine Mangan unabhängige Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol, Veratryl-Alkohol und anderen Phenolen und synthetischen Azo-Farbstoffen beobachtet. Diese Eigenschaft unterscheidet diesen neuen Typ von Enzym aus *Pleurotus eryngii* von der Manganperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* und anderen Basidiomyceten. Die Mangan-unabhängige Oxidation phenolischer Substrate ist eine Eigenschaft, die charakteristisch für Ligninperoxidasen ist.

Auch eine Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* weist hinsichtlich der Substratspezifität ähnliche Eigenschaften wie die beiden Isoenzyme aus *Pleurotus eryngii* auf (Heinfling et al. 1998). Der neue Typ von Peroxidasen wurde außerdem in *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* identifiziert (Camarera et al. 1996; Sarkar et al. 1997). Diese Enzyme besitzen eine hohe Affinität zu verschiedenen hochmolekularen Azo-Farbstoffen mit einem hohen Redoxpotential, die nicht oder nur sehr langsam von Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen aus anderen Basidiomyceten oxidiert werden. Diese Eigenschaft ist von biotechnologischem Interesse, da Farbstoffe oft Kontaminanten in industriellen Abwässern sind.

Die große Bandbreite der möglichen Substrate kann durch eine unspezifische Substratbindungsstelle oder mehrere Bindungsstellen begründet sein. Bei der Oxidation der Azo-Farbstoffe tritt eine nicht-kompetitive Hemmung durch Zugabe von Mangan-(II)-Ionen auf. Dies legt nahe, dass Mangan und andere Substrate der polyvalenten Peroxidase an unterschiedlichen Stellen des Enzyms gebunden werden.

3.4.2 Reinigung und Charakterisierung der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*

Die chromatographische Reinigung des Enzyms aus *Lepista irina* beruhte auf den hydrophoben Eigenschaften, dem pH-abhängigen Ladungszustand und der Molekülgröße des Proteins. Bei einer Ausbeute von 63 % wurde ein Enzympräparat erhalten, das eine spezifische Aktivität von 281,5 mU mg⁻¹ bezogen auf den β,β -Carotin-Abbau zeigte. Der Aufreinigungsfaktor betrug 42. Das Zielprotein wurde

soweit aufgereinigt, dass elektrophoretisch kein Fremdprotein in der Probe mehr nachweisbar war. Die polyvalente Peroxidase hatte mit rund 1,5 % einen vergleichsweise hohen Anteil am Exoproteingehalt von *Lepista irina*. Dies deutet auf die essentielle Bedeutung im Stoffwechsel des Weißfäule-Pilzes hin. Das Mengenzym dient unter natürlichen Bedingungen wahrscheinlich in erster Linie zum Aufschluss von Lignin, das der Pilz als Kohlenstoffquelle nutzt.

Die in der Literatur beschriebene Aufreinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* erfolgte aus Überständen von Submerskulturen, die zunächst durch Dialyse aufkonzentriert wurden (Martinez et al. 1996). Ein Teil der Fremdproteine wurde dann durch Ionenaustausch abgetrennt, wobei die Bedingungen so gewählt wurden, dass die Zielenzyme nicht an die Austauschermatrix gebunden wurden. Danach erfolgte eine Größenausschluss-Chromatographie. Schließlich wurden die Proteine bei pH 4,5 an einen Anionenaustauscher gebunden und durch einen Natriumchlorid-Gradienten bei einer recht geringer Ionenstärke (0,25 M Natriumchlorid) eluiert. Im letzten Reinigungsschritt gelang die Trennung der beiden Isoenzyme. Bei diesem Verfahren betrug die Ausbeute 56 %, bei einem Reinigungsfaktor von 25.

Den Vergleich der Eigenschaften der polyvalenten Peroxidasen aus *Lepista irina* und *Pleurotus eryngii* zeigt Tabelle 3-1.

Tab. 3-1 Vergleich der polyvalenten Peroxidasen aus *Lepista irina* und *Pleurotus eryngii* (k.A. : keine Angaben) (Ruiz-Duenas et al. 1999)

	<i>Lepista irina</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>
Multiple Enzym Formen	2	2 Isoenzyme
glykosyliert	k.A.	ja (5 bzw. 7% Kohlenhydrat-Anteil)
Molekulargewicht in kDa (SDS-PAGE)	51 (bzw. 45)	je 43
Isoelektrischer Punkt	3,75 (bzw. 3,50)	3,70 bzw. 3,65
pH-Optimum	3,7 (β , β -Carotin-Abbau)	5 (Peroxidase-Aktivität) 4 (Oxidation von Phenolen) 3 (Oxidation anderer aromatischer Substrate)
Temperaturoptimum	34°C	k.A.

Nach dem letzten Reinigungsschritt waren sowohl bei der isoelektrischen Fokussierung als auch bei der SDS-PAGE im wesentlichen zwei Banden erkennbar, die sich nur geringfügig in ihrem isoelektrischen Punkt bzw. dem Molekulargewicht unterschieden. Aus beiden Banden wurden Aminosäureteilsequenzen erhalten, die hohe Homologie zu einem Peptid aus *Pleurotus eryngii* aufweisen. Ob es sich bei diesen multiplen Formen des Proteins um Isoenzyme oder um Modifikationen desselben Proteins handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die hierfür nötigen molekularbiologischen Untersuchungen werden derzeit in Nachfolge-Arbeiten weitergeführt.

Bezüglich des Temperatur- und pH-Optimums sowie des Aktivitätsmaximums während des Kulturverlaufes lässt sich kein direkter Vergleich zu der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* anstellen. Die in Tabelle 3-1 angegebenen pH-Optima des Enzyms aus *Pleurotus eryngii* beziehen sich auf die Oxidation anderer Substrate als die Spaltung von Carotinoiden. Die Werte sind daher nur bedingt vergleichbar. Auffällig ist aber, dass für alle genannten Substrate das pH-Optimum auch hier im sauren Bereich liegt. Das pH-Optimum der Mangan-unabhängigen Oxidation von aromatischen Substraten und Farbstoffen der Enzyme aus *Pleurotus eryngii* liegt bei pH 3. Dies ist möglicherweise durch die Zunahme des Redoxpotentials des oxidierten Häms bei niedrigem pH-Wert zu erklären (Martinez et al. 1996).

Interessanterweise liegt das pH-Optimum des β,β -Carotin-Abbaus durch die *Lepista irina* Peroxidase im Bereich des isoelektrischen Punktes des Proteins. β,β -Carotin ist als reiner Kohlenwasserstoff ein völlig unpolares Substrat, und das Enzym besitzt am isoelektrischen Punkt seine geringste Wasserlöslichkeit. Somit ist es denkbar, dass die Enzym-Substrat-Bindung bei einem pH-Wert von 3,7 besonders begünstigt ist.

Das Aktivitätsmaximum während des Kulturverlaufes von *Lepista irina* liegt unter den gewählten Kultivierungsbedingungen am 10. Kulturtag. Zu diesem Zeitpunkt war die zugesetzte Glucose als Kohlenstoffquelle im Nährmedium weitgehend verbraucht. Die vermehrte Expression eines Lignin abbauenden Enzyms ist bei Auftreten eines Mangels an Glucose biologisch sinnvoll, da der Weißfäule-Pilz in diesem Fall auf die Erschließung anderer Kohlenstoffquellen angewiesen ist.

3.4.3 Carotinoid-abbauende Peroxidasen

Der oxidative Abbau von Carotinoiden mittels Peroxidase-Katalyse ist in Ansätzen beschrieben.

In wässrigem Extrakt aus Paprika (*Capsicum annum* L.) wurde ein Carotinoid bleichendes Protein nachgewiesen (Kanner und Mendel 1977). Das Enzym zeigte nach partieller Aufreinigung die Eigenschaften einer Peroxidase. Es oxidierte

Guajakol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und zeigte das typische Absorptionsspektrum einer Peroxidase.

Bei einer Studie zur Mehlbleichung wurden verschiedene Enzyme wie Catalase, Lipoxygenase und Peroxidase hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Carotinoid-Abbau untersucht (Gelinas et al. 1998). Dabei fiel Lactoperoxidase und Meerrettich-Peroxidase durch die hohe Bleichungsaktivität auf. Der Zusatz von Wasserstoffperoxid erhöhte die Aktivität, war aber für den Carotinoid-Abbau nicht essentiell.

Auch Ekstrand und Björck beobachteten eine Entfärbung von Carotinoiden durch Lactoperoxidase aus Kuhmilch (Ekstrand und Björck 1986). Hier erfolgte allerdings ein Zusatz von Wasserstoffperoxid.

Manganperoxidasen sind unter den Lignin-abbauenden Basidiomyceten weit verbreitet. Trotzdem bewirkten nur wenige der im Screening untersuchten Pilze einen Abbau des β,β -Carotins. Eine polyvalente Peroxidase, die sich von anderen Manganperoxidasen unterscheidet, wurde als Carotenoid-abbauendes Enzym ermittelt. Daraus lässt sich ableiten, dass der enzymatische Abbau von Carotinoiden nicht durch herkömmliche Manganperoxidasen katalysiert wird, da sonst weit mehr Basidiomyceten diese Fähigkeit besitzen müssten. Die besonderen Eigenschaften der polyvalenten Peroxidasen wie eine breite Substratazeptanz und die Mangan unabhängige Oxidation von verschiedenen Substraten müssen maßgeblich für die Katalyse des Carotinoid-Abbaus sein.

Ein entscheidender Punkt ist, dass die enzymatische Spaltung von Carotinoiden mit Hilfe des Enzyms aus *Lepista irina* ohne den Zusatz von Peroxiden gelang, während für die meisten Reaktionen pflanzlicher und mikrobieller Peroxidasen der Zusatz von Wasserstoffperoxid als essentiell beschrieben wird. In den Kulturmedien der Pilze sind natürlicherweise Peroxide in ausreichenden Mengen vorhanden. Sie entstehen durch die Katalyse extrazellulärer peroxidbildender Enzyme wie z.B. Glyoxaloxidase, Pyranoseoxidase oder Aryl-Alkoholoxidase, die unter natürlichen Voraussetzungen am Abbau von Lignin beteiligt sind. Eine Aryl-Alkoholoxidase wurde im Kulturüberstand von *Lepista irina* nachgewiesen. In aufgereinigten Enzymproben ist

nach den chromatographischen Reinigungsschritten das Vorhandensein von Peroxiden aber ausgeschlossen. Insbesondere nach dem letzten Reinigungsschritt waren außerdem keine Fremdproteine mehr vorhanden. Daher scheidet auch die Möglichkeit der Anwesenheit von peroxidbildenden Enzymen aus. Darüber hinaus standen für solche Enzyme in dem ausschließlich Citronensäure, Natriumphosphat, Tween 40 und β,β -Carotin enthaltenden Testansatz keine Substrate zur Verfügung. Auch waren alle für den Aktivitätstest und den Umsatz mit aufgereinigtem Enzym verwendeten Emulgatoren nachweislich peroxidfrei.

Bao et al. stellten fest, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Mangan, molekularem Sauerstoff und Manganperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* peroxidiert wurden (Bao et al. 1994). Nicht-phenolische Lignin-Bestandteile wurden durch die entstandenen Peroxyradikale in einer Art Co-Oxidation gespalten. Für die eigenen Versuche konnte eine Spaltung des β,β -Carotins durch Co-Oxidation ausgeschlossen werden, da als Emulgator Tween 40 verwendet wurde, der keine ungesättigten Fettsäuren enthält. Außerdem gelang der Umsatz auch unter Verwendung des gänzlich fettsäurefreien Emulgators Triton X 100 (Veddeler 2002). Daneben zeigten die eigenen Versuche zur Co-Oxidation mit isolierten Fettsäure-Hydroperoxiden, dass hierbei eine völlig andere Kinetik vorliegt. Interessant an der oben genannten Studie ist aber, dass Manganperoxidasen in Abwesenheit von Peroxiden Aktivität zeigen.

Auch die Epoxidierung und der Bruch von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen durch Peroxidasen aus Basidiomyceten ist beschrieben (Tuynmann et al. 2000). Eine Myeloperoxidase und eine Peroxidase aus *Coprinus cinereus* katalysierten die Epoxidierung von Styrolen, wobei auch Benzaldehyd-Derivate detektiert werden konnten, die durch die oxidative Spaltung der Doppelbindung entstehen. Diese Reaktion wurde ohne das Vorhandensein von Phenolen als Co-Substrat katalysiert, obwohl die direkte Spaltung von Kohlenstoff-Bindungen bei anderen Substraten als Phenolen bisher nur für Ligninperoxidasen beschrieben war. Der Gehalt an Benzaldehyd-Derivaten war dabei proportional zur eingesetzten Enzymmenge, was eindeutig für einen direkten enzymatischen Prozess spricht. Über den Mechanismus der oxidativen Spaltung des Kohlenstoffgerüsts herrscht Unklarheit. Es ist anzunehmen, dass zunächst ein Elektron des Alkens abstrahiert wird. Das

entstehende Radikal-Kation kann über ein Kation-Intermediat oder ein Radikal-Intermediat weiterreagieren. Durch die Reaktion mit Wasserstoffperoxid und ggf. Wasser entsteht möglicherweise ein enzymgebundenes oder freies Hydroperoxid, welches unter Abspaltung von Wasser in zwei Carbonyl-Verbindungen zerfällt. Abbildung 3.3 stellt den möglichen Mechanismus dar.

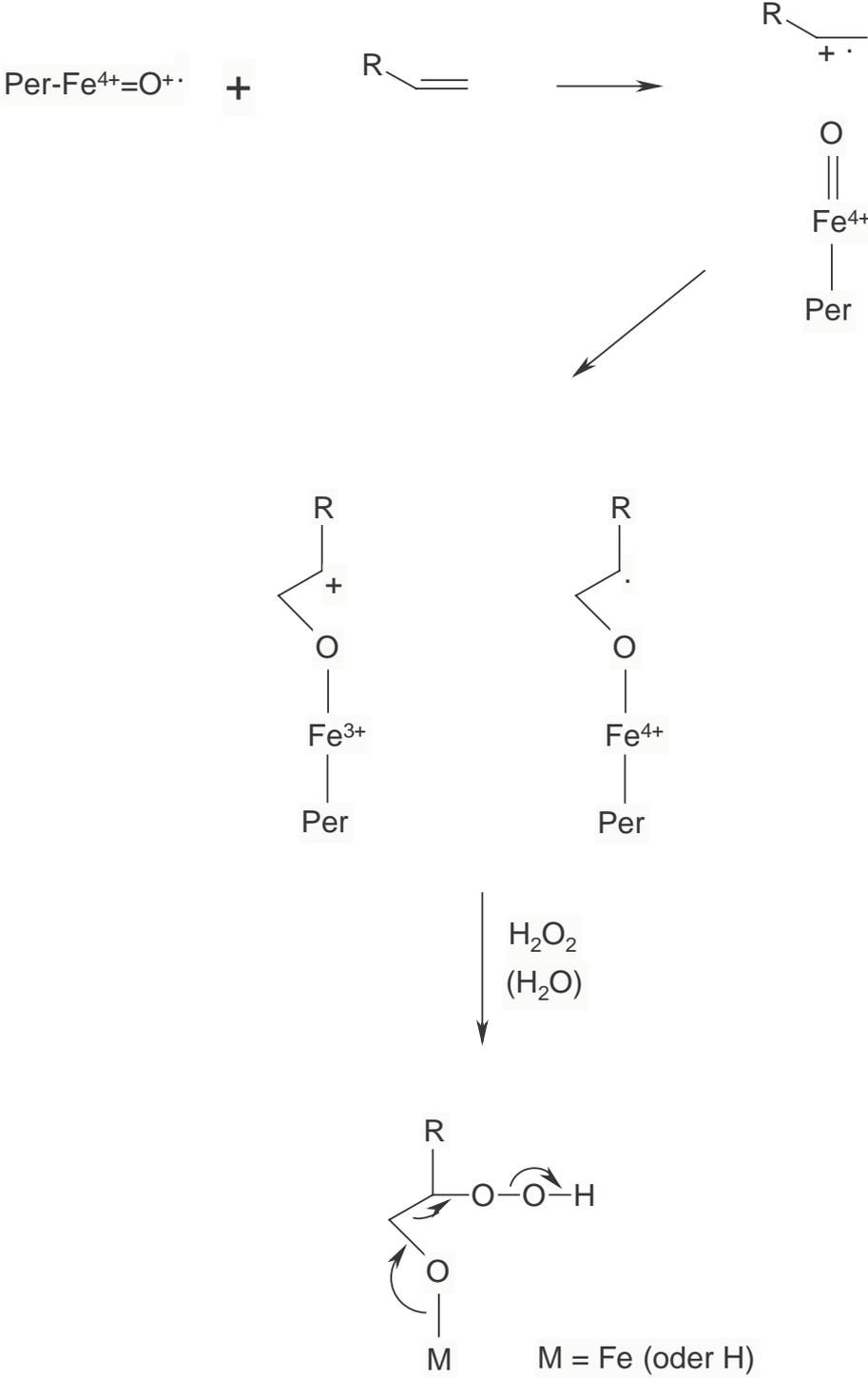


Abb. 3.3 Postulierter Mechanismus der Spaltung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen durch Peroxidasen (nach Tuynmann et al. 2000)

Der oben beschriebene Mechanismus lässt sich nicht direkt auf die Carotinoid-Spaltung übertragen, da der Bruch des Kohlenstoffgerüsts in diesem Fall ohne Zusatz von Peroxiden stattfand. Da Peroxidasen generell die Oxidation der Substrate durch Ein-Elektronen-Übergänge einleiten, ist anzunehmen, dass auch bei der oxidativen Spaltung der Tetraterpene zunächst ein H-Atom abstrahiert wird (Abb. 3.4). Die Abspaltung ist aufgrund der Allylstellung besonders an den Methylgruppen des Carotin-Moleküls begünstigt. Die Doppelbindung im Cyclohexen Ring ist sterisch abgeschirmt. Bei der H-Abspaltung an C₂₀ und insbesondere an C₁₉ bildet sich ein Mesomerie-stabilisiertes Radikal. Durch Reaktion mit Sauerstoff kann ein Hydroperoxid entstehen. Dieses Intermediat kann durch eine Hock-Spaltung in zwei Carbonyl-Verbindungen zerfallen (Falbe und Regitz 1995). Dies würde die Entstehung von β -Ionon als Hauptprodukt erklären.

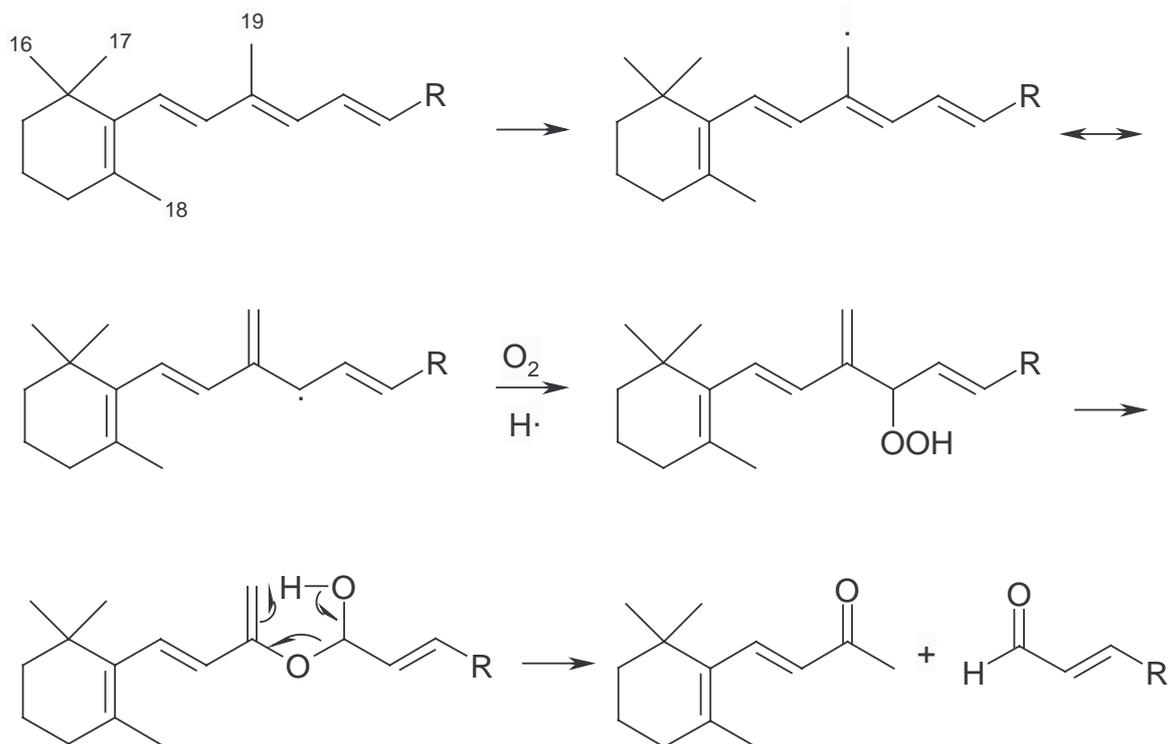


Abb. 3.4

Möglicher Mechanismus der oxidativen Spaltung von β , β -Carotin zu β -Ionon

Die Bildung von Dihydroactinidiolid wurde sowohl durch die Umsetzung von β,β -Carotin mit Kulturen von *Hypomyces odoratus* als auch mit den Kulturüberständen von *Lepista irina* beobachtet. Auch der Bildung des C-11-Lactons aus β,β -Carotin liegt vermutlich ein radikalischer Mechanismus zugrunde.

Ein möglicher Reaktionsweg ist in der Literatur für das System Xanthin Oxidase / Acetaldehyd beschrieben (Bossler et al. 1995). Hiernach verläuft die Bildung von Dihydroactinidiolid über die Epoxidierung von β,β -Carotin oder β -Ionon bei Temperaturen unter 40 °C. Das Lacton kann beispielsweise aus Epoxy-5,6- β -Ionon entstehen, welches entweder durch die Epoxidierung von β -Ionon oder durch die Spaltung von Epoxy-5,6- β,β -Carotin gebildet werden kann. Möglich ist auch der direkte Weg über ein Furanderivat (Abb. 3.5).

Für den β,β -Carotin-Abbau durch *Hypomyces odoratus* ist β -Ionon als direkter Precursor für Dihydroactinidiolid unwahrscheinlich, da der Kultur zugesetztes β -Ionon nicht zu Dihydroactinidiolid umgesetzt wurde (vgl. 3.3.1). Für die Bildung von Dihydroactinidiolid durch *Lepista irina* ist sowohl die Epoxidierung von β,β -Carotin als auch von β -Ionon denkbar. Epoxydierte Verbindungen wurden in den Reaktionsmischungen jedoch in keinem der beiden Fälle nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ihre relativ hohe Reaktivität.

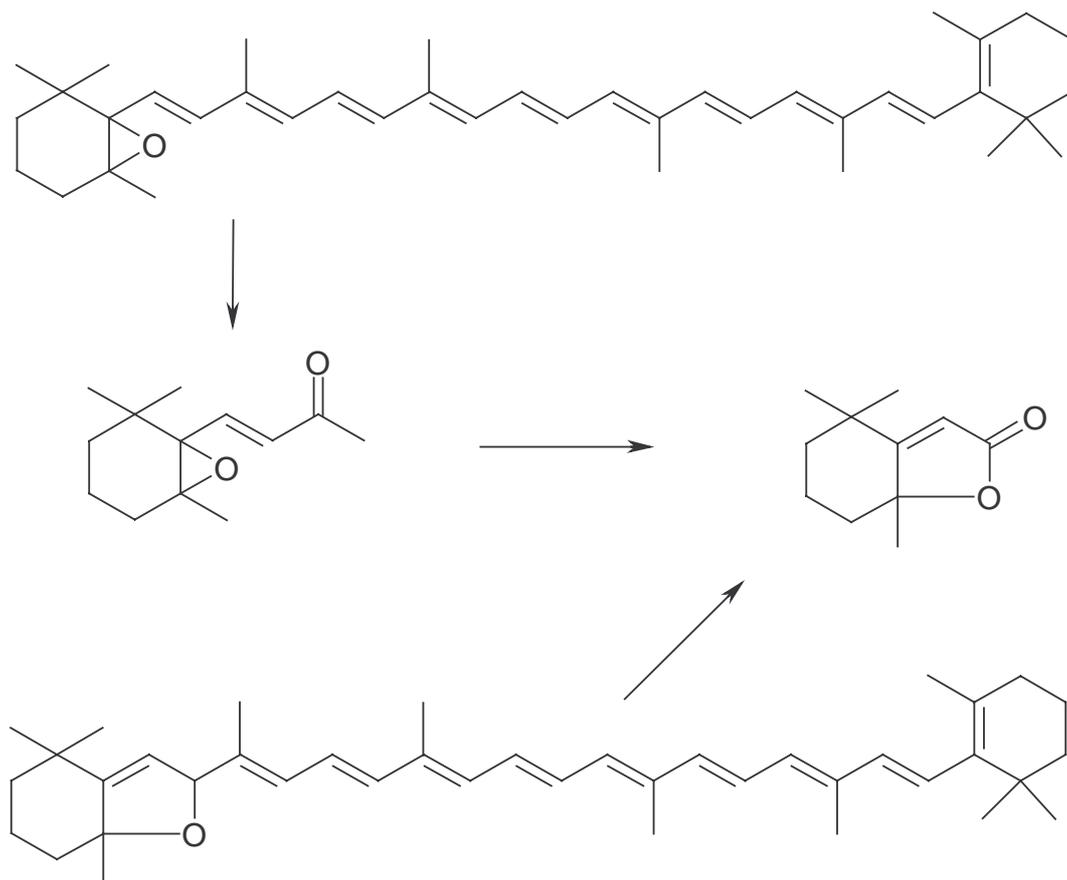


Abb. 3.5

Möglicher Mechanismus der Bildung von Dihydroactinidiolid (nach Bosser et al. 1995)

Ein möglicher Bildungsweg von C-9-Spaltprodukten, wie das bei den Umsetzungen nachgewiesene 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon, ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Die Bildung von C-9-Nor-Isoprenoiden lässt sich durch H-Abstraktion an C₁₈ und die Bildung eines C-6-Hydroperoxides erklären. Die Peroxy-Bindung kann dabei durch Zufuhr geringer Energiemengen wie Wärme homolytisch gespalten werden. Das entstehende Alkoxy-Radikal reagiert möglicherweise durch β -Spaltung zu C-9-Carbonylverbindungen. Im sauren Kulturmedium von *Lepista irina* (pH 4 bis 4,5) ist die Entstehung von hydroxylierten Verbindungen durch Hydratisierung der Kohlenstoff-Kohlenstoff Doppelbindung möglich.

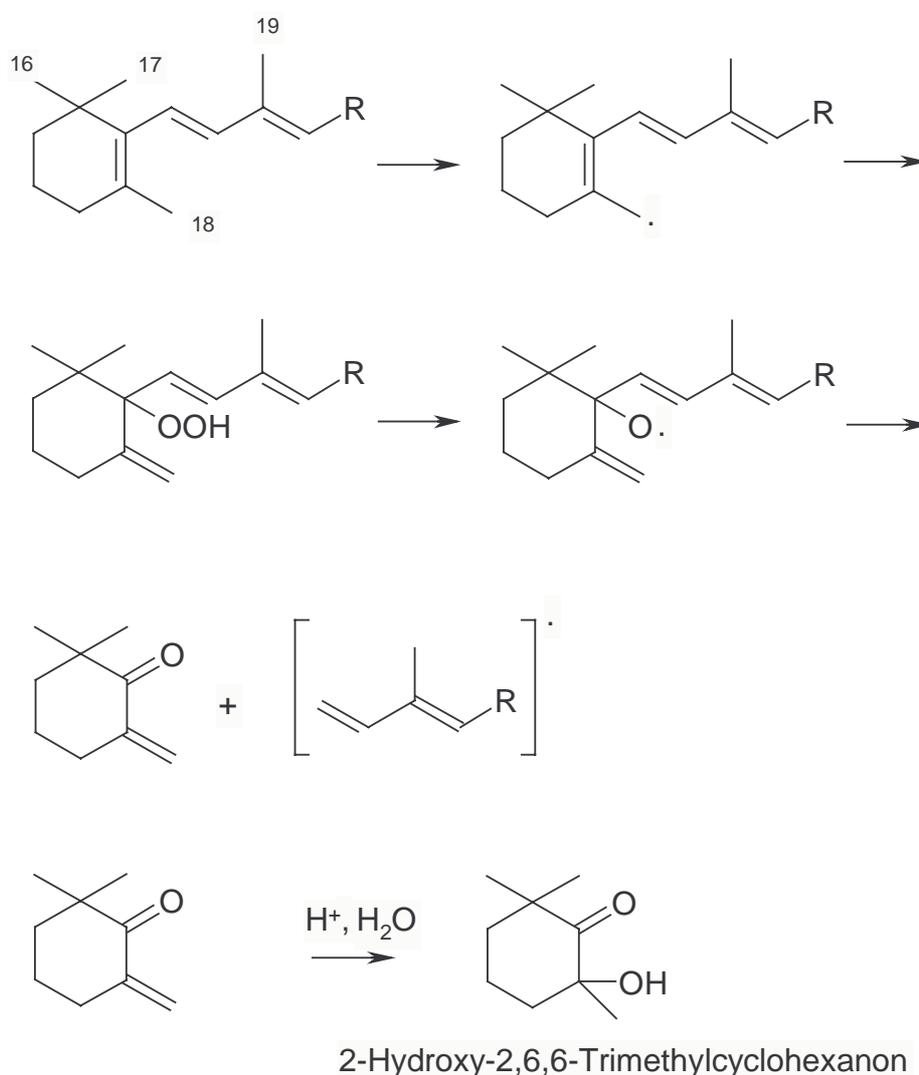


Abb. 3.6

Möglicher Mechanismus der Bildung von C9-Isoprenoiden

3.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden β,β -Carotin und β,ϵ -Carotin als Substrate für die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* untersucht. Dabei konnte die Bildung der aromarelevanten C-13-Ketone β -Ionon und α -Ionon nachgewiesen werden. In weiteren Projekten sollen weitere Carotinoide mit dem Enzym umgesetzt werden. Besonders interessant ist das Substrat Neoxanthin, bei dessen Spaltung zwischen C₉ und C₁₀ *Grashopper*-Keton entsteht, welches ein Vorläufer für β -Damascenon darstellt. Auch andere Carotinoide wie Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Kryptoxanthin oder Capsanthin sollen eingesetzt werden, um die Substratspezifität des Enzyms zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Exoenzym aus Kulturüberständen von *Lepista irina* isoliert. Auch andere Basidiomyceten wie *Marasmius scorodonius* bauten das Substrat durch Exoenzyme ab. Die Isolierung und Charakterisierung dieser Proteine ist Gegenstand weiterführender Arbeiten. Im Screening von über 50 Mikroorganismen waren auch Pilze aufgefallen, die möglicherweise über zelluläre Carotinoid-spaltende Enzyme verfügen. Unter anderem zeigte der Ascomycet *Hypomyces odoratus* in zellhaltigen Ansätzen den Abbau von β,β -Carotin. In weiteren Projekten soll die Aufreinigung und Charakterisierung der entsprechenden zellulären Proteine fortgeführt werden.

Die Isolierung und Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* führte zu einem Enzympräparat, das frei von Fremdproteinen war. Die gelelektrophoretischen Untersuchungen zeigten das Vorhandensein von zwei multiplen Enzymformen. Ob es sich hierbei um Isoenzyme oder Modifikationen desselben Proteins handelt, soll durch molekularbiologische Untersuchungen geklärt werden, die bereits begonnen wurden. Nach Lokalisierung des Strukturgens oder der Strukturgene besteht die Möglichkeit, das Enzym durch Expression in einen geeigneten Expressions-Vektor in größerem Maßstab verfügbar zu machen.

Der Mechanismus der Spaltung von Carotinoiden durch die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Eine mögliche Steigerung der enzymatischen Aktivität durch den Zusatz von Mangan-Ionen sowie geringer Mengen Wasserstoffperoxid ist zu untersuchen.

Die Charakterisierung des Enzyms beschränkte sich in der vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums, des isoelektrischen Punktes und des Molekulargewichtes. Untersuchungen zur Substratkinetik sollen Gegenstand weiterer Studien sein.

Die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* bietet nicht nur die Möglichkeit der biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen. Das Enzym besitzt die Fähigkeit Carotinoide innerhalb kurzer Zeit vollständig zu entfärben. Denkbar ist der Einsatz von modifizierten Enzympräparaten in der Waschmittelindustrie. Die Entfernung von Carotinoid-haltigen Verunreinigungen aus der Wäsche stellt bislang ein noch ungelöstes Problem dar. Erste Untersuchungen zur Bleichung von Ketchup- und Karottenflecken aus Baumwollfasern wurden bereits erfolgreich mit enzymhaltigen Kulturüberständen durchgeführt.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

4.1.1 Mikroorganismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen-Stämme wurden bezogen von:

- der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen (CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures) in Baarn (List of cultures 1994).
- der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig
- der Pilzkultursammlung der Friedrich Schiller Universität (FSU) in Weimar
- der landwirtschaftlichen Universität in Wageningen (Wag.) (De Jong et al. 1992)

Tab. 4-1 Verwendete Mikroorganismen

Art	Stamm	Art	Stamm
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CBS 447.62	<i>Omphalotus olearius</i>	DSM 3398
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CBS 318	<i>Paxillus involutus</i>	CBS 477.89
<i>Curvularia lunata</i>	DSM 63137	<i>Penicillium citrinum</i>	DSM 1179
<i>Cyathus africanus</i>	DSM 1593	<i>Penicillium digitatum</i>	DSM 2748
<i>Cyathus pallidus</i>	CBS 376.80	<i>Penicillium italicum</i>	DSM 2755
<i>Cyathus striatus</i>	DSM 1652	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	DSM 5136
<i>Cystoderma carcharias</i>	CBS 157.47	<i>Phellinius igniarius</i>	DSM 4818
<i>Drechslera spiciferum</i>	DSM 63275	<i>Phlebia radiata</i>	DSM 5111
<i>Fomitopsis pinicola</i>	DSM 4957	<i>Pholiota populnea</i>	CBS 264.32
<i>Fusarium fujikuroi</i>	CBS 183.29	<i>Pholiota squarosa</i>	CBS 570.87
<i>Fusarium moniliforme</i>	DSM 764	<i>Phycomyces blakesleanus</i>	CBS 188.27
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS 250.61	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	FSU P125-7
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	CBS 444.61	<i>Pleurotus euosmus</i>	DSM 5331
<i>Guignardia citricarpa</i>	DSM 102373	<i>Pleurotus lampas</i>	CBS 323.49
<i>Hypomyces odoratus</i>	CBS 764.68	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	DSM 5339
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	CBS 311.29	<i>Pleurotus sapidus</i>	DSM 8266
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS 2359	<i>Polyporus umbellatus</i>	CBS 482.72
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	DSM 1013	<i>Rhizoctonia carotae</i>	CBS 464.48
<i>Lentinellus cochleatus</i>	FSU L 13-2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	CBS 994
<i>Lentinellus deliciosus</i>	CBS 450.79	<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 3008
<i>Lentinus lepidus</i>	CBS 581.63	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1250
<i>Lepista irina</i>	CBS 458.79	<i>Trametes hirsuata</i>	CBS 282.73
<i>Lepista nuda</i>	CBS 300.53	<i>Trametes suaveolens</i>	DSM 5237
<i>Marasmius alliaceus</i>	CBS 470.79	<i>Trametes versicolor</i>	Wag. EIK 39
<i>Marasmius scorodonius</i>	CBS 850.87	<i>Phaffia rhodozyma</i>	CBS 5905
<i>Microbotryum violaceum</i>	CBS 143.21		

4.1.2 Verwendete Chemikalien

Tab. 4-2 Nährmedienbestandteile

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. Mikrobiol.	Merck
L-Asparagin-Monohydrat	99 %	Merck
Hefeextrakt	f. Mikrobiol.	Merck
Agar-Agar	f. Mikrobiol.	Merck
KH ₂ PO ₄	f. Mikrobiol.	Merck
MgSO ₄	Chem. Rein DAB 7	Riedel-de-Haen
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-de-Haen
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	puriss. p.a.	Fluka
MnSO ₄ x H ₂ O	> 98 %	Fluka
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	99 %	Baker
Titriplex III	> 99 %	Merck

Tab. 4-3 Chemikalien für die Proteinbiochemie

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Acrylamidlg. (Rotiphorese Gel A)	-	Roth
Agarose	f. Molekularbiol.	Roth
Ammoniumpersulfat	> 98 %	Roth
L-Arginin	f. Mikrobiol.	Fluka
L-Asparaginsäure	-	ICN
Bisacrylamidlg. (Rotiphorese Gel B)	-	Roth
Bradford-Reagenz (Roti [®] -Quant)	-	Roth
Bromphenolblau	f. Elektrophorese	Roth
Citronensäure Monohydrat	puriss. p.a.	Fluka
Ethylendiamin	-	Merck
L-Glutaminsäure	> 99 %	Fluka
Glycerol	> 98 %	Roth
L-Glycin	analytical grade	Serva
Kerosin	purum	Fluka
KH ₂ PO ₄	p.a.	Riedel-de-Haen

L-Lysin	> 97 %	Fluka
2-Mercaptoethanol	98 %	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	p.a.	Fluka
Natriumdodecylsulfat	>99 %	Roth
(NH ₄) ₂ SO ₄	f. biochem. Zwecke	Merck
Rinder-Serumalbumin	-	Fluka
Saccharose	99 %	Sigma
TEMED	f. Elektrophorese	Roth
Trichloressigsäure	> 99,5 %	Fluka
Tris	>99 %	Fluka

Tab. 4-4 Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Borax	-	Riedel-de-Haen
β,β-Carotin	> 97 %	Fluka
FeSO ₄ x 7H ₂ O	reinst	Riedel-de-Haen
α-Ionon	> 92 %	Roth
β-Ionon	95 %	Fluka
KOH	p.a.	Riedel-de-Haen
Linolsäure	99 %	Fluka
Lipoxygenase Typ 1b	110,6 U mg ⁻¹ Feststoff	Sigma
NaCl	reinst	Appli Chem
NaHCO ₃	reinst	Riedel-de-Haen
NaOH	reinst	Riedel-de-Haen
Na ₂ SO ₄	98 %	Riedel-de-Haen
Salzsäure	reinst	Riedel-de-Haen
α-Terpineol	99 %	Fluka
Tween 20 ^a	-	Fluka
Tween 40	-	Sigma
Tween 65	-	Fluka
Tween 80	-	Fluka

^a Alle verwendeten Emulgatoren wurden auf ihre Peroxidfreiheit überprüft und gegebenenfalls vor Gebrauch kurz erhitzt.

4.1.3 Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Fassware) wurden vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Das Gemisch Pentan/Dichlormethan wurde aus den in Tabelle 4-5 aufgeführten Lösungsmitteln hergestellt.

Tab. 4-5 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Verwendung	Qualität	Herkunft
Dichlormethan	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Dichlormethan	HPLC	HPLC	Baker
Ethanol, unvergällt	Kultivierung	redest.	Kraul und Wilkening
Ethylacetat	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Methanol	Zellaufschluss	redest.	Hochschullieferung
Methanol	HPLC	HPLC	Baker
Pentan	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Petrolether	Extraktion	redest.	Hochschullieferung

4.1.4 Gase

Tab. 4-6 Gase

Gas	Verwendung	Qualität	Lieferant
Wasserstoff	Träger- und Detektorgas (GC/FID)	5.0	Linde
Helium	Trärgas (GC/MS)	5.0	Linde
Stickstoff	Spülgas (GC)	5.0	Linde
Luft	Detektorgas (GC)	getrocknet	Kompressor ^a
Sauerstoff	Lipoxygenase Reaktion	5.0	Linde

^a Außenluft wurde über einen Staubfilter angesaugt und nach der Kompression durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor zur Trocknung durch eine Silicasäule geleitet.

4.1.5 Sonstige Hilfsmittel

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

Tab. 4-7 Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus
Brutschrank	BE 500	Memmert
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
Gelkammer	Protean II xi	Bio Rad
Kältezelle	CS 0900 S	Viessmann
Kühlschrank	KS 1300 E	Foron
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
Mixer	Rotor GT 800	
pH-Meter	731 Calimatic	Knick
Potter	IK-KW 15	Janke & Kunkel
Power Supply 2		Bio Rad
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
Rührwerkskugelmühle	DYNO-Mill Typ KDL	W. A. Bachofen
Schüttler	Infors HAT	Infors
Sterile Werkbank	Laminar-Flow-Modul 821 / 825	Stangel
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	LAT
Ultra-Turrax	TP-18/10	Janke & Kunkel
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun
Vakuumpumpe	Two Stage Nr. 3	Edwards
Vakuumbzentrifuge	Sorvall RC 28 S	Kendro
Wasserbad	Julabo 20 B	Julabo
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus
Zentrifuge	Sorvall RT7 Plus	Kendro

4.2 Versuche zur Co-Oxidation

4.2.1 Co-Oxidation von Carotinoiden aus Karotten im System

Linolsäure/Lipoxygenase (Belin et al. 1994)

2 kg Karotten wurden mit dem Küchenmixer zu Saft verarbeitet und am Rotationsverdampfer (40°C, 50 mbar) bis zu einer Trockenmasse von 200 g L⁻¹ und einem Carotinoid-Gehalt von 110 mg L⁻¹ β,ε-Carotin und 205 mg L⁻¹ β,β-Carotin aufkonzentriert. 555 g des Karottensaftkonzentrates, 375 g Sojamehl, 57,2 g Safloröl, 500 kU Lipase und 7,2 g Calciumchlorid wurden gemischt. Nach Zugabe von 500 mL Wasser wurde 40 h lang 10 L min⁻¹ Luft unter Rühren im Bioreaktor durch die Mischung geleitet. Der Ansatz wurde mittels Wasserdampfdestillation aufgearbeitet. Dabei wurden 500 mL Destillat erhalten. Das Destillat wurde drei mal mit je 75 mL Pentan/Dichlormethan (1:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet (5°C, über Nacht) und an einer Vigreux-Colonne bei 44°C Badtemperatur und Normaldruck auf 50 mL eingengt. Der Extrakt wurde per GC/FID analysiert.

4.2.2 Versuche zum Abbau von β,β-Carotin mit 13-Hydroperoxy-octadecadiensäure (13-HPOD)

4.2.2.1 Synthese von 13-HPOD (Rehbock 1998)

120 mg Linolsäure emulgiert in 80 mL 0,1 M Natriumborat-Puffer wurden mit 770 U Lipoxygenase versetzt und unter Rühren bei 0°C (im Eisbad) 20 min unter kontinuierlicher Einleitung von Sauerstoff (2 mL min⁻¹) umgesetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 m HCl auf 5,0 abgesenkt und eine Festphasenextraktion an 1 g RP-18 Kartuschen (Baker) durchgeführt. 13-HPOD wurde mit 15 mL Methanol in einen Messkolben eluiert und auf 20 mL aufgefüllt. Die Konzentration von 13-HPOD wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 235 nm bestimmt (Quarzküvette, Dicke: 1 cm). Für die Berechnung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 25.000 verwendet (Almosnino et al. 1996). Die Berechnung führte zu einem Wert von über 85 % Ausbeute.

4.2.2.2 Umsetzungen von β,β -Carotin mit 13-HPOD

Jeweils 10 mg β,β -Carotin wurden in 20 mL eines Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches gelöst, mit methanolischer 13-HPOD-Lösung (nach 4.2.2.1) sowie Eisen(II)sulfat-Lösung (2 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ in 10 mL H_2O) versetzt und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Art des Lösungsmittels, das Volumen der 13-HPOD-Lösung und der Eisen(II)sulfat-Lösung sowie die Reaktionszeit wurden variiert. Als Blindwert diente β,β -Carotin ohne Zusatz von 13-HPOD. Zur Bestimmung der flüchtigen Abbauprodukte wurde die Mischung per GC/FID und GC/MS (nach 4.7.2.1 und 4.7.2.2) untersucht. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.2.2.2.1 Variation des Eisen(II)sulfat-Menge

β,β -Carotin wurde jeweils in Ethylacetat/n-Hexan (1:1) gelöst und mit 4 mL 13-HPOD-Lösung versetzt. Es wurden je 10 μL , 20 μL , 50 μL und 100 μL der Eisen(II)sulfat-Lösung zugegeben und acht Stunden erhitzt.

4.2.2.2.2 Variation der Menge an 13-HPOD

β,β -Carotin wurde jeweils in Ethylacetat/n-Hexan (1:1) gelöst und mit 100 μL Eisen(II)sulfat-Lösung versetzt. Es wurden verschiedene Volumina der methanolischen 13-HPOD-Lösung zugegeben. Durch Zugabe entsprechender Mengen Methanol wurde das Volumen der Reaktionsmischung auf 29 mL eingestellt (Tab.4-8). Die Mischung wurde acht Stunden erhitzt.

Tab.4-8 Variation der eingesetzten Menge an 13-HPOD

Probe	Volumen 13-HPOD-Lsg. [mL]	Volumen Methanol [mL]
1	0,5	8,5
2	2	7
3	3	6
4	6	3
5	9	-

4.2.2.2.3 Erhöhung des Sauerstoff-Gehaltes

β,β -Carotin wurde in n-Hexan/Ethylacetat (1:1) gelöst. Die Mischung wurde mit 100 μL Eisen(II)sulfat-Lösung versetzt. Es wurden 2 mL der methanolischen 13-HPOD-Lösung zugegeben und acht Stunden erhitzt. Dabei wurde ein Luftstrom (2 mL min^{-1}) durch die Lösung gesaugt. Als Blindwert diente ein entsprechender Ansatz ohne Durchleiten von Luft.

4.2.2.2.4 Variation des Lösungsmittels

β,β -Carotin wurde jeweils in n-Hexan/Ethylacetat (1:1), Toluol, Dichlormethan und tert-Butylmethylether gelöst. Die Mischung wurde mit 100 μL Eisen(II)sulfat-Lösung versetzt. Es wurden 2 mL 13-HPOD-Lösung zugegeben und acht Stunden erhitzt.

4.2.2.2.5 Optimierte Bedingungen

β,β -Carotin wurde in tert-Butylmethylether gelöst, mit 9 mL 13-HPOD-Lösung und 100 μL Eisen(II)sulfat-Lösung versetzt und acht Stunden erhitzt.

4.3 Mikrobiologie

4.3.1 Kulturmedien

Nr. 1 Standard-Nähr-Agar

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0	g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5	g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5	g L ⁻¹
Agar-Agar	15,0	g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0	mL L ⁻¹
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH		

Nr. 2 Carotin-Agar

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0	g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5	g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5	g L ⁻¹
Agar-Agar	15,0	g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0	mL L ⁻¹
β,β-Carotin	125	mg L ⁻¹
Tween 40	12,5	g L ⁻¹
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH		

Zur Herstellung des Agars wurden 12,5 g Tween 40 und 125 mg β,β-Carotin in etwa 200 mL Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitgehend abgedampft, der Rückstand vor dem Autoklavieren mit Standard-Nähr-Agar aufgenommen und letzte Dichlormethanreste am Rotationsverdampfer entfernt.

Nr. 3 Standard-Nähr-Medium

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0	g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5	g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5	g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0	mL L ⁻¹
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH		

Nr. 4 Carotin-Medium

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0	g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5	g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5	g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0	mL L ⁻¹
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH		

Zur Herstellung des Mediums wurden 12,5 g Tween 40 und 125 mg β,β -Carotin in etwa 200 mL Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitgehend abgedampft und der Rückstand vor dem Autoklavieren mit sterilem Wasser aufgenommen. Die Mischung wurde am Rotationsverdampfer weiter eingeeengt bis keine Reste des Lösungsmittels mehr vorhanden waren. Alle anderen Mediumbestandteile wurden nach dem Autoklavieren mit der sterilen β,β -Carotin-Lösung vermischt.

4.3.2 Kulturführung

4.3.2.1 Stammhaltung

Von jedem verwendeten Stamm wurden jeweils zwei Stammkulturen in Petrischalen auf Standard-Nähr-Agar gehalten. Die Platten wurden mit gut bewachsenen Stücken (etwa 1 cm²) von Agarplatten-Vorkulturen beimpft und zum Schutz vor Kontaminationen mit Parafilm verschlossen. Nach unterschiedlich langem Wachstum bei 24°C im Brutschrank wurden die Petrischalen mit gut bewachsenen Kulturen bis zu sechs Monaten im Kühlschrank bei 5°C gelagert.

4.3.2.2 Vorscreening

Etwa 1 cm² große, gut bewachsene Stückchen der Stammkulturen (s.o.) wurden in mit Carotin-Agar gefüllte Petrischalen überführt. Nach dem Verschließen der Platten mit Parafilm wurden die Mikroorganismen je nach Wachstumsgeschwindigkeit 10 bis 20 Tage im Brutschrank bei 24°C inkubiert. Die bewachsenen Platten wurden bis zu drei Monaten bei 5°C gelagert.

4.3.2.3 Screening

Vorkultur

Ein etwa 1 cm² großes bewachsenes Carotin-Agar Stückchen wurde in einen 100 mL Standard-Nähr-Medium enthaltenden 300 mL Kulturkolben überführt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert (Stufe 4, 30 s). Die Kultivierung erfolgte bei 24°C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes ein bis drei Wochen.

Experimentelle Kultur

10 mL der frisch homogenisierten (s.o.) Vorkultur wurde in einen 100 mL Standard-Nähr-Medium enthaltenden 300 mL Kulturkolben pipettiert. Die Kultivierung erfolgte bei 24°C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes ein bis drei Wochen.

4.3.2.4 Kulturführung für weitere Untersuchungen und Proteinisolierung

Vorkultur

Ein gut bewachsenes Carotin-Agar Stückchen wurde in 100 mL Standard-Nähr-Medium überführt und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (Stufe 4, 30 s). Die Kultivierung erfolgte bei 24°C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht zwei Wochen.

Experimentelle Kultur

20 mL der frisch homogenisierten (s.o.) Vorkultur wurde in einen 250 mL Standard-Nähr-Medium enthaltenden 500 mL Kulturkolben pipettiert. Die Kultivierung erfolgte bei 24°C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht 10 bis 14 Tage.

4.3.3 Bestimmung einiger Kulturparameter

4.3.3.1 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes im Kulturmedium erfolgte direkt nach der Probenahme mit einem zuvor kalibriertem pH-Meter.

4.3.3.2 Glucose-Gehalt

Der Glucose-Gehalt im Kulturmedium wurde sofort nach der Probenahme mit Glucose-Teststreifen, Diabur Test 5000 (Boehringer, Mannheim) abgeschätzt.

4.3.3.3 Biotrockenmasse

Ein definiertes Medium-Volumen wurde über ein tariertes Rundfilter gesaugt und mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Rundfilter und Mycel wurden bei 103°C 12 h getrocknet und die Biotrockenmasse durch Differenzwägung des abgekühlten Rundfilters bestimmt.

4.3.3.4 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit

Durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen wurde sichergestellt, dass die Kulturen nicht kontaminiert waren.

4.4 Screening von Mikroorganismen auf β,β -Carotin-Abbau

4.4.1 Hinweise zum Umgang mit Carotinoiden

Aufgrund der Licht- und Wärmeempfindlichkeit von Carotinoiden wurden alle Carotinoid-haltigen Lösungen am jeweiligen Versuchstag frisch angesetzt. Die Herstellung von Lösungen und Extrakten erfolgte unter strengem Ausschluss von Licht und wenn möglich unter Kühlung im Eisbad. Zum Einrotieren oder Aufkonzentrieren wurden möglichst niedrige Temperaturen (etwa 40°C) angewendet. Zwischenprodukte und Extrakte wurden unter Schutzgas bei -20°C gelagert. Inkubationen und Kultivierungen mit Carotin-haltigen Lösungen wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Extraktion der Proben erfolgte in Braunglas Schütteltrichtern, das Aufkonzentrieren in mit Aluminiumfolie umwickelten Gefäßen. Die Proben wurden möglichst sofort nach der Aufarbeitung chromatographisch untersucht. Wenn dies nicht möglich war, wurden sie bei -20°C unter Stickstoff gelagert.

4.4.2 Screening in Submerskultur

Die nach 4.3.2.3 angesetzten Kulturen wurden nach drei- bis fünftägigem Anwachsen mit einer Emulsion aus 20 mg β,β -Carotin und 200 mg Tween 40 in 2 mL reinem Ethanol versetzt und wie oben beschrieben kultiviert. Die Probenahme erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme am 5., 9., 12., 16., 20. und 24. Kulturtag oder am 3., 5., 7., 10., 14. und 18. Kulturtag. Bei den Hefen wurde die β,β -Carotin-Emulsion bereits am ersten Kulturtag zugegeben. Hier wurde fünf Tage lang täglich eine Probe aufgearbeitet. Als Blindversuch wurde nicht beimpftes Standard-Nähr-Medium analog behandelt. Zur Isolierung der Metabolite wurden die Proben jeweils zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min) um Mycel vom Medium zu trennen. Anschließend wurde eine Flüssig/Flüssig Extraktion nach 4.6.1 durchgeführt.

4.4.3 Zellfreies Screening

4.4.3.1 Herstellen einer wässrigen β,β -Carotin-Lösung

10 mg β,β -Carotin und 1 g Tween 40 wurden in Dichlormethan gelöst, das Lösungsmittel weitgehend am Rotationsverdampfer abrotiert (40°C, 800 mbar) und der Rückstand in 70 mL Wasser aufgenommen. Es wurde bei 40°C und 250 mbar weiter eingeeengt bis β,β -Carotin vollständig in Wasser solubilisiert war. Letzte Dichlormethanreste wurden mit Stickstoff abgeblasen und die Lösung mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Alle Schritte wurden unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

4.4.3.2 Umsetzung von β,β -Carotin mit zellfreiem Kulturmedium

Die nach 4.3.2.3 angesetzten Kulturen wurden zunächst zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min), um Mycel vom Kulturmedium zu trennen. Der Überstand wurde abdekantiert und mit 20 mL der β,β -Carotin-Lösung nach 4.4.3.1 versetzt. Nach 14 h Inkubation bei 24 °C und 100 rpm auf dem Schüttler unter Ausschluss von Licht wurde die Lösung mittels Flüssig/Flüssig Extraktion (siehe 4.6.1) aufgearbeitet. Als Blindversuch diente mit β,β -Carotin-Lösung versetztes unbeimpftes Standard-Nähr-Medium sowie vom Mycel befreites Kulturmedium ohne β,β -Carotin-Zusatz.

4.5 Untersuchung des Carotinoid-Abbaus

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.5.1 β,β -Carotin-Abbau in Submerskultur

4.5.1.1 Carotin-Abbau durch *Hypomyces odoratus*

Die Untersuchung des Carotin-Abbaus während der Kultivierung erfolgte mit Carotin-Medium (siehe 4.3.1 Nr.4). Hierzu wurden je 250 mL Medium in einem 500 mL Kulturkolben mit 20 mL der frisch homogenisierten Vorkultur von *Hypomyces odoratus* beimpft. Die Probenahme erfolgte jeweils am 1., 3., 6., 9. und 13. Kulturtag. Das Mycel wurde durch Zentrifugation (3300 g, 5°C, 20 min) vom Medium getrennt und aufgeschlossen (siehe 4.6.2). Die Aufarbeitung des Mediums erfolgte mittels Flüssig/Flüssig Extraktion (siehe 4.6.1).

4.5.1.2 Blindversuche

Als Blindversuch wurde unbeeimpftes Carotin-Medium jeweils am 1., 3., 6., 9. und 13. Kulturtag mittels Flüssig/Flüssig Extraktion (4.6.1) aufgearbeitet.

4.5.1.3 Transformation von β -Ionon durch *Hypomyces odoratus*

Zur Untersuchung der β -Ionon-Transformation wurden je 250 mL Standard-Nähr-Medium in einem 500 mL Kulturkolben mit 20 mL der frisch homogenisierten Kultur von *Hypomyces odoratus* beimpft. Dann wurden jeweils 0,2 mg β -Ionon in 1 mL Ethanol zugegeben. Die Probenahme erfolgte jeweils am 1., 3., 6., 9. und 13. Kulturtag. Für die Aufarbeitung wurde das Medium durch Zentrifugation (3300 g, 5°C, 20 min) vom Mycel befreit, und mittels Flüssig/Flüssig Extraktion aufgearbeitet (siehe 4.6.1).

4.5.2 Umsetzungen von Carotinen mit zellfreien Kulturmedien

Für die Abbauprobungen mit zellfreien Kulturmedien wurden die nach 4.3.2.4 angesetzten Kulturen zunächst zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min), um Mycel vom Kulturmedium zu trennen. Nach dem Abdekantieren wurden je 100 mL des Überstandes für die Umsetzungen verwendet. Die Aufarbeitung der Versuche erfolgte mittels Flüssig/Flüssig Extraktion (siehe 4.6.1). Bei jeder Umsetzung wurde ein Blindversuch mit Standard-Nähr-Medium durchgeführt.

4.5.2.1 β,β -Carotin-Abbau nach Ultrafiltration

Nach Abtrennung des Mycels wurde das zellfreie Medium von *Lepista irina* bzw. *Marasmius scorodoni* bei 3300 g und 8 °C 40 min ultrafiltriert (Centricon Plus-80, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa). Das Retentat wurde dabei im Verhältnis 1:10 aufkonzentriert. Sowohl das mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen rückverdünnte Retentat als auch das Permeat wurden mit β,β -Carotin-Lösung (siehe 4.4.3.1) versetzt und bei 24°C unter Lichtausschluss bei 100 rpm 14 h inkubiert.

4.5.2.2 Kinetik des β,β -Carotin-Abbaus

Jeweils 100 mL Kulturmedium von *Lepista irina* wurden mit β,β -Carotin-Lösung (siehe 4.4.3.1) versetzt und bei 24°C und 100 rpm unter Lichtausschluss geschüttelt. Die Reaktion wurde jeweils nach 30 min, 1, 2, 3 und 6 Stunden durch Zusatz von 0,5 mL 2-Mercaptoethanol gestoppt und die Ansätze wurden aufgearbeitet.

4.5.2.3 Umsetzung von β,ϵ -Carotin

4.5.2.3.1 Isolierung von Carotinen aus Karotten (Britton et al. 1999)

1 kg Karotten wurden grob vorzerkleinert und im Mixer mit einem Gemisch aus Petrolether, Methanol und Ethylacetat (1:1:1) homogenisiert. Das Homogenat wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und der Filtrerrückstand noch mehrmals bis zum deutlichen Verblassen der Farbe extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden am

Rotationsverdampfer bei 40°C und 200 mbar vom Lösungsmittel befreit. Der wässrige Rückstand wurde nach Versetzen mit NaCl vier mal mit je 250 mL Petrolether extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ (5°C, 14 h) wurden die vereinigten Petroletherphasen auf etwa 100 mL eingeeengt. Nach Zugabe von 100 mL methanolischer KOH (10%ig) wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren verseift.

Das Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt, 50 mL Wasser zugegeben und die Wasser/Methanol Phase entfernt. Die organische Phase wurde drei mal mit je 30 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet (5°C, 14 h) und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Reste des Lösungsmittels wurden mit Stickstoff abgeblasen. Der Extrakt wurde 14 h unter Vakuum getrocknet. Alle Arbeitsschritte wurden unter Ausschluss von Licht ausgeführt. Der Extrakt wurde unter Stickstoff bei -70°C gelagert.

4.5.2.3.2 Herstellung einer wässrigen Lösung aus Karottenextrakt

20 mg Karottenextrakt und 220 mg Tween 40 wurden in Dichlormethan gelöst. Nach weitgehender Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand mit 40 mL Wasser aufgenommen. Das Gemisch wurde weiter am Rotationsverdampfer (40°C, 250 mbar) eingeeengt bis das Lösungsmittel entfernt war und der Karottenextrakt vollständig in Wasser solubilisiert war. Nach Entfernen letzter Dichlormethanreste mit Stickstoff wurde mit Wasser auf 50 mL aufgefüllt.

4.5.2.3.3 Umsetzung

100 mL Kulturmedium von *Lepista irina* wurde mit 25 mL der Karottenextrakt-Lösung (siehe 4.5.2.3.2) versetzt und bei 34°C 60 min unter Lichtausschluss auf dem Schüttler bei 100 rpm inkubiert.

4.5.2.4 Mikro-Umsatz mit aufgereinigtem Enzym

70 µg nach 4.4.3.1 emulgiertes β,β-Carotin wurde mit aufgereinigtem Enzym versetzt. Hierzu wurden 2 aktive Fraktionen eines GPC-Laufes verwendet. Die Umsetzung erfolgte bei 34°C, pH 3,5 (GPC-Laufpuffer) 3 h. Die Probe wurde drei mal mit jeweils 1 mL Dichlormethan/Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet (5°C , 14 h) und an der Vigreux-Colonne bei 44°C Badtemperatur unter Normaldruck auf 175 μL aufkonzentriert.

4.6 Produktisolierung

4.6.1 Produktisolierung aus Kulturmedien

Die Extraktion erfolgte drei mal mit je 30 mL eines Gemisches aus Pentan/Dichlormethan (1:1). Aufgrund der Neigung zur Emulsionsbildung wurde das Gemisch in einigen Fällen zur Phasentrennung zentrifugiert (3300 g, 20 min, 5°C). Die vereinigten organischen Phasen wurden zwei mal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet (5°C , über Nacht) und an einer Vigreux-Colonne bei 44°C Badtemperatur und Normaldruck auf 5 mL eingengt. Unmittelbar vor der Extraktion wurde α -Terpineol als innerer Standard zugesetzt. Die Extrakte wurden per GC/FID, GC/MS und HPLC/DAD analysiert.

4.6.2 Produktisolierung aus Pilzmycel

Zur Bestimmung der Metabolite im Pilzmycel wurde das abzentrifugierte (3300 g, 5°C , 20 min) Mycel mit 20 mL 0,9 %iger NaCl -Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert, um Medienreste zu entfernen. Die Waschlösung wurde zusammen mit dem Medium aufgearbeitet (siehe 4.6.1).

Bei Mycelmengen unter 5 g Feuchtmasse erfolgte der Zellaufschluss mit dem Potter. Dazu wurde das Mycel mit 4 mL Methanol und 10 mL Methanol/Wasser (70/30) versetzt und 15 min bei Stufe 6 unter Kühlung im Eisbad aufgeschlossen.

Mycelmengen über 5 g Feuchtmasse wurden mit der Rührwerkskugelmühle zur Nassvermahlung aufgeschlossen. Die Mühle war mit einem doppelwandigen Mahlgefäß ($V=150$ mL) ausgestattet. Es wurde pro Aufschluss eine Feuchtmasse von 5 g bis maximal 15 g eingesetzt. Das Mycel wurde mit 20 mL Methanol und 50 mL Methanol/Wasser (70/30) versetzt und zusammen mit 80 mL Glasperlen (0,5 mm \varnothing , bleifrei, Braun Biotech) in das Mahlgefäß gefüllt. Die Aufschlusszeit betrug 15 min bei -5°C und 3200 Umdrehungen min^{-1} . Die Suspension wurde

anschließend durch Dekantieren von den Glasperlen getrennt. Der Aufschluss wurde per Flüssig/Flüssig Extraktion aufgearbeitet (siehe 4.6.1).

4.7 Chromatographie

4.7.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

4.7.1.1 Carotinoid-Analytik

Pumpe:	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit LG-980-02 (Jasco)
Degasser:	3-Kanal Degasser DG-980-50 (Jasco)
Detektor:	UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor MD 910 (Jasco)
Datenauswertung:	Borwin Chromatographie Software (Version 1.20)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit 20 μL Probenschleife
Säule:	Nucleosil 120-5, RP-18, 250 x 4 mm, 5 μm (Macherey & Nagel)
Flussrate;	1 mL min^{-1}
Fließmittel:	Dichlormethan/Methanol (85:15 v/v) isokratisch

4.7.1.2 Apo-Carotinoid-Analytik

Pumpe:	} siehe 4.7.1.1
Degasser:	
Detektor:	
Datenauswertung:	
Injektionsventil:	
Säule:	
Flussrate:	0,6 mL min^{-1}
Fließmittel:	A: Methanol/Wasser 70:30 (10 mmol Ammoniumacetat-Zusatz) B: Methanol/Dichlormethan 80:20
Gradient:	0 - 15 min linearer Gradient von 100 % A auf 100 % B 15 - 45 min 100 % B

4.7.2 Gaschromatographie (GC)

4.7.2.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

Anwendung:	Aromastoff-Analytik
Gaschromatograph:	Trace GC 2000 (Thermoquest)
Injektor:	Split-Splitless (1:10), 220°C, Splitöffnung nach 1 min
Trennsäule:	DB 5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (J & W)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 250°C
Trärgas:	Wasserstoff, Vordruck 80 kPa
Detektorgase:	Wasserstoff 35 mL min ⁻¹ , Luft 350 mL min ⁻¹
Datenaufnahme:	Integrator CR 5A (Shimadzu)
Temperaturprogramm:	50°C (5 min), mit 4°C pro min auf 250°C (10 min)

4.7.2.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor

Anwendung:	Identifizierung der Aromastoffe
Gaschromatograph:	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor:	Cold on Column (40°C)
Trennsäule:	CP- 5 CB; 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Varian)
Detektor:	Mass Spectrometer 5989 A (Hewlett-Packard)
Trärgas:	Helium Vordruck 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle 250°C, Interface 250°C, Quadrupol Massenfilter 100°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	m/z 33 –300
Datenaufnahme:	MS HP-UX ChemStation, B06.01 Software
Auswertung:	Spektren-Datenbank: Wiley, NBS54K (Nist), LMC
Temperaturprogramm:	50°C (5 min), mit 4°C pro min auf 250°C (10 min)

4.7.3 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

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

4.7.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

4.7.3.1.1 Vorversuche

Säulen:	HiTrap Phenyl FF high sub, HiTrap Phenyl FF low sub, HiTrap Phenyl HP, HiTrap Butyl FF, HiTrap Octyl FF, jeweils 1 mL Volumen (Pharmacia biotech)
Fließmittel A:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat- Puffer, pH 3,5; 1 M Ammoniumsulfat
Fließmittel B:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat- Puffer, pH 3,5
Flussrate:	1 mL min ⁻¹
Elution:	5 min 100 % Fließmittel A, 8 min 100 % Fließmittel B
Fraktionen:	1 mL

4.7.3.1.2 Scale up

Säule:	HIC Phenyl high sub, 20 mL Volumen (Pharmacia biotech)
Fließmittel A:	siehe 4.7.3.1.1
Fließmittel B:	siehe 4.7.3.1.1
Flussrate:	4 mL min ⁻¹
Gradient:	15 min 100 % Fließmittel A, 15 min 100 % Fließmittel B
Fraktionen:	4 mL

4.7.3.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

4.7.3.2.1 Vorversuche

Säulen:	ANX Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, jeweils 1 mL Volumen (Pharmacia biotech), Uno Q1, 1,3 mL Volumen (Bio-Rad)
Puffer A:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 4,5;
Puffer B:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3,5;
Flussrate:	1 mL min ⁻¹
Elution:	7 min 100 % A, 10 min 100 % B
Fraktionen:	1 mL

4.7.3.2.2 Scale up

Säule:	HiPrep 16/10 DEAE FF, 20 mL Volumen (Pharmacia biotech)
Fließmittel A:	siehe 4.7.3.2.1
Fließmittel B:	siehe 4.7.3.2.1
Flussrate:	4 mL min ⁻¹
Elution:	25 min 100 % Fließmittel A, 45 min 100 % Fließmittel B
Fraktionen:	4 mL

4.7.3.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Säule:	Superdex 200 HR 10/30, 24 mL Volumen (Pharmacia biotech)
Elution:	35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3,5; Zusatz von FeCl ₃ , ZnSO ₄ , MnSO ₄ , CuSO ₄ jeweils 0,3 µmol L ⁻¹ ; 60 min
Flussrate:	0,5 mL min ⁻¹
Fraktionen:	1 mL

4.8 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer: Perkin Elmer Lambda 12 mit temperierbarem
Küvettenhalter

Datenaufnahme: UV Win Lab (Version 2.0)

Schichtdicke der Küvette: 1 cm

4.9 Gelelektrophorese

4.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde mit selbstgegossenen Gelen durchgeführt. Es wurde die Methode nach Laemmli (Laemmli 1979) angewendet. Hierbei führt eine Behandlung mit Natriumdodecylsulfat zur Trennung der Proteine vorwiegend nach ihrer Molekulargröße.

Stammlösungen (SL):

Tris-HCl-SL (pH 8,8): 1,5 M Tris mit 0,4 % (m/v) SDS,
mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

Tris-HCl-SL (pH 6,8): 0,5 M Tris mit 0,4 % (m/v) SDS,
mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

SDS-SL: 20 % (m/v) SDS

APS-SL: 40 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$,
jeweils frisch angesetzt

Acrylamid-SL: 30 % (m/v) Acrylamid

BIS-SL: 2 % (m/v) Bisacrylamid

Bromphenolblau-SL: 0,01 % (m/v) Bromphenolblau

Glycerol-SL: 60 % (v/v) Glycerol

Sammelgel: 3,88 mL Acrylamid-SL, 1,8 mL BIS-SL, 6,78 mL Wasser,
10 mL Glycerol-SL, 7,5 mL Tris-HCl-SL pH 6,8, 15 μL TEMED,
45 μL APS-SL

Trenngel: 36,4 mL Acrylamid-SL, 6,9 mL BIS-SL, 13,7 mL Wasser,
22,9 mL Tris-HCL-SL pH 8,8, 45 µL TEMED, 135 µL APS-SL

Die Lösungen wurden vor Zugabe der Katalysatoren im Ultraschallbad entgast. Die Trenngel wurden in eine Gießkassette aus Glasplatten im vorbereiteten Gelhalter gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 45 min wurde das Trenngel zur Nivellierung mit n-Butanol überschichtet, die Lösung für das Sammelgel aufgegeben und der Kamm für die Probenschlitze aufgesetzt. Die Polymerisation erfolgte weitere 45 min (Gelmaße: 160 x 160 x 1,5 mm).

Probenvorbereitung:

Je 50 µL Probe (Proteingehalt 1 mg mL⁻¹) wurden mit 50 µL Auftragspuffer versetzt (8 mL Tris-HCl pH 6,8, 2,5 mL SDS-SL, 1,25 mL Mercaptoethanol, 2,5 mg Bromphenolblau, 4 g Saccharose ad 25 mL) und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Elektrophorese:

Elektrophoresesystem: Protean II xi Cell (Bio Rad)
mit Power Pac 300 Power Supply

Laufpuffer: 15,1 g Tris, 72,1 g Glycin, 5 g SDS
ad 5 L Wasser

Auftragsvolumen: 50 µL, Standards 2,5 µL

Bedingungen: 20 mA, 20 h

Nachbehandlung:

Fixieren: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 1 h

Färben: 0,1 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue G 250,
2 % (m/v) Phosphorsäure, 10 % (m/v)
Ammoniumsulfat, 3 h bei 45 °C

Entfärben: mit bidest. Wasser

Das Gel wurde anschließend in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt.

4.9.2 Isoelektrische Fokussierung

IEF-Gel (Serva):

Maß:	12,5 cm * 12,5 cm * 0,3 mm
Matrix:	Polyacrylamid Gel mit immobilisiertem pH-Gradienten
pH-Bereich:	3 – 10

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden per Ultrafiltration (Ultrafree 4, cut off 10 kDa, Millipore) bei 3300 g mit bidestilliertem Wasser entsalzt und bis zu einem Proteingehalt von etwa 2 mg mL⁻¹ aufkonzentriert. Die Proteinstandards wurden nach Vorschrift in bidest. Wasser gelöst.

Elektrophorese:

Elektrophoresesystem:	Pharmacia LKB Multiphor II Flachgelelektrophoresekammer mit Multi Drive XL Power Supply
Probenauftrag:	mit Lochband in der Gelmitte, identisch auf jeder Gelhälfte
Auftragsvolumen:	Probe: 8 und 15 µL, Standard: 5 µL
Bedingungen:	2000 V, 6 mA, 12 W, 3500 Vh

Nachbehandlung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in der Mitte geteilt. Eine Hälfte wurde mit einer Coomassie-Blau-Färbung behandelt. Mit der anderen Hälfte wurde eine Aktivitäts(ent)färbung durchgeführt. Das Coomassie gefärbte Gel wurde mit Cellophanfolie überspannt, getrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

Aktivitäts(ent)färbung:

Carotin-Gel:	50 mL β,β-Carotin-Lösung gemäß 4.4.3.1 15 mL Pufferlösung (35 mM Citronensäure, 30 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 3,5), 0,7 g Agarose Dicke: etwa 2 mm
--------------	--

Das IEF-Gel wurde mit dem Carotin-Gel bedeckt, beschwert (500 g) und bei 34 °C 1,5 h inkubiert. Es wurde zur Dokumentation eingescannt.

4.10 Proteinanalytik

4.10.1 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung der Extinktionsabnahme einer β,β -Carotin-haltigen Probelösung bei 450 nm. Hierzu wurden 1,5 mL der enzymhaltigen Probelösung und 0,1 mL wässrige β,β -Carotin-Lösung (siehe 4.4.3.1) in einer Küvette (Schichtdicke: 1 cm) gemischt und die Extinktionsabnahme über einen Zeitraum von 10 min bei 34°C spektrophotometrisch bei 450 nm verfolgt.

Die Aktivität A lässt sich berechnen nach:

$$A [U mL^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon}$$

mit

ΔE = Extinktionsabnahme pro Minute

V_g = Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

V_p = Probenvolumen [mL]

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε = molarer Extinktionskoeffizient von β,β -Carotin in Wasser
(experimentell ermittelt: $95000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda = 450 \text{ nm}$)

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Assays wurde enzymhaltige Probelösung in unterschiedlichen Anteilen mit Pufferlösung (66 mM Phosphatpuffer pH 5,5) verdünnt und nach Zugabe der β,β -Carotin-Lösung spektrophotometrisch gemessen.

4.10.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Farbstofflösung durchgeführt. Der Assay beruht auf der Bindung der Proteine an Coomassie Brilliant Blue, wobei in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 595 nm auftritt.

Es wurden 800 μL proteinhaltige Probelösung mit 200 μL Farbstofflösung versetzt, gemischt und nach 10 min Reaktionszeit bei 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde in einem Bereich von 50 bis 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt. (Geradengleichung: $y = 0,0348 x - 0,0017$; $R^2 = 0,9988$)

4.10.3 Enzymcharakterisierung

4.10.3.1 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden je 200 μL der proteinhaltigen Probe mit 1,3 mL Pufferlösung verdünnt und die Aktivität nach 4.10.1 bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Zur Einstellung der jeweiligen pH-Werte wurde eine 0,1 molare Citronensäure-Lösung mit einer 0,2 molaren Na_2HPO_4 -Lösung in verschiedenen Anteilen gemischt.

4.10.3.2 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde enzymhaltige Lösungen vor jeder Messung zunächst im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur vortemperiert. Anschließend wurde die Aktivität im temperierbaren Küvettenhalter gemäß 4.10.1 spektrophotometrisch bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

4.10.3.3 Isoelektrischer Punkt

Für die isoelektrische Fokussierung wurden aufkonzentriertes und durch Ultrafiltration (Ultrafree 4, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa) mit bidest. Wasser entsalztes Medium einer *Lepista irina* Kultur verwendet. Marker (Proteintestmischung

zur pI-Bestimmung pH 3-10, Serva) und Probe wurden doppelt aufgetragen und das Gel nach der Elektrophorese geteilt. Eine Hälfte wurde mit Coomassie Brillant Blue gefärbt, mit der anderen wurde zunächst eine Aktivitäts(ent)färbung durchgeführt (siehe 4.9.2). Nach Markierung der dabei erkennbaren Bande durch Nadeleinstiche auf dem Gel wurde auch mit dieser Gelhälfte eine Coomassie Färbung durchgeführt. Dies erlaubte die eindeutige Zuordnung der Bande. Die Kalibrationskurve wurde durch Auftragen der isoelektrischen Punkte der Standardproteine gegen ihre Retentionsfaktoren R_F durch lineare Regression erhalten.

Markerproteine:

Protein:	Isoelektrischer Punkt (pI):
Cytochrom C	10,65
Ribonuclease A	9,45
Lentil Lectin	7,75 / 8,3
Equine Myoglobin	6,9
Bovine Carbonic Anhydrase	6,0
β -Lactoglobulin	5,15
Soybean Trypsin Inhibitor	4,5
Glucoseoxidase	4,2
Amyloglukosidase	3,5

4.10.3.4 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE

Die aus den Reinigungsschritten hervorgegangenen aktiven Fraktionen wurden bis zu einem Proteingehalt von 1 mg mL^{-1} aufkonzentriert und wie unter 4.9.1 behandelt. Die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine (LMW Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia Biotech) wurden gegen ihre Retentionsfaktoren aufgetragen und durch lineare Regression wurde eine Kalibrationsgerade erstellt.

Markerproteine:

Protein:	Molekulargewicht:
Phosphorylase b	94 kDa
BSA	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carbonsäure Anhydrase	30 kDa
Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
α -Lactalbumin	14,4 kDa

4.10.4 Isolierung und Reinigung des Enzyms

4.10.4.1 Probenvorbereitung

Die Kultivierung erfolgte nach 4.3.2.4. Zur Abtrennung des Mediums von der Biomasse wurden die Kulturen zunächst zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen und mittels Ultrafiltration in Zentrifugeneinsätzen (Centricon Plus-80, Millipore, Ausschlussgrenze 30 kDa) bei 3300 g und 5°C im Verhältnis 1:10 aufkonzentriert. Für die HIC und IEC wurde das gewonnene Konzentrat noch gegen den entsprechenden Startpuffer äquilibriert. Hierzu wurde das Retentat in den Ultrafiltrationseinheiten je drei mal mit dem entsprechenden Volumen Pufferlösung versetzt und bis zum Erreichen des ursprünglichen Volumens weiterzentrifugiert.

4.10.4.2 Reinigungsschritte

Sämtliche Arbeitsschritte wurden in der Kältezelle bei 6°C durchgeführt, um eine thermische Inaktivierung des Enzyms zu minimieren. Fällungen und Transporte der enzymhaltigen Lösungen erfolgten unter Kühlung im Eisbad. Vor jedem chromatographischen Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung zentrifugiert (20.000 g, 5 min), um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Proteingehalt im Eluat wurde durch Absorptionmessungen bei 280 nm in einer Durchflussküvette verfolgt und die Aktivität des Carotin-spaltenden Enzyms mit Hilfe des photometrischen Assays (siehe 4.10.1) untersucht.

4.10.4.3 Ammoniumsulfat-Fällung

15 mL des aufkonzentrierten zellfreien Mediums (siehe 4.10.4.1) wurden unter Kühlung im Eisbad unter Rühren portionsweise mit 1,605 g Ammoniumsulfat versetzt (20%ige Sättigung). Nach 30 min Rühren wurde zentrifugiert (40.000 g, 2°C, 15 min) und das Pellet in 4 mL Phosphatpuffer (60 mM, pH 5,5) gelöst. Der Überstand wurde einer erneuten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen, die Sequenz mit 1,725 g Ammoniumsulfat (45%ige Sättigung), mit 1,365 g Ammoniumsulfat (60%ige Sättigung) und mit 1,965 g Ammoniumsulfat (80%ige Sättigung) wiederholt. Die Aktivität der in Puffer gelösten Pellets wurden mit Hilfe des photometrischen Enzymassays (siehe 4.10.1) bestimmt, der Proteingehaltes mit der Methode nach Bradford (siehe 4.10.2).

4.10.4.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Das aufkonzentrierte und gegen den HIC Startpuffer äquilibrierte zellfreie Medium (siehe 4.10.4) wurde für die Vorversuche in je 1 mL Portionen an den verschiedenen HIC Säulen chromatographiert (siehe 4.7.3.1.1). Für die Proteinreinigung wurden je 5 mL der Probe an einer HIC Phenyl high sub Säule chromatographiert (siehe 4.7.3.1.2). Die aktiven Fraktionen aus fünf Läufen wurden vereint, durch Ultrafiltration (Ultrafree 4, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa,) auf 15 mL aufkonzentriert und durch dreimaliges Nachwaschen des Retentats gegen den IEC Startpuffer äquilibriert.

4.10.4.5 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Für Vorversuche wurde jeweils 1 mL des aufkonzentrierten und durch Ultrafiltration gegen den Startpuffer äquilibrierten Mediums (siehe 4.10.4.1) verwendet.

Zur Proteinreinigung wurden je 5 mL der nach 4.10.4.4 gewonnenen Probe an einer HiPrep DEAE FF Säule (siehe 4.7.3.2.2) chromatographiert. Die aktiven Fraktionen aus drei Läufen wurden vereint und mittels Ultrafiltration (Ultrafree 4, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa) auf 700 µL aufkonzentriert.

4.10.4.6 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Je 200 µL der nach 4.10.4.5 erhaltenen Probelösung wurden zur GPC eingesetzt. Die aktiven Fraktionen aus zwei Läufen wurden auf 300 µL aufkonzentriert und bis zum weiteren Gebrauch bei –70 °C tiefgefroren.

4.10.4.6.1 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GPC

Aufkonzentrierte enzymhaltige Proben (gemäß 4.10.4.1) wurden wie unter 4.7.3.3 an einer Superdex 200 HR Säule chromatographiert. Durch Messung der enzymatischen Aktivität (siehe 4.10.1) in den einzelnen Fraktionen wurde das Elutionsvolumen des Zielproteins ermittelt. Analog wurden Standardproteine (HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit, Pharmacia Biotech) chromatographiert. Die Retentions-Koeffizienten (K_{av}) der Proteine wurden gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte aufgetragen und eine Kalibriergerade durch lineare Regression erstellt.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

mit

V_e = Elutionsvolumen (mL)

V_o = Ausschlussvolumen (mL)

V_t = Gesamtvolumen (mL)

Markerproteine:

Protein:	Molekulargewicht:
Thyroglobulin	669 kDa
Ferritin	440 kDa
Katalase	232 kDa
Aldolase	158 kDa
BSA	67 kDa
Chymotrypsinogen A	25 kDa

Für die Bestimmung des Ausschlussvolumens wurde Blue Dextran 2000 verwendet.

4.11 Entsorgungshinweise

4.11.1 Biologisches Material

Die Kulturen und Kulturreste wurden vor dem Entsorgen 20 min bei 121°C autoklaviert. Medien wurden in den Ausguss gegeben, die autoklavierte Biomasse in den Laborabfall.

4.11.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch an Lösungsmitteln wurde durch weitgehende Wiederverwertung nach destillativer Aufreinigung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwertbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nicht halogenierte, wassermischbare Lösungsmittel
- nicht halogenierte, nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte, wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte, nicht wassermischbare Lösungsmittel.

Diese Lösungsmittel wurden ebenso wie Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der Universität Hannover zugeführt.

5 Literatur

Abraham B.G., Berger R.G.: Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2344-2348 (1994)

Abraham W.R., Hanssen H.P., Urbasch I.: Lepistrone, major volatile metabolites from liquid cultures of *Lepista irina*, *Z. Naturforsch.*, 46 c, 169-171 (1991)

Adato I., Gazit S., Blumenfeld A.: Relationship between changes in abscisic acid and ethylene production during ripening of avocado fruits, *J. Plant Physiol.*, 3, 555-558, (1976)

Almosnino A.M., Bensoussan M., Belin J.M.: Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomade system. Factors influencing the production of aroma compounds, *Food Chem.*, 55, 327-332 (1996)

Aromenverordnung vom 22. Dezember 1981 (BGBl I S. 1625,1676), zuletzt geändert durch Art. 19 zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 29.1.1998 (BGBl. I S. 230, 298)

Ayer W.A., Yoshida T., van Schie D.M.J.: Metabolites of bird's nest fungi. Part 9. Diterpenoid metabolites of *Cyathus africanus* Brodie, *Can. J. Chem.*, 56, 2113-2120 (1978)

Aziz S., Wu Z., Robinson D.S.: Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β -carotene, *Food Chem.*, 64, 227-230 (1999)

Bao W., Fukushima Y., Jensen K.A., Moen M.A., Hammel K.E.: Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase, *FEBS Lett.*, 354, 297-300 (1994)

Barua A.B., Olson J.A.: β -Carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo, *J. Nutr.*, 130, 1996-2001 (2000)

Beatriz M., Gloria A.: Effect of type of oxidation on β -carotene loss and volatile products formation in model systems, *Food Chem.*, 46, 401-406 (1993)

Belin J.M., Dumont B., Robert F.: Method for enzymatic preparation of aromas, particularly ionones and C₆ to C₁₀ aldehydes, WO 94/08028 (1994)

Belitz H.D., Grosch W.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin (1992)

v.D. Berg H., Faulks R., Granado H.F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S., Stahl W.: The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects, *J. Sci. Food Agr.*, 80, 880-912 (2000)

Berger R.G.: *Aroma Biotechnology*, Springer Verlag, Berlin (1995)

Berger R.G. Neuhäuser K. Drawert F.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 6. Odorous constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes), *Z. Naturforsch.*, 41c, 963-970 (1986)

Berger R.G., Neuhäuser K., Drawert F.: Biotechnological production of flavor compounds: 3. High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma benzoinum*, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 987-990 (1987)

Birkinshaw J.H., Bracken A., Findlay W.P.K.: Biochemistry of the wood-rotting fungi 4. Metabolic products of *Trametes suaveolens*, *Biochem. J.*, 38, 131-132 (1944)

Bosser A., Belin J.M.: Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthinoxidase/ β -carotene system involving free radical formation, *Biotechnol. Progr.*, 10, 129-133 (1994)

Bosser A., Paplorey E., Belin J.M.: A simple way to dihydroactinidiolide from β -ionone related to the enzymatic co-oxidation of β -carotene in aqueous solutions, *Biotechnol. Progr.*, 11, 689-692 (1995)

Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)

Breheret S., Talou T., Rapior S., Bressiere J.M.: Monoterpenes in the aromas of fresh white mushrooms, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 831-836 (1997)

Breithaupt D.E., Wirt U., Bamedi A.: Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 66-70, (2002)

Bricout J., Viani R., Müggler-Chevan R., Marion J.P., Raymond D., Egli R.H.: Sur la composition de l'arome de the noir II, *Helv. Chim. Acta*, 50, 1517-1522 (1967)

Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Volume 1 A, Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel (1999)

Britton G. Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Volume 3, Biosynthesis and Metabolism*, Birkenhäuser Verlag, Basel (1998)

Burbidge A., Grieve T.M., Jackson A., Thompson A., McCarty D.R., Taylor I.B.: Characterisation of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize VP14, *Plant J.*, 17, 4, 427-431 (1999)

Burton G.W.: Antioxidant action of carotenoids, *Symposium: Biological actions of carotenoids*, 109-111 (1989)

Burton G.W., Ingold K.U.: β -Carotene; an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, 224, 569-573 (1984)

Busmann D., Berger R.G.: Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes *J. Biotechnol.*, 37, 39-43 (1994)

Buttery R.G., Seifert R.M., Guadagni D.G., Ling L.C.: Characterisation of additional volatile components of tomato, *J. Agric. Food Chem.*, 19, 524-529 (1971)

Camarera S., Böckle B., Martinez M.J., Martinez A.T.: Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 1070-1072 (1996)

Chernys J.T., Zeevaart J.A.D.: Characterisation of the 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado, *Plant Physiol.*, 124, 343-353 (2000)

Collins R.P., Halim A.F.: An analysis of the odorous constituents produced by various species of *Phellinus*, *Can. J. Microbiol.*, 18, 65-66 (1972)

De Jong E., De Vries F.P., Field J.A., Van der Zwan R.P. De Bont J.A.: Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity, *Mycol. Res.*, 96, 1098-1104 (1992)

Demole E., Enggist P., Säuberli U., Stoll M., sz. Kovatz E.: Structure et synthèse de la damascenone (trimethyl-2,2,6-trans-crotonyl-1-cyclohexadiene-1,3) constituant odorant de l'essence de Rose Bulgare, *Helv. Chim. Acta*, 53, 541-543 (1970)

Deutscher M.P.: Guide to protein purification, *Methods Enzymol.* 182, Academic Press, London (1990)

Drawert F., Barton H.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*, *J. Agric. Food. Chem.*, 20, 765-766 (1978)

Drawert F., Berger R.G., Neuhäuser K.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 4. Characterisation of the major volatile principles of the odor of *Pleurotus euosmus*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 124-127 (1983)

During A., Nagao A., Hoshino C., Terao J.: Assay of β -carotene-15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high pressure liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 241, 199-205 (1996)

Duszka C., Grolier P., Azim E.M., Alexandre-Gouabau M.C., Borel P., Azais-Braesco V.: Rat intestinal β -carotene-dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes, *J. Nutr.*, 126, 2550-2556 (1996)

Ekstrand B., Björck L.: Oxidation of β -carotene by bovine milk lactoperoxidase-halide-hydrogen peroxide systems, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 412-415 (1986)

Enzell C.R., Wahlberg I., Aasen A.J.: Isoprenoids and alkaloids of tobacco, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 34, 1-79 (1977)

Falbe J., Regitz M.: *CD Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)

Feofilova E.P.: Fungal Carotenoids, *Appl. Biochem. Micro.*, Vol. 30, No. 2, 143-154 (1994)

Fidge N.H., Smith F.R., Goodman D.S.: Vitamin A and carotenoids, *Biochem. J.*, 114, 689-694 (1969)

Gatfield I.L., Sommer H.: *Recent developments in flavour and fragrance chemistry*, VCH, Weinheim (1993)

Gelinas P., Poitras E., McKinnon M., Morin A.: Oxido-Reductases and lipases as dough-bleaching agents, *Cereal Chem.*, 75, 6, 810-814 (1998)

Gerhardt E.: *Der große BLV Pilzfürher für unterwegs*, 1 Auflage, BLV Verlag, München (1997)

Gold M.H., Alic M.: Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiol. Rev.*, 57, 605-622 (1993)

Goodman D.S., Huang H.S., Kanai M., Shiratori T.: The enzymatic conversion of all-trans β -carotene into retinal, *J. Biol. Chem.*, 242, 3543-3554 (1967)

Grosch W.: Reaktionen in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, die durch das Enzym Lipoxygenase (EC 1.13.11.12) beschleunigt werden, *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.*, 30, 1, 1-20 (1976)

Gross B., Gallois A., Spinnler H.E., Langlois D.: Volatile compounds produced by the lignolytic fungus *Phlebia radiata* Fr. (Basidiomycetes) and influence of the strain specificity on the odorous profile, *J. Biotechnol.*, 10, 303-308 (1989)

Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J.: Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.*, 209, 603-611 (1992)

Hamel C.P., Tsilou E., Pfeffer B.A., Hooks J.J., Detrick B., Redmond T.M.: Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro, *J. Biol. Chem.*, 268, 21, 15751-15757 (1993)

Handelman G.J., van Kuijk F.J.G.M., Chatterjee A., Krinsky N.I.: Characterisation of products formed during the autoxidation of β -carotene, *Free Radical Bio. Med.*, 10, 427-437 (1991)

Hanssen H.P.: Sesquiterpene alcohols from *Lentinus lepideus*, *Phytochemistry*, 24, 6, 1293-1294 (1985)

Hanssen H.P., Abraham W.R.: Odiferous compounds from liquid cultures of *Gloeophyllum odoratum* and *Lentinellus cochleatus* (Basidiomycotina), *Flav. Frag. J.*, 2, 171-174 (1987)

Heinfling A., Ruiz-Duenas J., Martinez M.J., Bergbauer M., Szewzyk U., Martinez A.T.: A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*, *FEBS Lett.*, 428, 141-146 (1998)

Hock R., Benda I., Schreier P.: Formation of terpenes by yeast during alcoholic fermentation, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 179, 450-452 (1984)

Hoffman W.: Jonone und Damascone, *Seifen, Öle, Fette, Wachse*, 104, 5, 127-131 (1978)

Hohler A.: *Untersuchung der Bildung und Eigenschaften von flüchtigen Nor-Carotinoiden*, Dissertation Universität München (1986)

Ikediyobi C.O., Snyder H.E.: Co-oxidation of β -carotene by an isoenzyme of soybean lipoxygenase, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 124-127 (1977)

Isoe S., Hyeon S.B., Ichikawa H., Katsumura S., Sakan T.: The synthesis of actinidiolide, dihydroactinidiolide and actinidiol, *Tetrahedron Lett.*, 53, 5561-5564 (1968)

Janssens L., De Pooter H.L., Schamp N.M., Vandamme E.J.: Production of flavours by microorganisms, *Process Biochem.*, 27, 195-215 (1995)

Jensen K.A., Bao W., Kawai S., Srebotnik E., Hammel K.E.: Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 3679-3686 (1996)

Jönsson L., Becker H.G., Nyman P.O.: A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *BBA-Protein Struct. Mol. Enzym*, 1207, 255-259 (1994)

Jüttner F., Höflacher B.: Evidence of β -carotene 7,8 (7',8') oxygenase (β -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*, *Arch. Microbiol.*, 141, 337-343 (1985)

Kamoda S., Saburi Y.: Cloning, expression and sequence analysis of a lignostilben- α,β -dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009, *Biosci. Biotech. Bioch.*, 57, 6, 926-930 (1993)

Kanasawud P., Crouzet J.C.: Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 237-243 (1990)

Kanner J., Mendel H.: Carotene oxidizing factors in red pepper fruits: peroxidase activity, *J. Food Sci.*, 42, 6, 1549-1551 (1977)

Keith E.S., Powers J.J.: Determination of flavor threshold levels and sub-threshold, additive and concentrations effects, *J. Food Sci.*, 33, 213-218 (1968)

Kiefer C., Hessel S., Lampert J., Vogt K., Lederer M.O., Breithaupt D.E., von Lintig J.: Identification and characterisation of a mammalian enzyme catalysing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A, *J. Biol. Chem.*, 276, 17, 14110-14114 (2001)

Koorneef M., Leon-Kloosterziel K.M., Schwartz S.H., Zeevaart J.A.D.: The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*, *Plant Physiol. Bioch.*, 36, 83-89 (1998)

Kühne B., Sprecher E.: Enhancement of the production of fungal volatiles employing different adsorbents, *Flav. Frag. J.*, 4, 77-79 (1989)

Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 (1979)

Lakshmanan M.R., Chansang H., Olson J.A.: Purification and properties of carotene-15,15'-dioxygenase of rabbit intestine, *J. Lipid Res.*, 13, 477-482 (1972)

Leuenberger M.G., Engloch-Jarret C., Woggon W.D.: The reaction mechanism of the enzyme-catalysed central cleavage of β -carotene to retinal, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 40, 14, 2614-2617 (2001)

Linko R.R., Kallilo H., Pygsalo T., Rainio K.: Volatile monocarbonyl compounds of carrot roots at various stages of maturity, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 166, 208-211 (1978)

LIST OF CULTURES, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, Niederlande, 33rd Edition (1994)

Lobos S., Larronda L., Salas L., Karahanian E.: Cloning and molecular analysis of a cDNA of the Cs-mnp 1 gene encoding a manganese-peroxidase enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Poriopsis subvermispora*, *Gene*, 206, 185-193 (1998)

Lutz A., Winterhalter P.: Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga*, Mill.), *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1116-1120 (1992)

Lutz A., Winterhalter P., Schreier P.: Isolation of a glucosidic precursor of isomeric marmelo oxides from quince fruit, *Tetrahedron Lett.*, 32, 5943-5944 (1991)

Mangles A.R.: Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data, *JADA* 93, 284-296 (1993)

Märki-Fischer E., Eugster C.H.: Rosafluin, ein neues Diapocarotindiol aus Rosenblüten, *Helv. Chim. Acta*, 71 1491-1497 (1988)

Martinez M.J., Ruiz-Duenas F.J., Guillen F., Martinez A.T.: Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *Eur. J. Biochem.*, 237, 424-432 (1996)

Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A., Waldmann D., Schreier P.: 5,6-epoxidation of all-trans-retinoic acid with soybean lipoxygenase-2 and -3, *Biosci. Biotech. Bioch.*, 58, 140-145 (1994)

Mester T., Field J.A.: Characterisation of a novel manganese peroxidase – lignin peroxidase hybrid isoenzyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS 55 in the absence of manganese, *J. Biol. Chem.*, 273, 15412-15417 (1998)

Mimoun R.: Catalytic opportunities in the flavor and fragrance industry, *Chimia*, 50, 620-625 (1996)

Mordi R.C., Walton J.C., Burton G.W., Hughes L., Ingold K.U., Lindsay D.A., Moffatt D.J.: Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal, *Tetrahedron*, 49, 911-928 (1993)

Mügglér-Chevan R, Viani R., Bricout J., Marion J.P., Mechtler H., Raymond D., Egli R.H. : Sur la composition de l'arome de the noir III, *Helv. Chim. Acta*, 52, 549 (1969)

Nair M.S.R., Takeshita M., McMorris T.C., Anchel M.: Metabolic products of *Clitocybe illudens*, *Lloydia*, 36, 106 (1973)

Neill S.J., Burnett E.C., Desikan R., Hancock J.T.: Cloning of a wilt-responsive cDNA from *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase, *J. Exp. Bot.*, 49, 328, 1893-1894 (1998)

Ohloff G.: Importance of minor compounds in flavors and fragrances, *Perfum. Flavor.*, 3, 11-15 (1978)

Ohloff G.: *Scent and fragrances*, Springer Verlag, Berlin (1994)

Ohloff G., Demole E.: Importance of the odoriferous principle of Bulgarian rose oil in flavor and fragrance chemistry, *J. Chromatogr.*, 406, 181-185 (1987)

Opdyke, D.L.J.: Monographs on fragrance raw materials. Ionone, *Food Cosmet. Toxicol.*, 13, 5, 549-50 (1975)

Parry A.D., Babiano M.J., Horgan R.: The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis, *Planta*, 182, 118-128 (1990)

Porter J.W., Spurgeon S.L.: *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, Wiley, New York (1983)

Prasad M.M., Singh H.N.P.: Biodegradation of chemical constituents in silk cocoons by some storage fungi, *Science Lett.*, 18, 9 & 10, 163-164 (1995)

Qin X., Zeevaart J.A.D.: The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in waterstressed bean, *Plant biology*, 96, 26, 15354-15361 (1999)

Rando R.R.: Polyens and vision, *Chem. Biol.*, 3, 255-262 (1996)

Rau W.: *Plant Pigment*, Academic Press, London (1988)

Razungles A., Bayonove C.L., Cordonnier R.E., Sapis J.C.: Grape carotenoids: changes during the maturation period and localisation in mature berries, *Am. J. Enol. Viticult.*, 39, 44-48 (1988)

Redmond T.M., Gentelman S., Duncan T., Yu S., Wiggert B., Gantt E., Cunningham F.X.: Identification, expression and substrate specificity of a mammalian β -carotene-15,15'-dioxygenase, *J. Biol. Chem.*, 9, 6560-6565 (2001)

Rehbock B., *Bildung bioaktiver Alkenale und Oxylipide durch eine immobilisierte Hydroperoxid-Lyase sowie Enzyme des Lipoxygenase-Weges aus Mungobohnen*, Dissertation Universität Hannover (1998)

Ruiz-Duenas F.J., Martinez M.J., Martinez A.T.: Molecular characterisation of a novel peroxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*, *Mol. Microbiol.*, 31, 1, 223-235 (1999)

Sakan T., Isoe S., Hyeon S.B.: The structure of actinidiolide, dihydroactinidiolide and actinidiol, *Tetrahedron Lett.*, 1623 (1967)

Samokyszyn V.M., Marnett L.J.: Hydroperoxide-dependent co-oxidation of 13-cis retinoic acid by prostaglandin H synthase, *J. Biol. Chem.*, 262, 14119-14133 (1987)

Sanchez-Contreras A., Jimenez M., Sanchez S.: Bioconversion of lutein to products with aroma, *Appl. Microbiol. Biot.*, 54, 528-534 (2000)

Sanderson G.W., Co H., Gonzales J.G.: Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenes in black tea aroma formation, *J. Food Sci.*, 36, 231-236 (1971)

Sanz C., Perez A.G., Olias J.M.: Pigment cooxidation activity by chickpea lipoxygenase, *Food Chem.*, 50, 231-235 (1994)

Sarkar S., Martinez A.T., Martinez M.J.: Biochemical and molecular characterisation of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1339, 23-30 (1997)

Schindler J., Schmid R.D.: Fragrance or aroma chemicals - microbial synthesis and enzymatic transformation - a review, *Process Biochem.*, 17, 5 (1982)

Schlegel H.G.: *Allgemeine Mikrobiologie*, 6. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart (1985)

Schreier P.: Aromaforschung aktuell, *Naturwissenschaften*, 82, 21-27 (1995)

Schwartz S.H., Qin X., Zeevaart J.A.D.: Characterisation of a novel carotenoid dioxygenase from plants, *J. Biol. Chem.*, 276, 27, 25208-25211 (2001)

Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A.D., McCarty D.R.: Specific cleavage of carotenoids by VP14 of maize, *Science*, 276, 1872-1874 (1997)

Shaw G.: *Sporopollenin*, Brooks J., Muir H., Shaw G. (eds.) Academic Press London (1970)

Snowdon A.L.: *A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*, 1st vol., Wolfe Scientific, London (1990)

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H.: *Lebensmittel Tabellen für die Praxis*, Wissenschaftliche 2. Auflage, Verlagsgesellschaft Stuttgart (1991)

Suelter C.H.: *Experimentelle Enzymologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1990)

Tan B.C., Schwartz S.H., Zeevaart J.A.D., McCarty D.R.: Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 12235-12240 (1997)

Thompson A.J., Jackson A.C., Parker R.A., Morpeth D.R., Burbidge A., Taylor I.B.: Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid, *Plant Mol. Biol.*, 42, 833-845 (2000)

Tiemann F., Krüger P.: Über Veilchenaroma, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 26, 2675-2708 (1893)

Tsuneya T., Ishihara M., Shiota H., Shiga M.: Isolation and identification of novel terpene lactones from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill., Marmelo), *Agric. Biol. Chem.*, 44, 957-958 (1980)

Tsuneya T., Ishihara M., Shiota H., Shiga M.: Volatile components of quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.), *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2495-2502 (1983)

Tuynman A., Spelberg J.L., Kooter I.M., Schoemaker H.E., Wever R.: Enantioselective epoxidation and carbon-carbon bond cleavage catalysed by *Coprinus cinereus* peroxidase and myeloperoxidase, *J. Biol. Chem.*, 275, 4, 3025-3030 (2000)

Uhde G., Ohloff G.: Parmon, eine Phantomverbindung im Veilchenblütenöl, *Helv. Chim. Acta*, 55, 2621-2625 (1972)

Veddeler B.: Dissertation Universität Hannover in Vorbereitung (2002)

Voishvillo N.E., Akhrem A.A., Titov Y.A.: Transformation of terpenes by microorganisms, *Appl. Biochem. Micro.*, 6, 409-418 (1970)

von Lintig J., Vogt K.: Filling the gap in vitamin A research, *J. Biol. Chem.*, 275, 16, 11915-11920 (2000)

von Lintig J., Wyss A.: Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterisation of β -carotene 15,15'-dioxygenases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 385, 47-52 (2001)

Waldmann D., Schreier P.: Stereochemical studies of epoxides formed by lipoxygenase catalysed co-oxidation of retinol, β -ionone and 4-hydroxy- β -ionone, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 626-630 (1995)

Wang X.D., Russell R.M., Liu C., Stickel F., Smith D.E., Krinsky N.I.: β -Oxidation in rabbit liver contributes to retinoic acid biosynthesis from β -apocarotenoic acids, *J. Biol. Chem.*, 271, 26490-26498 (1996)

Whitaker J.R.: *Principles of enzymology for the food science*, Dekker, New York (1972)

Williams P.J., Sefton M.A., Francis I.L.: Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor, *Flavor precursors, thermal and enzymatic conversions*, ACS Symp. Ser. 490 American Chemical Society: Washington DC, 74-85 (1992)

Winterhalter P.: Carotenoid-Derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects, ACS Symp. Ser. American Chemical Society: Washington DC, 295-308 (1996)

Winterhalter P.: Oxygenated C₁₃-Norisoprenoids, *Flavor precursors, thermal and enzymatic conversions*, ACS Symp. Ser. 490, American Chemical Society: Washington DC, 74-86 (1992)

Winterhalter P., Lutz A., Schreier P.: Isolation of a glucosidic precursor of isomeric marmelo lactones from quince fruit, *Tetrahedron Lett.*, 32, 3669-3670 (1991)

Winterhalter P., Schreier P.: The generation of norisoprenoid volatiles in starfruit (*Averrhoa carambola* L.) *Food Rev. Int.*, 11, 2, 237-254 (1995)

Winterhalter P., Straubinger M.: Saffron – renewed interest in an ancient spice, *Food. Rev. Int.*, 16, 1, 39-59 (2000)

Wu Z., Robinson D.S.: Co-oxidation of β -carotene by soybean and recombinant pea lipoxygenase, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4899-4906 (1999)

Wyss A., Wirtz G., Woggon W., Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Bachmann H., Hunziker W.: Cloning and expression of β,β -carotene-15,15'-dioxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 271, 334-336 (2000)

Yamamoto H., Oritani T.: Two independent biosynthesis of abscisic acid from perspectives of organic chemistry, *Curr. Top. Phytochem.*, 1, 99-113 (1997)

Yamauchi, R., Miyake N., Inoue H., Kato K.: Products formed by peroxy radical oxidation of β -carotene, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 708-713 (1993)

Yan W., Jang G.F., Haeseleer F., Esumi N., Chang J., Kerrigan M., Campochiaro P., Palczewski K., Zack D.J.: Cloning and characterisation of a human β,β -carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium, *Genomics*, 72, 193-202 (2001)

Yao S., Johannsen M., Hazell R.G., Jorgensen K.A.: Total synthesis of (R)-dihydroactinidiolide and (R)-actinidiolide using asymmetric catalytic Hetero-Diels-Alder methodology, *Org. Chem.*, 63, 1, 118-121 (1998)

Zeevaart J.A.D. Creelman R.A.: Metabolism and physiology of abscisic acid, *Plant Mol. Biol.*, 39, 439-473 (1988)