

Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Birgit Veddeler

geboren am 16.03.1973 in Nordhorn

März 2004

Referent:	Prof. Dr. R.G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. T. Scheper
Tag der Promotion:	01.12.04
Datum der Veröffentlichung:	März 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Oktober 2003 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 Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die stetige Gesprächsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem *Herrn Dr. Holger Zorn* für viele gute Tips und die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ferner

allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen dieses Institutes, vor allem meinen Laborkolleg(inn)en *Frau Manuela Scheiber*, *Frau Dr. Sabine Langhoff*, *Frau Diana Linke* und *Herrn Dr. Daniel Neddermann* für die fröhliche Zusammenarbeit sowie die moralische Unterstützung in „Krisenzeiten“.

Frau Meike Takenberg für die praktische Unterstützung bei der Proteinaufreinigung.

der *Procter & Gamble AG* für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, die vieles erleichtert und manches erst ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich *Mario*, für Geduld, Verständnis und dafür, dass er mich immer zum Lachen gebracht hat.

Zusammenfassung

Möglichkeiten der biotechnologischen Produktion von natürlichen Aromastoffen wurden, ausgehend von pflanzlichen Sekundärmetaboliten als Substraten, in drei verschiedenen Ansätzen untersucht.

56 Mikroorganismen wurden auf ihr Potential zur Transformation von Sclareol, einem bicyclischen Diterpen, gescreent. Sclareol ist als Precursor des begehrten Riechstoffes Ambrox und verwandter Verbindungen bekannt. Dreizehn Stämme, darunter Bakterien, Basidiomyceten, Zygomyceten und Ascomyceten waren zur Biotransformation von Sclareol befähigt. *Cunninghamella echinulata* und *Trametes versicolor* erwiesen sich als am effektivsten. Jeweils 8 verschiedene Sclareol-Transformationsprodukte wurden gebildet. Das Substrat wurde innerhalb von zwei Tagen vollständig abgebaut. Die Transformationsprodukte wurden als monohydroxylierte Sclareolderivate identifiziert. Ein Abbau der Seitenkette, der zu möglichen Intermediaten von Ambrox führt, wurde mit diesen aus Kultursammlungen bezogenen Stämmen nicht beobachtet. Aus einer Bodenprobe wurde mittels Anreicherungskultur ein Mikroorganismus isoliert, der Sclareol zu Sclareoxid, einem Intermediat in der Synthese von Ambrox, abbaute.

Eine Peroxidase von *Lepista irina* ist bekannt für die Spaltung von β -Carotin unter Bildung von β -Ionon, einem potenten natürlichen Aromastoff. Zur Untersuchung der Substratspezifität dieses Enzyms und der Möglichkeit des Zugangs zu anderen Norisoprenoiden mit interessanten Aromaeigenschaften wurden weitere Carotinoide mit dem Enzym umgesetzt. Die Carotinoide wurden mittels semipräparativer HPLC aus pflanzlichen Materialien isoliert. Alle eingesetzten Carotinoide (Lycopin, Cryptoxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Capsanthin, Violaxanthin und Neoxanthin) mit ihren unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften wurden effektiv abgebaut. β -Ionon, 3-Hydroxy- β -ionon, 3-Hydroxy- α -ionon, und 3-Hydroxy- β -ionon-epoxid wurden als Spaltprodukte der jeweiligen Carotinoide identifiziert. Die letzteren drei C_{13} -Ketone sind als Aromastoff-Precursoren in verschiedenen pflanzlichen Materialien bekannt. Ihre Bildung durch die Spaltung von Carotinoiden mit einem isolierten mikrobiellen Enzym wird hier erstmalig beschrieben.

Neun Pilzstämme wurden auf die Produktion von extrazellulären Oxidoreduktasen getestet, die in der biotechnologischen Herstellung von Aromastoffen Anwendung finden können. Das verwendete Testsystem bestand aus den zellfreien Kulturüberständen der entsprechenden Pilzstämme und den drei Modellsubstraten Limonen (monocyclisches Terpen), Thymol (Aromat) und 3-Methyl-2-buten-1-ol (allylischer Alkohol), welche typische strukturelle Merkmale von Aromastoffen aufweisen. Eine Aktivität von extrazellulären Oxidoreduktasen wurde bei *Trametes versicolor*, *Cyathus striatus* und *Marasmius scorodonius* nachgewiesen. (*E*)-Carveol, (*Z*)-Carveol und 4-Terpineol wurden als oxidierte Transformationsprodukte des Limonens identifiziert.

Schlagworte: Terpene, Aromastoffe, Biotransformation, Mikroorganismen

Summary

The biotechnological production of natural flavour compounds starting from plant secondary metabolites as substrates was investigated in three different approaches.

56 microorganisms were screened for their capability to transform the natural diterpene sclareol, a known precursor of the highly valued fragrance material ambrox and related compounds. Thirteen strains, comprising bacteria, basidiomycetes, zygomycetes and ascomycetes transformed sclareol. *Cunninghamella echinulata* and *Trametes versicolor* turned out to be the most efficient sclareol transformers, each yielding eight different sclareol transformation products. Sclareol was degraded completely within two days. The transformation products were identified as monohydroxylated sclareol derivatives. Side chain degradation, leading to possible intermediates of ambrox, was not observed with these strains obtained from commercial culture collections. By means of enrichment culture techniques, a microorganism was isolated from a soil sample that degraded sclareol to sclareol oxide, an intermediate in the synthesis of ambrox.

A peroxidase of *Lepista irina* is known to cleave β -carotene to β -ionone, a potent natural flavor compound. To investigate the substrate specificity of this enzyme and the possibility of getting access to other norisoprenoids with interesting flavour properties, further carotenoids were incubated with the enzyme. The carotenoids were isolated from suitable plant materials by semi-preparative HPLC. All carotenoids (lycopene, cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, capsanthin, violaxanthin and neoxanthin), each of them showing different structural features, were effectively degraded. β -Ionone, 3-hydroxy- β -ionone, 3-hydroxy- α -ionone and 3-hydroxy- β -ionone-5,6-epoxide were identified as cleavage products of the respective carotenoids. The latter three C₁₃-ketones are known as flavour precursors occurring in different plant materials. Their formation by the cleavage of carotenoids with an isolated microbial enzyme is described here for the first time.

A set of nine fungal strains was tested for the production of extracellular oxidoreductases that might be applicable in biotechnological flavour generation. The test system applied consisted of cell-free culture-media of the respective strains and

the three model substrates limonene (monocyclic terpene), thymol (aromatic hydrocarbon) and 3-methyl-2-butene-1-ol (allylic alcohol) each representing a typical chemical class of flavour compounds. Extracellular oxidoreductase activities were detected in *Trametes versicolor*, *Cyathus striatus* and *Marasmius scorodoni*. (*E*)-Carveol, (*Z*)-carveol and 4-terpineol were identified as oxidated biotransformation products of limonene.

Key words: terpenes, flavours, biotransformation, microorganisms

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bisherige Kenntnisse	2
1.1.1 Ambra-Riechstoffe	2
1.1.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Ambra-Riechstoffen	2
1.1.1.2 Chemische Verfahren zur Herstellung von Ambrox	4
1.1.1.3 Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Ambrox	6
1.1.2 Norisoprenoide Aromastoffe	7
1.1.2.1 Natürliches Vorkommen von Norisoprenoiden	7
1.1.2.2 Bedeutung und chemische Synthese von Norisoprenoiden	10
1.1.2.3 Biotechnologische Verfahren	11
1.1.3 Oxidoreduktasen in der Aromastoffbiotechnologie	12
1.2 Problemstellung	13
2 Ergebnisse	14
2.1 Screening auf Sclareoltransformation	14
2.1.1 Screening von definierten Mikroorganismen	14
2.1.1.1 Auswahl der Mikroorganismen	14
2.1.1.2 Überprüfung der Screeningmethode mit <i>Hyphozyma roseoniger</i>	18
2.1.1.3 Substrattoxizität	19
2.1.1.4 Sclareoltransformation	22
2.1.1.5 Identifizierung der Transformationsprodukte	23
2.1.2 Screening von Naturisolaten	25
2.1.2.1 Isolierung Sclareol-abbauender Mikroorganismen	25
2.1.2.2 Transformationsprodukte	26
2.1.3 Zusammenfassung	28
2.2 Umsetzung von Carotinoiden mit der polyvalenten Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	29
2.2.1 Isolierung der Carotinoide	29
2.2.1.1 Eingesetzte Carotinoide	29
2.2.1.2 Herstellung der Extrakte	30
2.2.1.3 Isolierung der Carotinoide mittels semipräparativer HPLC	32

2.2.1.4	Identifizierung der isolierten Carotinoide	35
2.2.1.5	Quantifizierung der isolierten Carotinoide	37
2.2.2	Optimierung der Umsetzungen	38
2.2.2.1	Vergleich der Umsetzungen bei Emulgierung mit Tween 40 und Triton X 100	38
2.2.2.2	Umsetzungen mit aufgereinigter polyvalenter Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	39
2.2.2.2.1	Umsetzung mit (teil-)aufgereinigter polyvalenter Peroxidase	39
2.2.2.2.2	Umsetzungen mit vollständig aufgereinigter polyvalenter Peroxidase	41
2.2.3	Umsetzungen der Carotinoide	42
2.2.3.1	Abbau der Carotinoide	42
2.2.3.2	Identifizierung der flüchtigen Carotinoid-Spaltprodukte	43
2.2.3.3	Quantifizierung der flüchtigen Carotinoid-Spaltprodukte	48
2.2.4	Zusammenfassung	48
2.3	Oxidasescreening	49
2.3.1	Konzeption der Screeningmethode	49
2.3.2	Oxidaseaktivitäten	50
2.3.3	Zusammenfassung	52
3	Diskussion	53
3.1	Screening auf Sclareoltransformation	53
3.1.1	Auswahl der Mikroorganismen	53
3.1.1.1	Stämme der Gattungen <i>Hyphozyma</i> und <i>Cryptococcus</i> sowie verwandte Stämme	53
3.1.1.2	Labdanseitenketten – abbauender Stamm	54
3.1.1.3	Steroidseitenketten-abbauende Stämme	55
3.1.1.4	Stämme, welche verzweigte Alkane abbauen	55
3.1.1.5	Terpen-transformierende Stämme	56
3.1.1.6	Terpen-synthetisierende Stämme	57
3.1.1.7	Von terpenhaltigen Substraten isolierte Stämme	57
3.1.2	Toxische Wirkung des Sclareols auf Mikroorganismen	58
3.1.3	Transformationsprodukte des Sclareols	59
3.1.3.1	Selektiver Seitenkettenabbau	59

3.1.3.2 Hydroxylierung	64
3.1.4 Naturisolate	67
3.1.4.1 Auswahl der Proben zur Isolierung Sclareol- abbauender Mikroorganismen	67
3.1.4.2 Transformationsprodukte isolierter Mikroorganismen	68
3.2 Spaltung von Carotinoiden durch die polyvalente Peroxidase aus Lepista irina	71
3.2.1 Carotinoide	71
3.2.1.1 Auswahl der Carotinoide	71
3.2.1.2 Isolierung der Carotinoide	72
3.2.2 Optimierung der Umsetzungen	73
3.2.3 Substratspezifität Carotinoid-spaltender Enzyme	75
3.2.3.1 Substratspezifität von Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen	75
3.2.3.2 Substratspezifität der polyvalenten Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	79
3.2.4 Aromaeigenschaften der gebildeten C ₁₃ -Norisoprenoide	82
3.3 Oxidasescreening	86
4 Experimenteller Teil	90
4.1 Materialien	90
4.1.1 Mikroorganismen	90
4.1.2 Verwendete Chemikalien	92
4.1.3 Lösungsmittel	94
4.1.4 Gase	94
4.1.5 Sonstige Hilfsmittel	95
4.2 Mikrobiologie	96
4.2.1 Kulturmedien	96
4.2.2 Stammhaltung	98
4.2.3 Naturisolate	99
4.2.3.1 Isolierung von Bodenbakterien	99
4.2.3.2 Isolierung von Bakterien der Pflanze <i>Salvia sclarea</i> L.	100
4.2.4 Kulturführung	100
4.2.4.1 Sclareolscreening mit definierten Mikroorganismen	100
4.2.4.2 Sclareolscreening mit Naturisolaten	101

4.2.4.3 Oxidasescreening	101
4.2.4.2 Kultivierung von <i>Lepista irina</i>	102
4.2.5 Bestimmung einiger Kulturparameter	102
4.2.5.1 pH-Wert	102
4.2.5.2 Glucose-Gehalt	102
4.2.5.3 Biotrockenmasse	102
4.2.5.4 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit	102
4.2.5.5 Test auf Peroxide	102
4.3 Screening	103
4.3.1 Sclareoltransformation	103
4.3.1.1 Synthese der Referenzsubstanz 1-(2-Hydroxy-ethyl) -2,5,5,8a-tetramethyl-decahydro-naphthalen-2-ol ("Diol")	103
4.3.1.2 Überprüfung des Screeningverfahrens mit <i>Hyphozyma roseoniger</i>	103
4.3.1.3 Screening von definierten Mikroorganismen	103
4.3.1.4 Screening von Naturisolaten	104
4.3.2 Oxidasescreening	105
4.3.2.1 Induktion und Probenahme	105
4.3.2.2 Oxidaseassay	105
4.3.3 Isolierung der Transformationsprodukte	106
4.3.3.1 Sclareolscreening	106
4.3.3.2 Oxidasescreening	106
4.4 Chromatographie	107
4.4.1 Gaschromatographie (GC)	107
4.4.1.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	107
4.4.1.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor	108
4.4.1.3 Berechnung von Kováts-Indices	108
4.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	109
4.4.2.1 Analytische HPLC	109
4.4.2.2 Semipräparative HPLC	110
4.4.3 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)	111
4.4.3.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)	111
4.4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	111

4.4.3.3 Ionenaustauschchromatographie (IEC)	112
4.5 UV/VIS-Spektroskopie	112
4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	112
4.7 Enzymreinigung	114
4.7.1 Aktivitätsbestimmung	114
4.7.1.1 Herstellung einer wässrigen β -Carotinlösung	114
4.7.1.2 Enzymtest	114
4.7.2 Enzymreinigung mittels GPC	115
4.7.3 Enzymreinigung mittels HIC und IEC	115
4.8 Isolierung der Carotinoide	116
4.8.1 Extraktion	116
4.8.1.1 Spinat	116
4.8.1.2 Paprika	116
4.8.1.3 Tomate	117
4.8.1.4 Quantifizierung der Carotinoide in den Extrakten	117
4.8.2 Isolierung der Carotinoide mittels semipräparativer HPLC	118
4.8.2.1 Isolierung von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein	118
4.8.2.2 Isolierung von Capsanthin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin	118
4.8.2.3 Isolierung von Lycopin	118
4.8.3 Identifizierung und Quantifizierung der isolierten Carotinoide	119
4.8.3.1 UV/VIS-Spektroskopie	119
4.8.3.2 HPLC	120
4.9 Umsetzungen der Carotinoide	120
4.9.1 Herstellung der Carotinoidlösungen	120
4.9.2 Umsetzung der Carotinoide	121
4.9.2.1 Umsetzung der Carotinoide mit zellfreiem Kulturüberstand von <i>Lepista irina</i>	121
4.9.2.2 Umsetzung der Carotinoide mit mittels GPC (teil-) gereinigter polyvalenter Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	121
4.9.2.3 Umsetzung von β -Carotin bei Emulgierung mit Tween 40 und mit Triton X 100	122
4.9.2.4 Umsetzung von β -Carotin mit mittels HIC/IEC gereinigter polyvalenter Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	122

4.9.3 Produktisolierung	122
4.9.3.1 Umsetzungen mit zellfreiem Kulturmedium	122
4.9.3.2 Umsetzungen mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus <i>Lepista irina</i>	122
4.10 Entsorgungshinweise	123
4.10.1 Biologisches Material	123
4.10.2 Lösungsmittel und Chemikalien	123
5 Literatur	124

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1 Geruchsaktive Terpene aus Ambra und deren Vorläufer Ambrein (nach OHLOFF, 1994)
- Abb. 1-2 Ambrox und sein Stereoisomer Iso-Ambrox
- Abb. 1-3 Sclareol und sein Stereoisomer 13-(S)-Sclareol
- Abb. 1-4 Chemische Synthese von Ambrox aus Sclareol (FEKIH, 1996)
- Abb. 1-5 Biotechnologische Gewinnung von Intermediaten zur Synthese von Ambrox (FARBOOD et al., 1989; FARBOOD et al., 1990)
- Abb. 1-6 Verschiedene Klassen der Norisoprenoide und Beispiele für potente Aromastoffe (modifiziert nach WINTERHALTER und ROUSEFF, 2002)
- Abb. 1-7 Biotransformation von Neoxanthin zu β -Damascenon
- Abb. 1-8 Bildung von α -Ionon und β -Ionon aus α -Carotin
- Abb. 1-9 Chemische Synthese von Damascon (nach SCHULTE-ELTE, 1972)
- Abb. 1-10 Chemische Synthese von β -Ionon und α -Ionon (nach POMMER et al., 1967)
- Abb. 2-1 GC-Chromatogramm der Biotransformation von Sclareol durch *Hyphozyma roseoniger*
- Abb. 2-2 Wachstum von Mikroorganismen in Anwesenheit von Sclareol am Beispiel von *Pleurotus eous*, *Marasmius scorodonius*, *Lentinus lepideus* und *Cunninghamella echinulata*
- Abb. 2-3 GC-Chromatogramm der flüchtigen Produkte aus der Biotransformation von Sclareol mit *Cunninghamella echinulata* (Sclareol ist vollständig abgebaut)
- Abb. 2-4 Massenspektrum eines Sclareoltransformations-Produkts
- Abb. 2-5 GC-Chromatogramm der Biotransformation von Sclareol zu Sclareoloxid durch einen aus Teichschlamm isolierten Mikroorganismus
- Abb. 2-6 Massenspektrum von Sclareoloxid
- Abb. 2-7 Für die Umsetzungen mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* eingesetzte Carotinoide

-
- Abb. 2-8 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Spinatextrakt und der daraus isolierten Carotinoide Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein
- Abb. 2-9 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Paprikaextrakt und der daraus isolierten Carotinoide Capsanthin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin
- Abb. 2-10 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Tomatenextrakt sowie des daraus isolierten Lycopins
- Abb. 2-11 Umsetzung von β -Carotin mit zellfreiem Kulturüberstand (A) und mittels GPC (teil-) aufgereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina* (B)
- Abb. 2-12 SDS-Page der mittels HIC und IEC aufgereinigten polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*
- Abb. 2-13 Massenspektren der nachgewiesenen C₁₃-Norisoprenoide aus der Umsetzung von Carotinoiden mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*
- Abb. 2-14 Spaltung der eingesetzten Carotinoide mittels polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*
- Abb. 2-15 Für das Screening auf extrazelluläre Oxidasen eingesetzte Modell-Substrate
- Abb. 2-16 Nachgewiesene Oxidationsprodukte des Limonens
- Abb. 3-1 Abbau der Seitenkette von Isocupressinsäure durch *Nocardia aurantia* ATCC 12674 (LIN und ROSAZZA, 1998)
- Abb. 3-2 Selektiver Steroidseitenkettenabbau durch *Arthrobacter simplex* (MATHUR et al., 1992)
- Abb. 3-3 Abbau der β -verzweigten 3,4-Dimethylpentansäure durch *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 (LATZA, 1999)
- Abb. 3-4 Postulierter Mechanismus des Abbaus von (R)- und (S)-Sclareol **1**, **2** zu Sclareolid **12** durch *Cryptococcus albidus* (nach FARBOOD, 1991)
- Abb. 3-5 Postulierter Mechanismus des Seitenkettenabbaus von Sclareol durch *Nocardia restricta* ITS 162 (nach HIEDA, 1982)
- Abb. 3-6 14-Sclareolepoxid
- Abb. 3-7 Epoxidierung von Isopren durch *Rhodococcus* sp. AD 45 (VAN HYLKAMA Vlieg et al., 1999)

-
- Abb. 3-8 Monohydroxylierte Transformationsprodukte des Sclareols (nach ABRAHAM, 1994; ARANDA et al., 1991; KOUZI UND MC CHESNEY, 1991)
- Abb. 3-9 Chemische Synthese von Ambrox aus Sclareoloxid (DAVEY et al., 1998)
- Abb. 3-10 Enzymatische Spaltung von Tween 40 zu Polyoxyethylensorbitan und Palmitinsäure
- Abb. 3-11 Enzymatische Spaltung von β -Carotin zu Retinal durch Carotin-15,15'-Monooxygenasen
- Abb. 3-12 Spaltung von 9'-cis-Neoxanthin zu Xanthoxin und dem komplementären C₂₅-Apocarotinoid durch 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen
- Abb. 3-13 Enzymatische Spaltung von Lutein an den Bindungen zwischen C₉ und C₁₀
- Abb. 3-14 Enzymatische Spaltung der C₇-C₈ Bindung von Zeaxanthin
- Abb. 3-15 Postulierter Biosyntheseweg der vier isomeren Megastigma-4,6,8-trien-3-one aus (3*R*)-3-Hydroxy- α -Ionon in Tabak (nach WAHLBERG, 2002)
- Abb. 3-16 Postulierte Biosynthese von Vitispiran aus 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid in Wein (nicht nachgewiesene, eingefügte Intermediate sind in Klammern angegeben) (nach WILLIAMS, 1992)
- Abb. 3-17 Abbau von 3-Hydroxy- β -Ionon zu 3,4-Didehydroiononen

Tabellenverzeichnis

- Tab. 2-1 Im Screening auf Sclareoltransformation verwendete Mikroorganismen
- Tab. 2-2 Sclareol-transformierende Mikroorganismen
- Tab. 2-3 Orte für die Entnahme von (Boden-) Proben zur Isolierung Sclareol-abbauender Mikroorganismen
- Tab. 2-4 Vergleich der in den Extrakten ermittelten Carotinoidkonzentrationen (mg pro Extrakt aus 1 kg Gemüse) mit in der Literatur angegebenen Carotinoidkonzentrationen (mg x kg⁻¹ Gemüse)
- Tab. 2-5 Spektralphotometrische Identifizierung der aus Spinat, Paprika und Tomate isolierten Carotinoide (Literaturspektren: BRITTON et al., 1995)
- Tab. 2-6 Quantifizierung der pro HPLC-Lauf (semipräparative HPLC nach 4.8.2) aus den jeweiligen Gemüseextrakten isolierten Carotinoide, Quantifizierung mittels analytischer HPLC (siehe 4.8.3.2) und UV/VIS-Spektroskopie (siehe 4.8.3.1)
- Tab. 2-7 Abbauraten verschiedener Carotinoide bei der Umsetzung mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* (2h, 34°C, 150 rpm)
- Tab. 2-8 Flüchtige Produkte der Umsetzung von Carotinoiden mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*
- Tab. 2-9 Experimentell bestimmte Kovatsindices der nachgewiesenen C13-Norisoprenoide im Vergleich zu den Kovatsindices aus der Literatur
- Tab. 2-10 Quantifizierung der flüchtigen Carotinoid-Abbauprodukte in mol% bezogen auf eingesetztes Carotinoid (Inkubationszeit 2 h)
- Tab. 2-11 Für das Screening auf extrazelluläre Oxidasen ausgewählte Mikroorganismen
- Tab. 2-12 Identifizierung der in den zellfreien Kulturmedien von *Cyathus striatus*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* nachgewiesenen Transformationsprodukte des Limonens
- Tab. 2-13 *Cyathus striatus*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L⁻¹] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen (- = nicht nachweisbar, < 20 µg L⁻¹)
- Tab. 2-14 *Marasmius scorodonius*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L⁻¹] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen

-
- Tab. 2-15 *Trametes versicolor*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L^{-1}] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen (- = nicht nachweisbar)
- Tab. 3-1 Am Abbau der Lignocellulose beteiligte Oxidoreduktasen (nach LEONOWICZ et al., 1999)
- Tab. 4-1 Verwendete Mikroorganismen
- Tab. 4-2 Nährmedienbestandteile
- Tab. 4-3 Substrate und Referenzsubstanzen
- Tab. 4-4 Sonstige Chemikalien
- Tab. 4-5 Lösungsmittel
- Tab. 4-6 Gase
- Tab. 4-7 Sonstige Hilfsmittel
- Tab. 4-8 HPLC-Gradient für die Analytik von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein, modifiziert nach KIDMOSE et al., 2001
- Tab. 4-9 HPLC-Gradient für die Analytik von Capsanthin, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin und Lycopin, modifiziert nach KHACHIK und BEECHER, 1988
- Tab. 4-10 Zusammensetzung des für die SDS-Page verwendeten Größenstandards (roti-Mark-Standard)
- Tab. 4-11 Lösungsmittel, Wellenlängen und molare Extinktionskoeffizienten für die spektralphotometrische Quantifizierung der Carotinoide (BRITTON et al., 1995)

Abkürzungsverzeichnis

A	Aktivität
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BIS	Bisacrylamid
BTM	Biologische Trockenmasse
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
chem. rein	chemisch rein
DTT	Dithiothreitol
dest.	Destilliert
DMF	Dimethylformamid
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
et al.	und Mitarbeiter
FID	Flammenionisationsdetektor
f. Mikrobiol	für die Mikrobiologie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSU	Friedrich Schiller Universität
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPG	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Agar
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
ISTD	interner Standard
KI	Kováts-Index
λ	Wellenlänge
Lit.	Literatur
MS	Massenspektrometrie
M ⁺ *	Molekülpeak

NCIMB	National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria
NCED	9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
redest.	Redestilliert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNA	Standardnähragar
SNL	Standardnährmedium
SL	Stammlösung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
Wag.	Wageningen

1 Einleitung

In der Aromen- und Riechstoffindustrie werden Terpenoide in einer großen Anzahl von Parfum- und Kosmetikprodukten, Lebensmitteln sowie in Haushaltsprodukten und Pharmazeutika eingesetzt (SCHRADER und BERGER, 2001). Die Konzentrationen, in denen die gefragten Verbindungen in der Natur vorkommen, sind zum Teil sehr gering, was eine Gewinnung aus natürlichen Quellen aufwendig und teuer macht. Die Isolierung ausreichender Mengen ist oftmals nicht möglich. Um die Nachfrage dennoch zu decken, werden mehr als 80 % der Aroma- und Riechstoffe weltweit, darunter viele Terpenoide, chemisch synthetisiert (LUCKNER, 1990).

Biotechnologische Verfahren stellen sinnvolle Alternativen zu den klassischen organisch-chemischen Synthesen dar. Die Verwendung von Biokatalysatoren bietet insbesondere im Bereich der Aromastoffe verschiedene Vorteile. So zeichnen sich enzymatisch katalysierte Reaktionen durch eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität aus. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die sensorische Aktivität von Aromastoffen in der Regel von einer exakten stereochemischen Struktur abhängig ist. Zudem gelten Aromastoffe, die aus natürlichen Ausgangsmaterialien pflanzlicher oder tierischer Herkunft durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren hergestellt werden, als natürliche Aromastoffe (AROMENVERORDNUNG, 1998). Durch die damit verbundene erhöhte Akzeptanz beim Verbraucher steigen die Vermarktungschancen beträchtlich. Auf Grund ökologisch kompatibler Agenzien und Reaktionsbedingungen stellen biotechnologische Verfahren eine umweltfreundliche Alternative zu den herkömmlichen chemischen Synthesen dar.

Von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung im Bereich der terpenoiden Aromastoffe sind die Ambra-Riechstoffe und die aus Carotinoid-Vorstufen gebildeten Norisoprenoide. Deren natürliche Quellen, Beispiele für die chemische Synthese sowie die bislang entwickelten biotechnologischen Herstellungsverfahren sind im folgenden zusammengefasst. Oxidationen spielen eine wichtige Rolle bei der biotechnologischen Herstellung von Aromastoffen. Oxidorektuktasen, die im Bereich der Aromastoffbiotechnologie eingesetzt werden, sind unter 1.3 aufgeführt.

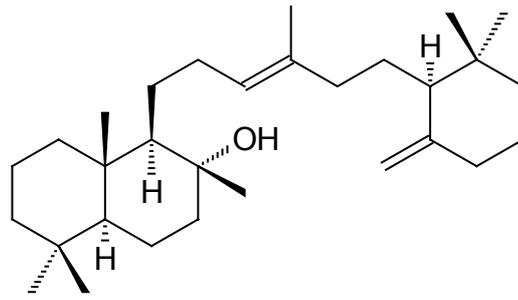
1.1 Bisherige Kenntnisse

1.1.1 Ambra-Riechstoffe

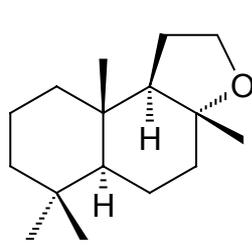
1.1.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Ambra-Riechstoffen

Die natürliche Quelle von Ambra-Riechstoffen ist Ambra. Ambra ist ein Stoffwechselprodukt des Pottwals (*Physeter macrocephalus* L.), das im Verdauungstrakt akkumuliert und der Abdeckung von durch die Nahrungsaufnahme entstandenen Verletzungen dient. Ambra wird in 1 % der Pottwale gefunden (OHLOFF, 1994). Nach der Freisetzung durch den Wal werden Ambrastücke von bis zu 20 cm Durchmesser an die Küsten gespült (DUBOIS, 1978). Die größte Menge Ambra wird jedoch aus getöteten Tieren gewonnen (BAUER et al., 1990).

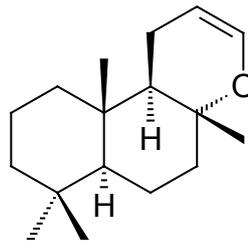
Ein Hauptbestandteil von Ambra ist der geruchlose Triterpenalkohol Ambrein, der in Konzentrationen von bis zu 80 % enthalten ist. Ambrein wird als Vorläufer verschiedener mono-, bi- und tricyclischer Verbindungen angesehen, die für das Aromaprofil von Ambra verantwortlich sind (OHLOFF, 1982). Diese Verbindungen stammen sowohl aus dem bicyclischen als auch aus dem monocyclischen Teil des Ambreinmoleküls. Sie entstehen durch autoxidative und photooxidative Prozesse, wenn das vom Wal freigesetzte Ambra auf der Wasseroberfläche Luft, Sonneneinstrahlung und starken Wellen ausgesetzt ist (OHLOFF, 1994). Abbildung 1-1 zeigt einen Überblick über die aus Ambrein entstehenden geruchsaktiven terpenoiden Verbindungen.



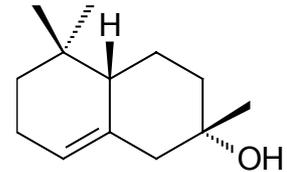
Ambrein



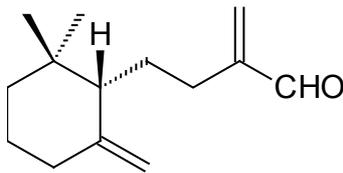
1



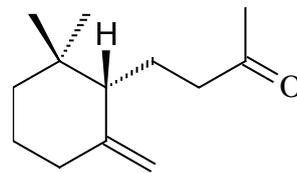
2



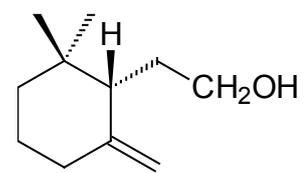
3



4



5



6

Abb. 1-1 Geruchsaktive Terpenoide aus Ambra und deren Vorläufer Ambrein (nach OHLOFF, 1994)

Das Aroma von Ambra wird als erdig, holzig, an Moschus und Tabak erinnernd beschrieben. Ambrox **1** und α -Ambrinol **3** sind die wichtigsten Ambra-Riechstoffe (OHLOFF, 1994). Es sind zahlreiche, zum großen Teil synthetische Verbindungen bekannt, die einen Geruch nach Ambra aufweisen. Der Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Ambrageruch wurde in verschiedenen Studien untersucht (DIMOGLO et al., 1995; OHLOFF, 1971). Vor allem ist ein bicyclisches Decalin-Grundgerüst mit einer definierten Stereochemie erforderlich. Ambrox (8-(R)-Ambrox) weist beispielsweise im Vergleich zu seinem Stereoisomer Iso-Ambrox (8-(S)-Ambrox) (siehe Abb. 1-2) eine 100-fach geringere Geruchsschwelle auf (OHLOFF, 1982).



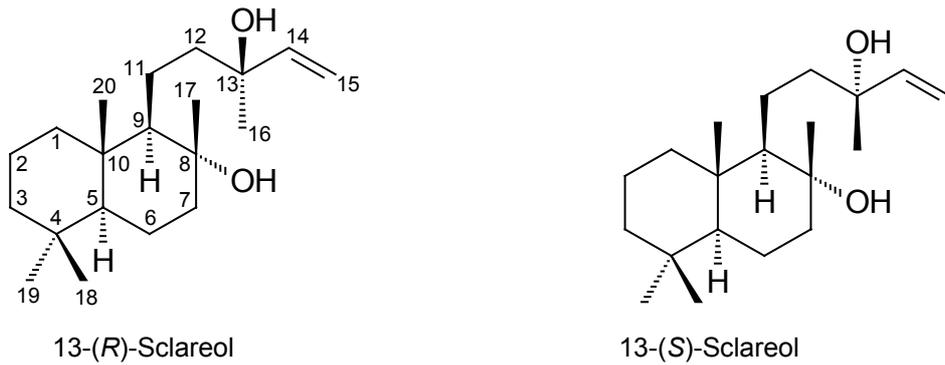
Abb. 1-2 Ambrox und sein Stereoisomer 8-(S)-Ambrox

Ambrox wurde auch in den etherischen Ölen von *Salvia sclarea* L., *Cistus labdaniferus* L. und *Cupressus sempervivens* L. nachgewiesen (OHLOFF, 1982; GERNERO et al., 1977). Mischungen von Ambrox und Iso-Ambrox werden in Konzentrationen von bis zu 0,2 % in 40 % aller hergestellten Parfums eingesetzt (OHLOFF, 1994). Pro Jahr werden 2 bis 4 Tonnen Ambrox auf dem Weltmarkt gehandelt (FEKIH, 1996). Natürliches Ambra wird in Form einer 3 % igen ethanolischen Lösung zur Herstellung von Parfums verwendet (BAUER et al., 1990).

1.1.1.2 Chemische Verfahren zur Herstellung von Ambrox

Um die Nachfrage zu befriedigen, werden Ambra-Riechstoffe auch synthetisch hergestellt. Ambrox stellt wegen seiner einzigartigen olfaktorischen und fixierenden Eigenschaften den wichtigsten Ersatz für natürliches Ambra dar (TENIUS et al., 2000). Als Ausgangsstoffe für die Synthese von Ambrox werden bevorzugt Labdane verwendet, da diese bereits das erforderliche Decalin-Grundgerüst und je nach gewähltem Labdan die dem Ambrox entsprechende Konfiguration der Stereozentren aufweisen.

Sclareol ist das für die industrielle Synthese von Ambrox meist verwendete Ausgangsmaterial (TENIUS et al., 2000). Sclareol wird aus der Muskatellersalbeipflanze *Salvia sclarea* L. gewonnen, in deren Blüten es in Konzentrationen von bis zu $4 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ enthalten ist (BANTHORPE et al., 1990). Das natürliche Produkt ist ein Isomerengemisch aus dem 13-(R)- und dem 13-(S)-Stereoisomer im Verhältnis 9:1 (Abb. 1-3) (BERNADINELLI et al., 1988).

Abb. 1-3 Sclareol und sein Stereoisomer 13-(*S*)-Sclareol

Die chemische Synthese von Ambrox erfolgt im ersten Schritt durch den selektiven Seitenkettenabbau des Sclareols. Hierzu werden Oxidationsmittel wie Ozon, Peroxide, Chromtrioxid oder Kaliumpermanganat eingesetzt. Als häufiges Intermediat entsteht 1-(2-Hydroxy-ethyl)-2,5,5,8a-tetramethyl-decahydro-naphthalen-2-ol ("Diol"), das anschließend zum Furan cyclisiert wird (TENIUS et al., 2000). Abbildung 1-4 zeigt exemplarisch ein industrielles chemisches Verfahren zur Synthese von Ambrox aus Sclareol.

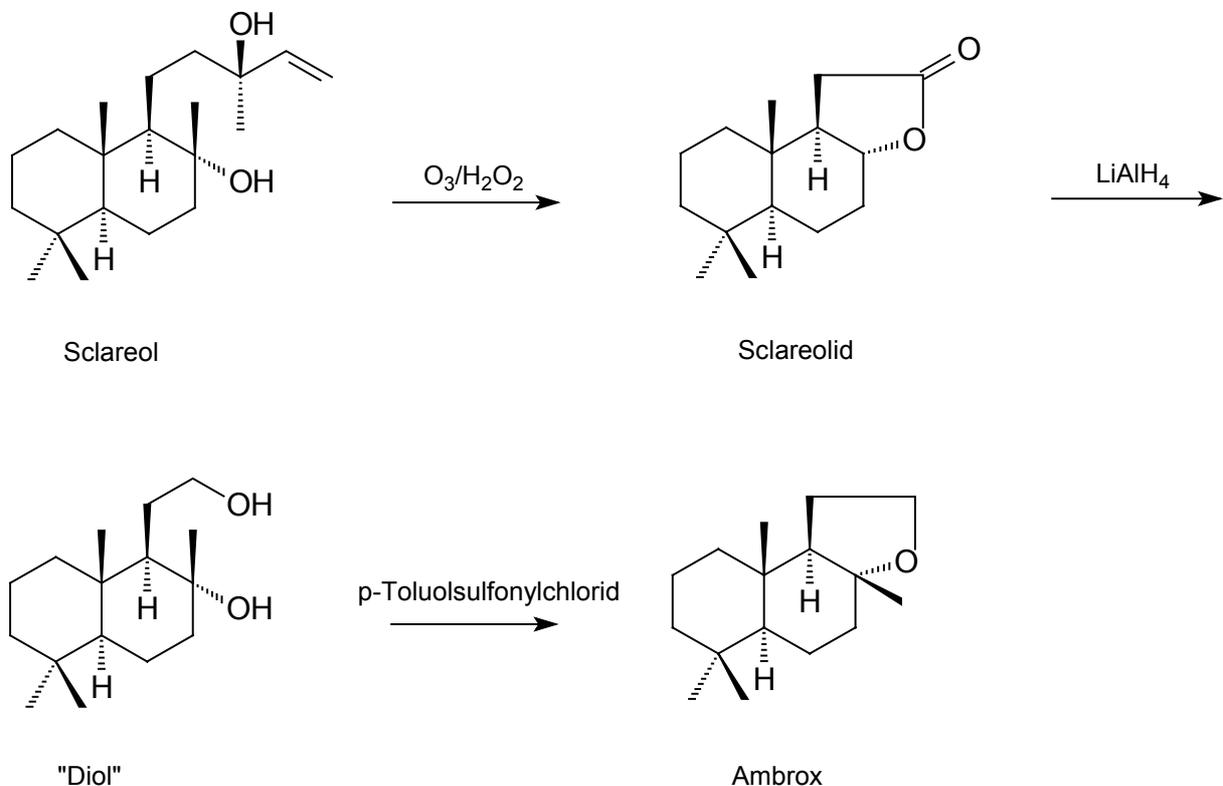


Abb. 1-4 Chemische Synthese von Ambrox aus Sclareol (FEKIH, 1996)

1.1.1.3 Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Ambrox

Die biotechnologische Gewinnung von Intermediaten zur Synthese von Ambrox ist in zwei US-Patenten beschrieben (FARBOOD et al., 1989; FARBOOD et al., 1990). Die Hefestämme *Hyphozyma roseoniger*, *Bensingtonia ciliata* und *Cryptococcus laurentii* bauen die Seitenkette des Sclareols selektiv zum "Diol" ab, während der Seitenkettenabbau durch *Cryptococcus albidus* zum Sclareolid führt (Abb. 1-5).

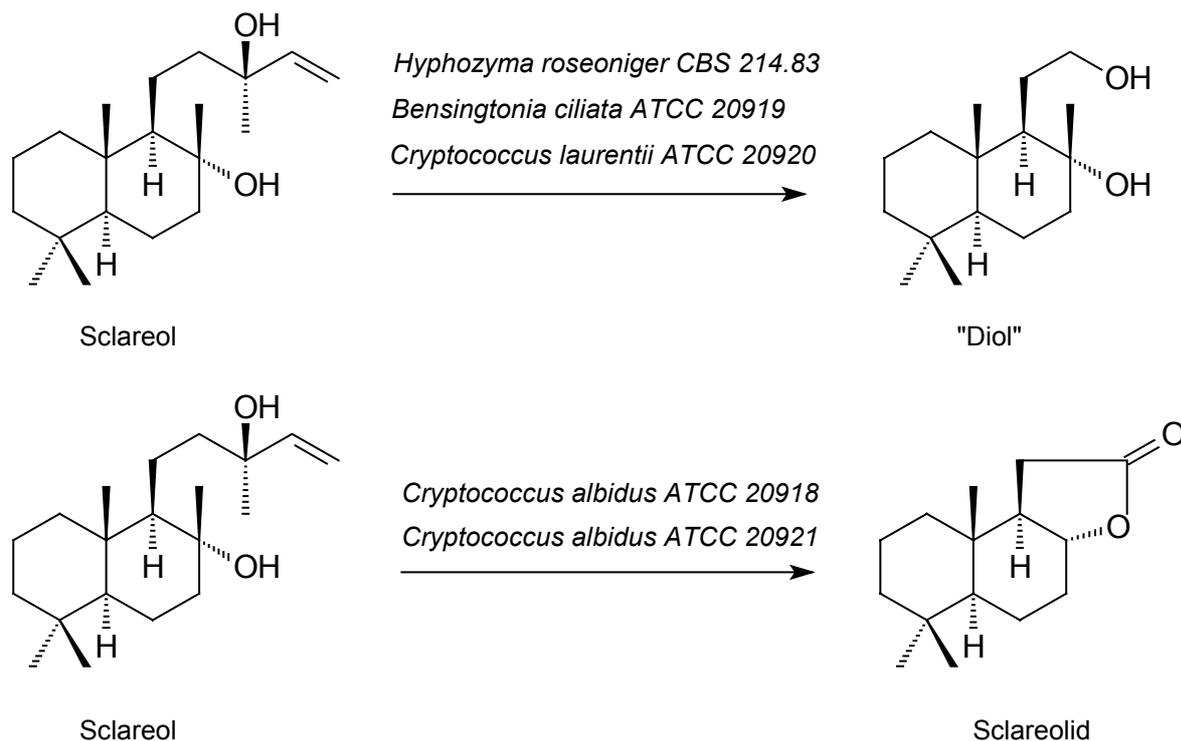


Abb. 1-5 Biotechnologische Gewinnung von Intermediaten zur Synthese von Ambrox (FARBOOD et al., 1989; FARBOOD et al., 1990).

Alle verwendeten Stämme metabolisieren sowohl 13-(*R*)-Sclareol als auch sein Stereoisomer 13-(*S*)-Sclareol. *Hyphozyma roseoniger* baut Sclareol in einer Konzentration von 5 g x 100 mL⁻¹ zu 71 % zum korrespondierenden "Diol" ab (FARBOOD, 1989). Die Transformation von Sclareol zum Sclareolid durch *Cryptococcus albidus* erfolgt quantitativ bei eingesetzten Sclareolkonzentrationen von 150 g L⁻¹ (FARBOOD, 1991). Sclareolid und "Diol" können durch anschließende chemische Syntheseschritte zu Ambrox cyclisiert werden (siehe 1.1.2).

1.1.2 Norisoprenoide Aromastoffe

1.1.2.1 Natürliches Vorkommen von Norisoprenoiden

Eine große Anzahl von offensichtlich aus Carotinoid-Vorstufen gebildeten Verbindungen wurde in der Natur identifiziert. Viele dieser Apocarotinoide spielen eine wichtige Rolle als Aroma- und Riechstoffe (OHLOFF, 1994).

Da Untersuchungen mit markierten Verbindungen fehlen, ist die Klassifizierung der Norisoprenoide als Carotinoid-Abbauprodukte bislang noch spekulativ. Es gibt jedoch mehrere Hinweise, die einen auf dem Carotinoid-Abbau basierenden Biosyntheseweg unterstützen (KNAPP et al., 2002). So korreliert die Abnahme der Carotinoid-Konzentration während der Reife von Trauben bzw. der Fermentation von Tee und Tabak mit der Zunahme der entsprechenden Norisoprenoide (SANDERSON et al., 1971; WAHLBERG und ENZELL, 1987; RAZUNGLES et al., 1988). In einigen Fällen konnten komplementäre Fragmente wie C₂₇- und C₁₃-Fragmente aus Rosenblüten sowie C₁₀- und C₂₀-Fragmente aus Safran isoliert werden (EUGSTER und MÄRKI-FISCHER, 1991; PFANDER und SCHNURTENBERGER, 1982). Zudem verfügen die Norisoprenoide über die gleiche Stereochemie wie die Carotinoid-Precursoren (ENZELL et al., 1977).

In der Natur kommen Norisoprenoide mit C₉-, C₁₀-, C₁₁- und C₁₃-Gerüsten vor. Die C₁₃-Norisoprenoide stellen die größte Gruppe der aromarelevanten Carotinoid-Spaltprodukte dar. Abbildung 1-6 zeigt die verschiedenen Klassen der Norisoprenoide mit Beispielen bedeutender Aromastoffe.

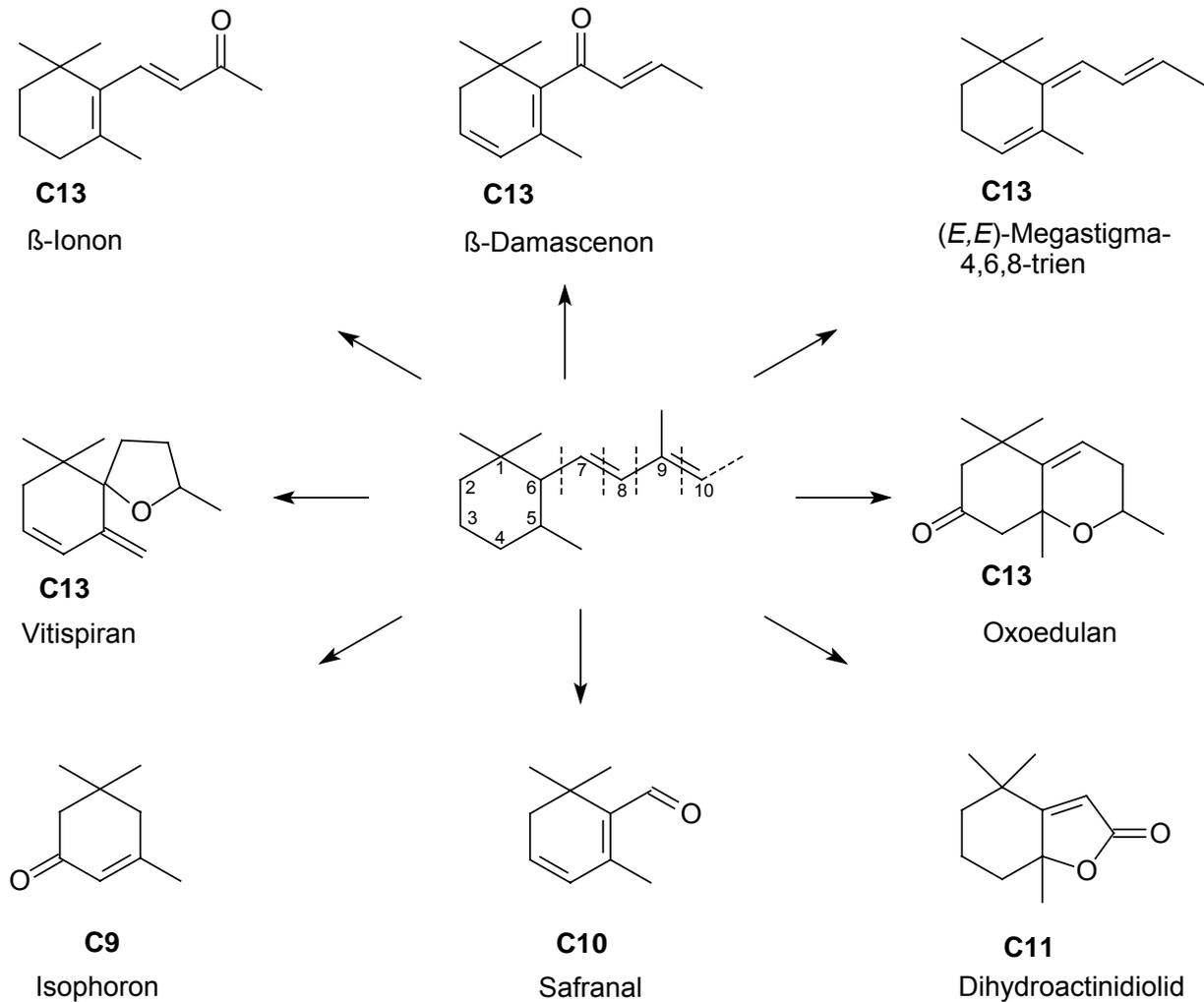


Abb. 1-6 Verschiedene Klassen der Norisoprenoide und Beispiele für potente Aromastoffe
(modifiziert nach WINTERHALTER und ROUSEFF, 2002)

Norisoprenoide wurden nicht nur in Blattprodukten wie Tabak, Tee und Mate, sondern auch in vielen etherischen Ölen, Früchten (Trauben, Passionsfrucht, Sternfrucht, Quitte, Apfel, Nektarine), Gemüse (Tomate, Melone), Gewürzen (Safran, Paprika) und in weiteren Quellen wie Wein, Rum, Kaffee, Eichenholz und Honig gefunden (WINTERHALTER und ROUSEFF, 2002).

Zur Biosynthese eines Aromastoffs aus dem entsprechenden Carotinoid-Vorläufer sind im allgemeinen drei Schritte notwendig: (i) die initiiierende Dioxygenase-Spaltung, (ii) die anschließende enzymatische Transformation des Spaltprodukts zu einem polaren Aroma-Precursor und (iii) die säurekatalysierte Umwandlung des nichtflüchtigen Precursors in die olfaktorisch aktive Form (WINTERHALTER, 1996).

Ein Beispiel für die Bildung von Aromastoffen nach diesem Prinzip ist die Biosynthese von β -Damascenon aus Neoxanthin. Aus der Spaltung des Neoxanthins resultiert das Primärprodukt Grashüpfkerketon. Dieses wird im nächsten Schritt enzymatisch zum olfaktorisch inaktiven Aroma-Precursor, dem Megastigma-6,7-dien-3,5,9-triol ("Triol") reduziert, das säurekatalysiert in Damascenon überführt wird.

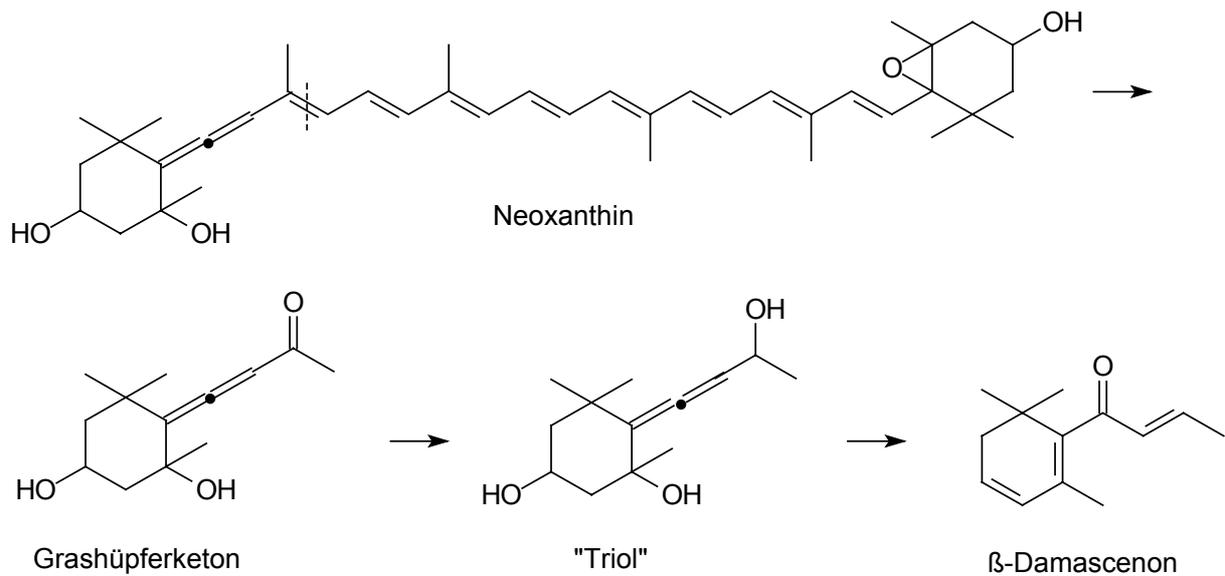


Abb. 1-7 Biotransformation von Neoxanthin zu β -Damascenon

In einigen Fällen, wie beispielsweise bei der Bildung von α - und β -Ionon, werden die Aromastoffe bereits nach der initiierenden Spaltung erhalten.

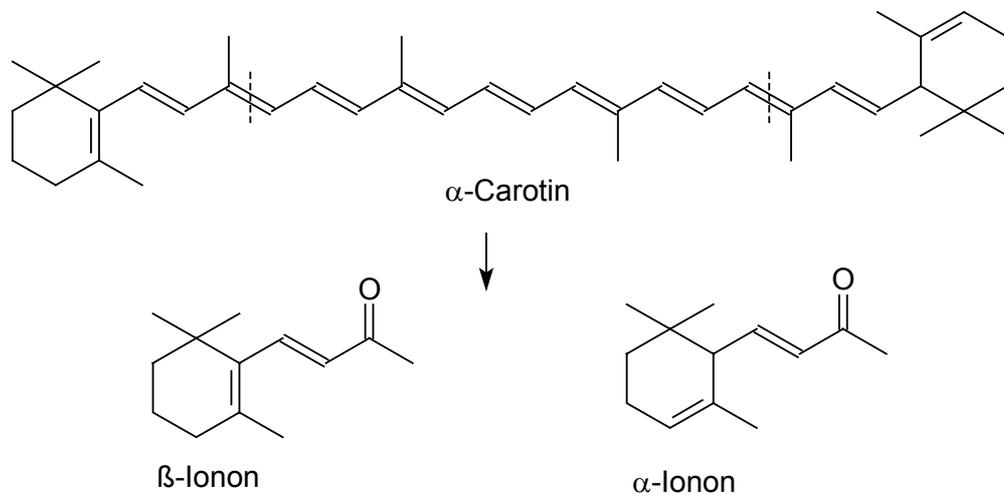


Abb. 1-8 Bildung von α -Ionon und β -Ionon aus α -Carotin

1.1.2.2 Bedeutung und chemische Synthese von Norisoprenoiden

Unter den möglichen Carotinoid-Spaltprodukten sind insbesondere die Ionone sowie die Rosenketone Damascon und Damascenon von großem wirtschaftlichen Interesse. Natürliche Quelle der Ionone ist Veilchenblütenöl (*Viola odorata* L.). Hier sind α - und β -Ionon sowie deren 7,8-Dihydroverbindungen mit einem Anteil von 22% die Hauptkomponenten (UHDE und OHLOFF, 1972). Die Damascenone stellen die Schlüsselverbindungen im etherischen Rosenöl (*Rosa damascena* Miller) dar. Ihr Anteil beträgt 1 % (OHLOFF und DEMOLE, 1987). Den Rosenketonen werden narkotisch-würzige, an exotische Blumen erinnernde Aromaeigenschaften zugesprochen. β -Ionon wird als holzig, blumig und himbeerartig, α -Ionon als veilchenartig, blumig, fruchtig und holzig beschrieben (OHLOFF, 1994). Insbesondere β -Ionon und β -Damascenon zeichnen sich durch äußerst niedrige Geruchsschwellenwerte von $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$ bzw. $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ aus (BUTTERY et al., 1971; OHLOFF, 1987). Die Geruchsschwellenwerte von R(+)- α -Ionon und β -Damascon liegen bei $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ bzw. $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ (OHLOFF, 1987; OHLOFF, 1994). Bedingt durch ihre niedrigen Geruchsschwellenwerte und attraktiven Aromaeigenschaften sind die Ionone und Damascenone von besonderem Interesse für die Riechstoff- und Aromenindustrie. Sie werden vor allem in Körperpflegemitteln und Parfums eingesetzt. Ionone und Rosenketone werden auf Grund der großen Nachfrage auch synthetisch hergestellt. In Abbildung 1-9 ist die chemische Synthese von Damascon dargestellt. Abbildung 1-10 zeigt die chemische Synthese von β -Ionon.

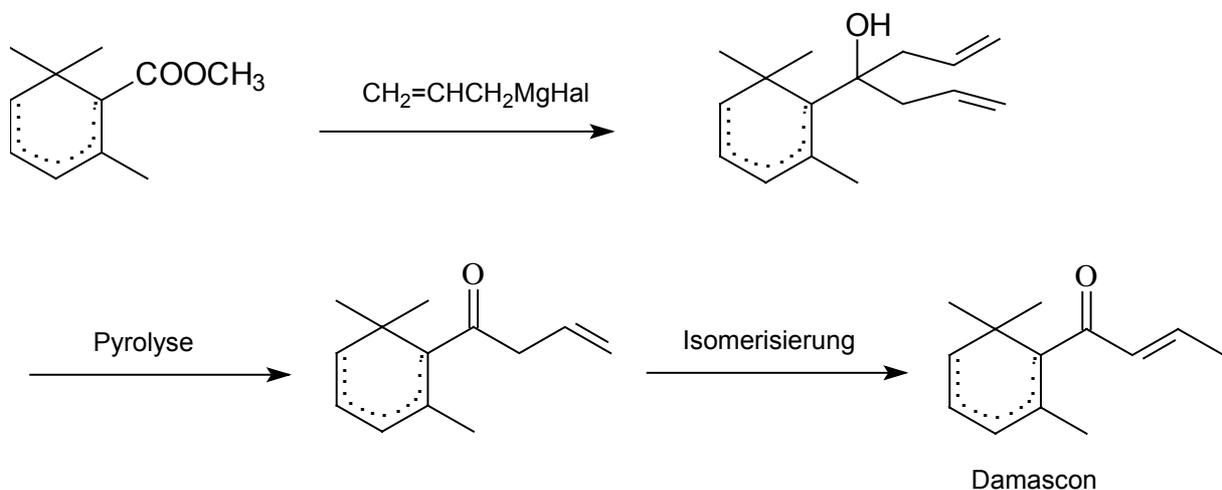


Abb. 1-9 Chemische Synthese von Damascon (nach SCHULTE-ELTE, 1972)

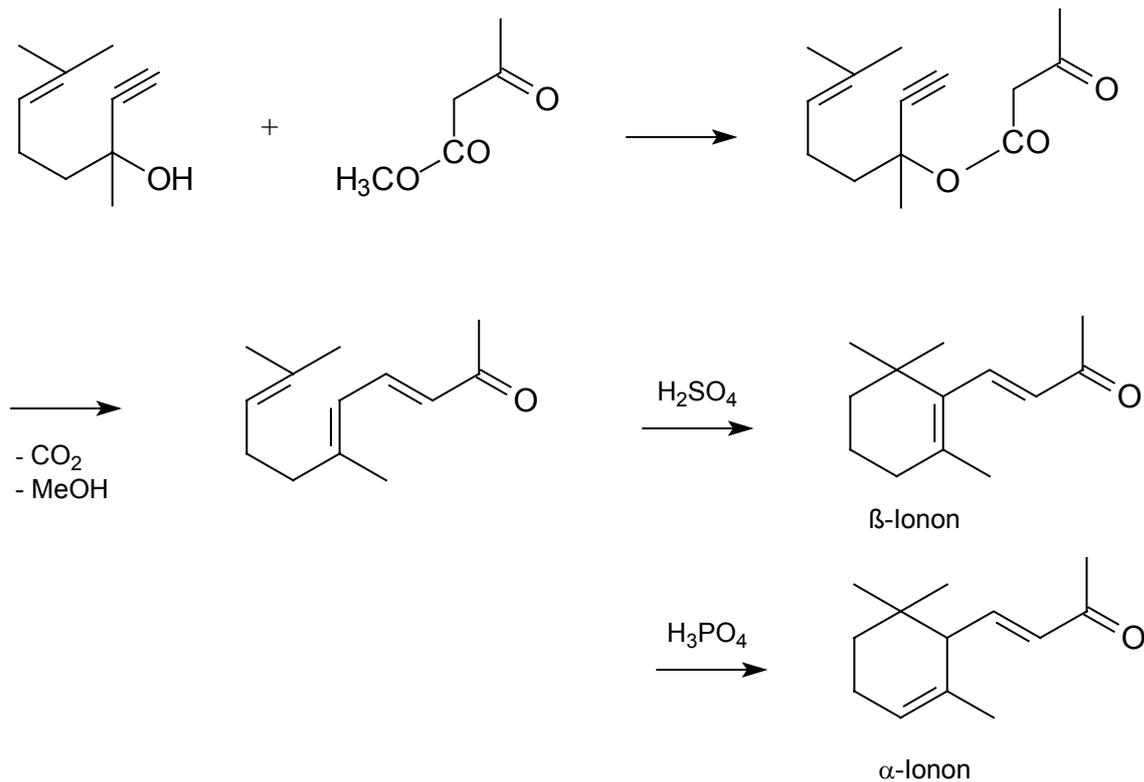


Abb. 1-10 Chemische Synthese von β -Ionon und α -Ionon (nach POMMER et al., 1967)

1.1.2.3 Biotechnologische Verfahren

Verschiedene biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Norisoprenoiden mittels Enzymen sind beschrieben.

Norisoprenoide liegen im pflanzlichen Material vorwiegend in gebundener Form als Glykoside oder Glucoseester vor. Dies bietet Potential für die Anwendung von Glykosidasen und/oder anderen Hydrolasen (WINTERHALTER und ROUSEFF, 2002). Die Verwendung von Glykosidasen wird nicht nur als Möglichkeit zur Verbesserung des Frucht-spezifischen Aromas von Säften und Wein, sondern auch als Methode zur Gewinnung von natürlichen Aromastoffe aus pflanzlichen Abfallmaterialien angesehen (WINTERHALTER, 1996).

Norisoprenoide können auch durch den Abbau von Carotinoiden mittels Co-Oxidation hergestellt werden. Oxidase-Systeme wie Lipoxygenase, Phenoloxidase, Lactoperoxidase oder Xanthinoxidase bewirken die Bildung radikalischer

Intermediate aus verschiedenen Substraten. Die Radikale führen in unspezifischen Nebenreaktionen zur Spaltung der Carotinoide (WINTERHALTER und ROUSEFF, 2002).

In neueren Arbeiten wird der Abbau von Carotinoiden zu Aromastoffen durch ein mikrobielles Enzym beschrieben (ZORN et al., 2003 a). Die aus *Lepista irina* isolierte polyvalente Peroxidase spaltet β -Carotin an der Bindung zwischen C₉ und C₁₀ unter Bildung von β -Ionon. Auch die Spaltung von α -Carotin unter Freisetzung der entsprechenden C₁₃-Ketone β -Ionon und α -Ionon wurde beschrieben (LANGHOFF, 2002). Carotinoid-spaltende Enzymaktivitäten wurden auch bei anderen Basidiomyceten festgestellt. In den zellfreien Kulturmedien von *Ischnoderma benzoinum*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* wurden nach der Inkubation mit β -Carotin die flüchtigen Spaltprodukte β -Ionon, β -Cyclocitral, Dihydroactinidiolid und 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon nachgewiesen. In Submerskulturen von *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Trametes suaveolens* wurde nach der Zugabe von β -Carotin Dihydroactinidiolid gebildet (ZORN et al., 2003 b).

Der Abbau von Lutein zu den flüchtigen Produkten β -Ionon, 7,8-Dihydro- β -ionol, 7,8-Dihydro- β -Ionon sowie 3-Hydroxy- β -Ionon ist durch eine Mischkultur von *Bacillus* sp. und *Geotrichum* sp. beschrieben (SANCHEZ-CONTRERAS et al., 2000). Die Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme erfolgte jedoch nicht.

1.1.3 Oxidoreduktasen in der Aromastoffbiotechnologie

Verschiedene Oxidoreduktasen werden zur Herstellung von Aromastoffen eingesetzt. Die Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (HLADH) oxidiert beispielsweise 3-Hexenol und 2-Phenylethanol zu den entsprechenden Aldehyden (WEENEN et al., 1995). Die Lipoxygenase (LOX) ist ein wichtiges Enzym in der industriellen Herstellung von natürlichen „Grün-Noten“-Aroma-Komponenten, wie die der Gruppe der isomeren C₆-Aldehyde und Alkohole (MULLER et al., 1995). Eine Lipoxygenase aus Sojabohnen ist für die Co-Oxidation von Carotinen unter Bildung von α -Ionon und β -Ionon beschrieben (ROPERT et al., 1995). Die unter 1.1.2.3 genannte polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* ist ein Beispiel für die Verwendung von Oxidoreduktasen aus Mikroorganismen in der Aromastoffbiotechnologie. Pilze sind

allgemein als Produzenten von (extrazellulären) Oxidoreduktasen beschrieben (HEINZKILL M. und MESSNER K., 1997). Diese Enzyme stellen potentielle Biokatalysatoren für die biotechnologische Herstellung von Aromastoffen dar. Extrazelluläre Oxidoreduktasen bieten im Gegensatz zu intrazellulären Enzymen den Vorteil einer weniger aufwendigen Isolierung.

1.2 Problemstellung

Durch ein Screening sollten Mikroorganismen-Stämme ermittelt werden, die zur Biotransformation von Sclareol, insbesondere dem selektiven Seitenkettenabbau des Labdans in der Lage sind. Hierdurch entstandene Transformationsprodukte können als Intermediate für die Synthese von Ambrox eingesetzt werden.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde eine von *Lepista irina* gebildete polyvalente Peroxidase isoliert, die β -Carotin an der Doppelbindung zwischen C₉ und C₁₀ unter der Bildung von β -Ionon spaltet (LANGHOFF, 2002). Durch die Umsetzung zusätzlicher Carotinoide mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* sollte die Substratspezifität des Enzyms sowie die Möglichkeit der Gewinnung weiterer Norisoprenoide mit Aromaeigenschaften untersucht werden.

Verschiedene Pilz-Stämme sollten auf die Bildung extrazellulärer Oxidoreduktasen getestet werden, die potentielle Biokatalysatoren zur Herstellung von Aromastoffen darstellen.

2 Ergebnisse

2.1 Screening auf Sclareoltransformation

2.1.1 Screening von definierten Mikroorganismen

2.1.1.1 Auswahl der Mikroorganismen

Um eine gezielte Vorauswahl zu treffen, wurden Mikroorganismen ausgewählt, die mindestens einem der folgenden Kriterien entsprachen:

- Gattung ist für die Transformation von Sclareol zu Sclareolid bzw. "Diol" (1-(2-Hydroxy-ethyl)-2,5,5,8a-tetramethyl-decahydro-naphthalen-2-ol) bekannt oder mit dieser Gattung verwandt
- Art ist zum Abbau von Seitenketten anderer Labdane befähigt
- Art ist zum Abbau von Steroid-Seitenketten befähigt
- Art oder Stamm ist zum Abbau verzweigter Alkane befähigt
- Art oder Gattung ist zur Terpenbiosynthese oder -transformation befähigt
- Art wurde von Terpen-haltigen Substraten isoliert

Tabelle 2-1 zeigt eine Zusammenstellung der für das Screening ausgewählten Mikroorganismen.

Tab. 2-1 Im Screening auf Sclareoltransformation verwendete Mikroorganismen

Art	Einteilung	Auswahlkriterium	Lit.
<i>Arthrobacter oxydans</i>	Bakterium	Abbau von verzweigten Steroidseitenketten	Dutta et al., 1992
<i>Arthrobacter simplex</i>	Bakterium	Abbau von verzweigten Steroidseitenketten	Mathur et al., 1992
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Deuteromycet	isoliert von Citrusfrüchten	Prasad und Singh, 1995
<i>Chaetomium globosum</i>	Ascomycet	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol" und Sclareolid	Farbood et al., 1990
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol" und Sclareolid	Farbood et al., 1990
<i>Cryptococcus macerans</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol" und Sclareolid	Farbood et al., 1990
<i>Cryptococcus terreus</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol" und Sclareolid	Farbood et al., 1990
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Zygomycet	Labdan-Transformation	Carreras et al., 1996
<i>Cyathus africanus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	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>Fomitopsis pinicola</i>	Basisiomycet	isoliert von Fichtenholz	DSMZ, 2003
<i>Ganoderma applanatum</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	Abraham und Berger, 1994
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	Basisiomycet	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Gordonia rubripertincta</i>	Bakterium	Abbau von Steroidseitenketten	Mahato und Gairai, 1997
<i>Hyphozyma lignicola</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol"	Farbood, 1989
<i>Hyphozyma sanguina</i>	Hefe	Gattung transformiert Sclareol zum "Diol"	Farbood, 1989

<i>Hyphozyma variabilis</i> var. <i>odora</i>	Hefe	Gattung transformiert zum "Diol"	Sclareol	Farbood, 1989
<i>Hyphozyma variabilis</i> var. <i>variabilis</i>	Hefe	Gattung transformiert zum "Diol"	Sclareol	Farbood, 1989
<i>Hypomyces odoratus</i>	Ascomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese isoliert von Nadelholz		Janssens et al., 1991
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese u.-transformation		Abraham und Berger, 1994
<i>Lentinellus cochleatus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Lentinus lepideus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1991
<i>Lepista irina</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Lepista nuda</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Breheret et al., 1997
<i>Marasmius scorodonius</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)		Janssens et al., 1995
<i>Omphalotus olearius</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1991
<i>Paxillus involutus</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Penicillium citrinum</i>	Deuteromycet	isoliert von Citrusfrüchten		Prasad und Singh, 1995
<i>Penicillium digitatum</i>	Deuteromycet	isoliert von Citrusfrüchten		Snowdon, 1990
<i>Penicillium italicum</i>	Deuteromycet	isoliert von Orangen		Snowdon, 1990
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	Basidiomycet	isoliert von Kiefernholz		DSMZ, 2003
<i>Phellinus igniarius</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995
<i>Phellinus pini</i>	Basidiomycet	isoliert von Kiefernholz		DSMZ, 2003
<i>Phlebia radiata</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese		Janssens et al., 1995

<i>Pholiota populnea</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	Abraham und Berger, 1994
<i>Pholiota squarrosa</i>	Basidiomycet	isoliert von Nadelhölzern	DSMZ, 2003
<i>Pleurotus eous</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Pleurotus sapidus</i>	Basidiomycet	Terpen-Transformation (Gattung)	Janssens et al., 1995
<i>Pseudomonas putida</i>	Bakterium	Abbau von Steroidseitenketten	Mahato und Majumdar, 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bakterium	Abbau methylverzweigter Seitenketten	Latza, 1999
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Bakterium	Abbau von Steroidseitenketten	Kieslich, 1984
<i>Rhodococcus sp.</i>	Bakterium	Labdan-Transformation	Lin und Rosazza 1998
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Talaromyces emersonii</i>	Deuteromycet	Abbau von Steroidseitenketten	Mahato und Majumdar, 1993
<i>Thelebolus caninus</i>	Hefe	verwandt mit Hyphozyma (Abbau von Sclareol zum "Diol")	Persön. MitteilungCBS
<i>Thelebolus microsporus</i>	Hefe	verwandt mit Hyphozyma (Abbau von Sclareol zum "Diol")	Persön. MitteilungCBS
<i>Thelebolus psychrophilus</i>	Hefe	verwandt mit Hyphozyma (Abbau von Sclareol zum "Diol")	Persön. MitteilungCBS
<i>Thelebolus stercoreus</i>	Hefe	verwandt mit Hyphozyma (Abbau von Sclareol zum "Diol")	Persön. MitteilungCBS
<i>Trametes hirsuta</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	Janssens et al., 1995
<i>Trametes suaveolens</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese	Janssens et al., 1995
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomycet	Terpen-Biosynthese (Gattung)	Janssens et al., 1995

2.1.1.2 Überprüfung der Screeningmethode mit *Hyphozyma roseoniger*

Zur Überprüfung der Screeningmethode wurde der für die Transformation von Sclareol zum "Diol" bekannte Hefe-Stamm *Hyphozyma roseoniger* CBS 214.83 (FARBOOD, 1989) gemäß den gewählten Screeningbedingungen (siehe 4.3.1.2) als Referenzstamm mitgeführt. Das Transformationsprodukt "Diol" konnte in der aufgearbeiteten Sammelprobe eindeutig nachgewiesen werden. Abbildung 2-1 zeigt das Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse.

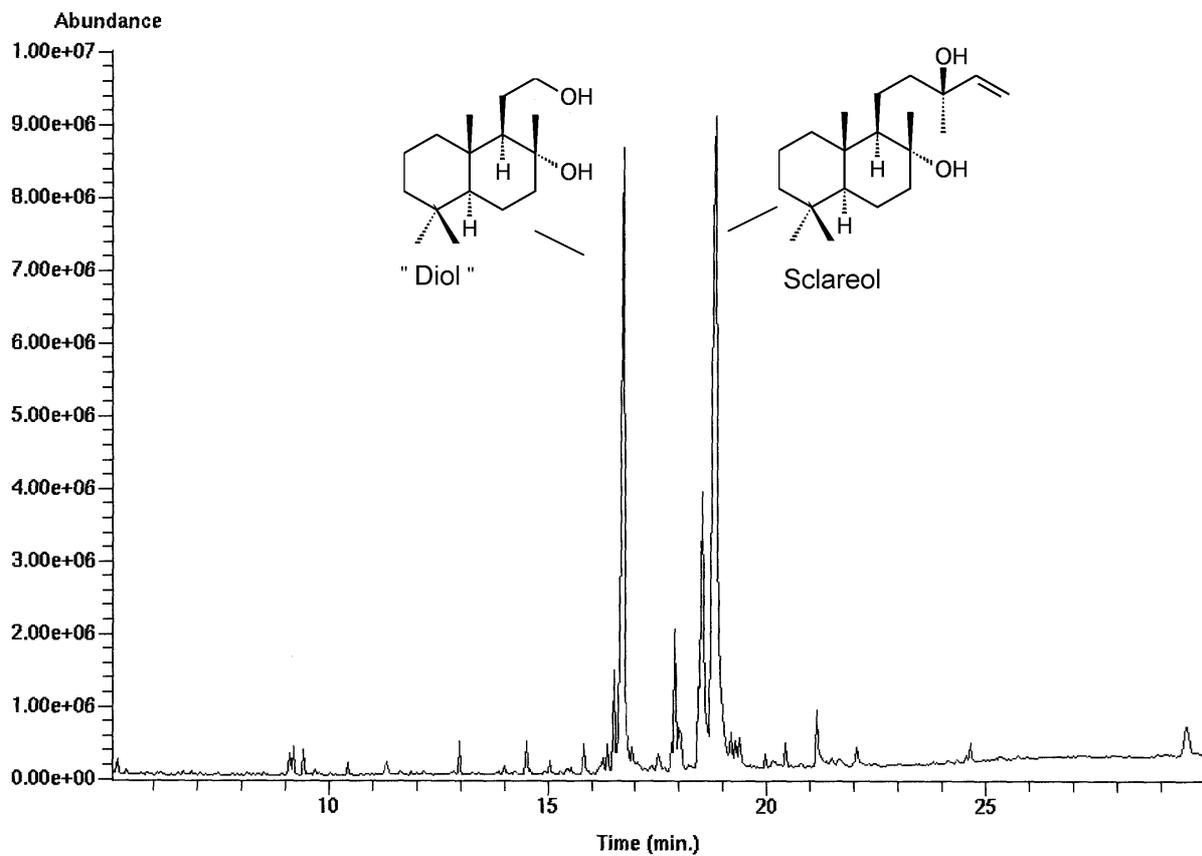


Abb. 2-1 GC-Chromatogramm der Biotransformation von Sclareol durch *Hyphozyma roseoniger*

2.1.1.3 Substrattoxizität

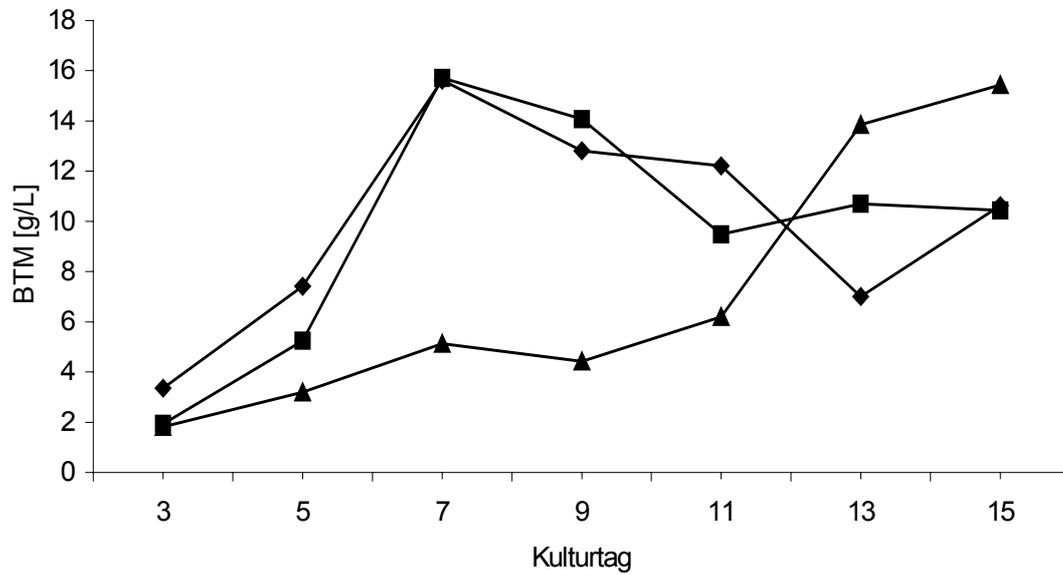
Sclareol ist als Wachstumshemmer von Pilzen sowie als Substanz mit einer hohen antimikrobiellen Aktivität beschrieben (BAILEY et al., 1974; ULUBULEN et al., 1994). Zur Überprüfung der Substrattoxizität im vorliegenden Screening wurden die durch die Bestimmung der Trockenmassen erstellten Wachstumskurven der Pilze und Hefen herangezogen. Bei den Bakterien dienten die am Tag der Probenahme bestimmten Trockenmassen als Beurteilungsgrundlage für die Substrattoxizität (siehe 4.3.1.3). Für jeden Stamm wurde eine Kultur ohne Substratzusatz, eine Kultur unter ausschließlicher Zugabe des Emulgators Tween 80 und eine Kultur unter Zugabe von mit Tween 80 emulgiertem Sclareol geführt (siehe 4.3.1.3). Der Vergleich der jeweils erstellten Wachstumskurven lässt folgende Tendenzen bei Anwesenheit von Sclareol erkennen:

- Das Wachstum des Stammes ist verzögert. Die maximalen Biomassen der Ansätze ohne Sclareol werden jedoch erreicht (29 Stämme).
- Der Zusatz von Substrat bedingt eine verringerte Bildung von Biomasse (2 Stämme).
- Nach Zugabe des Substrats erfolgt kein weiteres messbares Wachstum der Kultur (*Lepista irina*, *Lentinus lepideus*, *Pleurotus sapidus*).
- Die Supplementierung mit Sclareol hat keine Auswirkungen auf das Wachstum (15 Stämme).

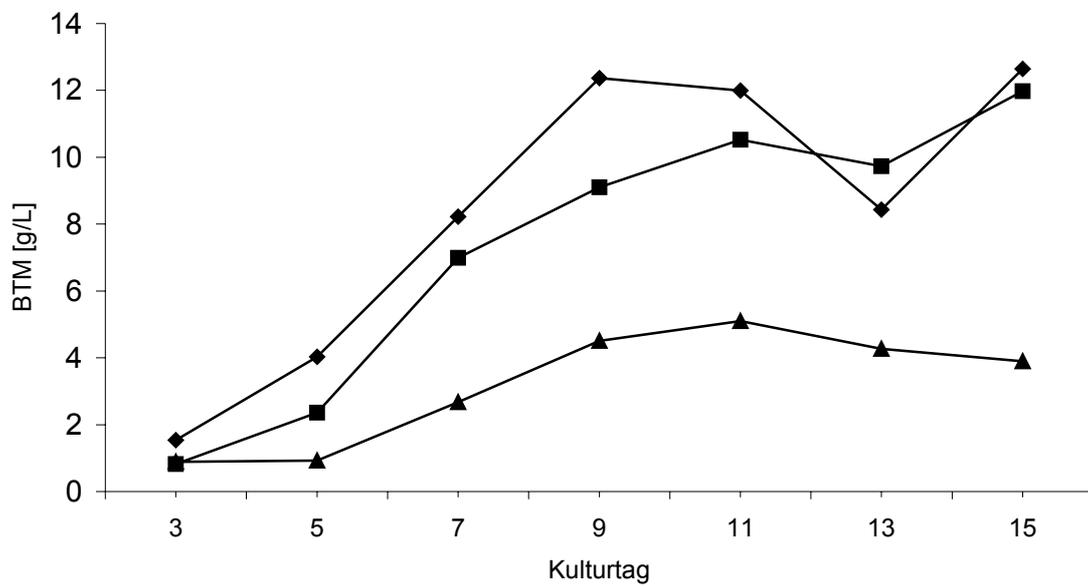
Für jeden der genannten Fälle sind in Abbildung 2-2 exemplarisch die Wachstumskurven eines der betreffenden Stämme aufgeführt.

Das Wachstum der eingesetzten Bakterienstämme wurde durch die Anwesenheit von Sclareol in keinem Fall beeinträchtigt.

Verzögertes Wachstum *Pleurotus eous*



Verringertes Wachstum *Marasmius scorodoni*



—◆— ohne Zugabe —■— mit Tween 80 —▲— mit Sclareol-Emulsion

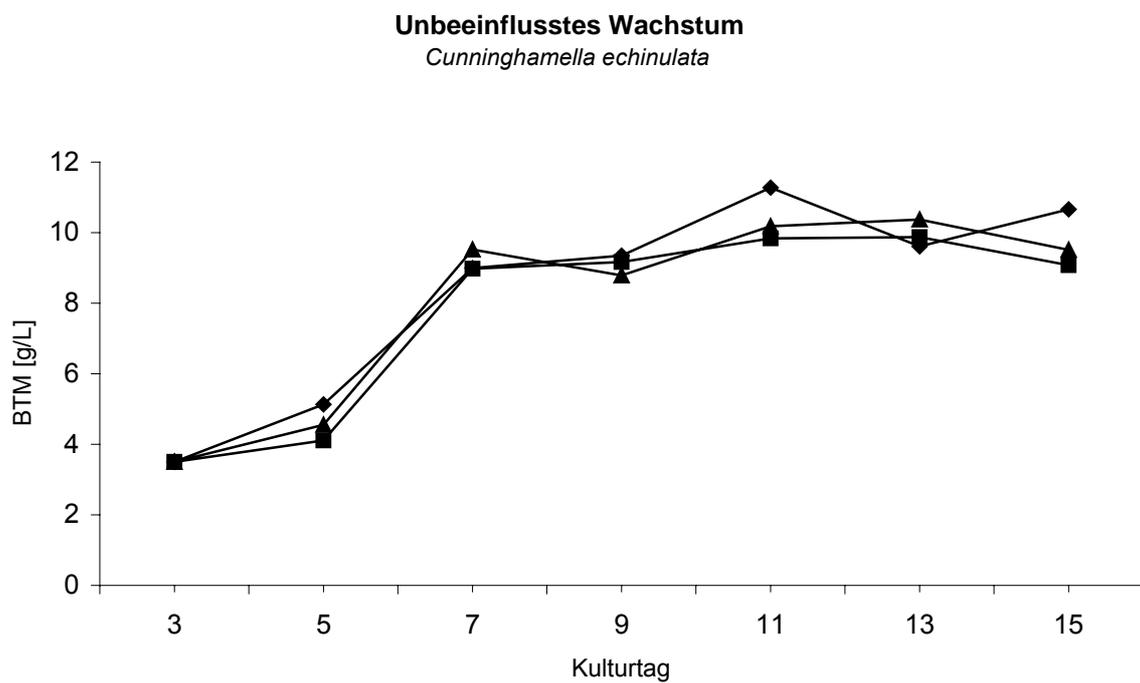
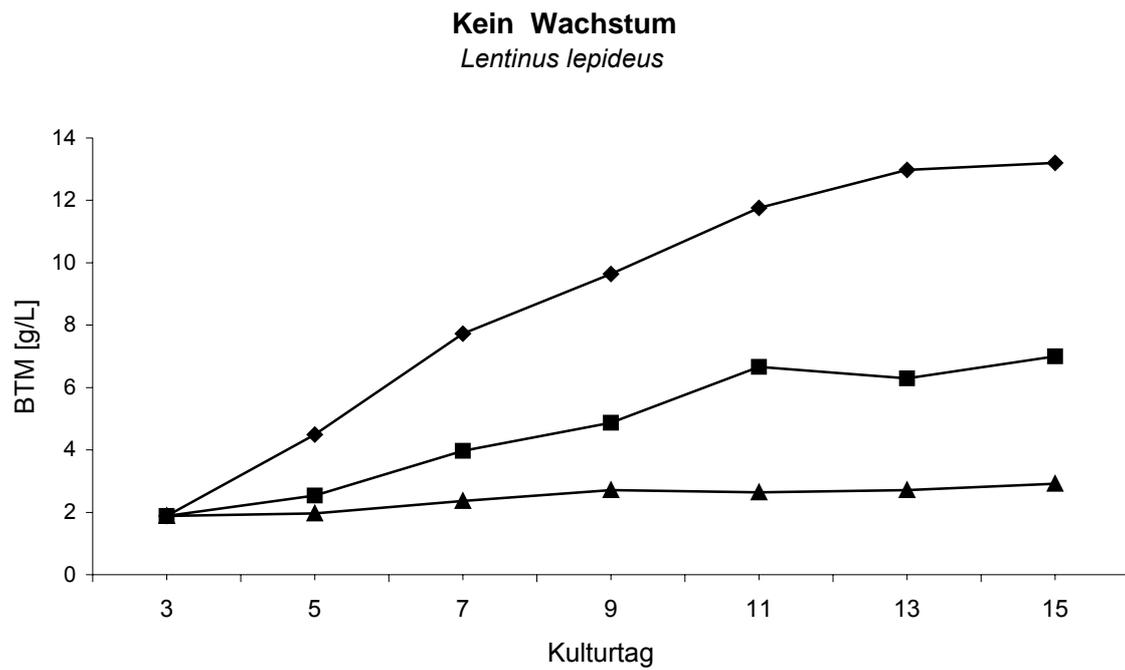


Abb. 2-2

Wachstum von Mikroorganismen in Anwesenheit von Sclareol am Beispiel von *Pleurotus eous*, *Marasmius scorodoni*, *Lentinus lepideus* und *Cunninghamella echinulata*

2.1.1.4 Sclareoltransformation

Von den 56 getesteten Mikroorganismen waren 13 Stämme zu einer Transformation des Sclareols in der Lage (Tab. 2-2). Transformationsprodukte wurden sowohl bei Bakterien als auch bei Ascomyceten, Basidiomyceten und Zygomyceten nachgewiesen. Als besonders effektive Sclareol-Transformierer erwiesen sich *Cunninghamella echinulata* und *Trametes versicolor*. In den Proben dieser beiden Stämme wurden jeweils 8 Abbauprodukte des Sclareols nachgewiesen (Tab. 2-2; Abb. 2-3). Der Substratabbau war infolge der gewählten Screeningmethode (Sammelproben) nicht quantifizierbar. In den Chromatogrammen von *Cunninghamella echinulata* und *Trametes versicolor* war jedoch kein Sclareol mehr nachweisbar. Das eingesetzte Sclareol wurde durch diese beiden Stämme schon bis zum Zeitpunkt der ersten Probenahme vollständig abgebaut.

Tab. 2-2 Sclareol-transformierende Mikroorganismen

Art	Anzahl der Transformationsprodukte
<i>Arthrobacter simplex</i>	1
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	3
<i>Chaetomium globosum</i>	5
<i>Cunninghamella echinulata</i>	8
<i>Cyathus striatus</i>	2
<i>Lentinellus cochleatus</i>	4
<i>Penicillium italicum</i>	2
<i>Phellinus igniarius</i>	6
<i>Phellinus pini</i>	3
<i>Pleurotus eous</i>	3
<i>Rhodococcus sp.</i>	2
<i>Trametes suaveolens</i>	4
<i>Trametes versicolor</i>	8

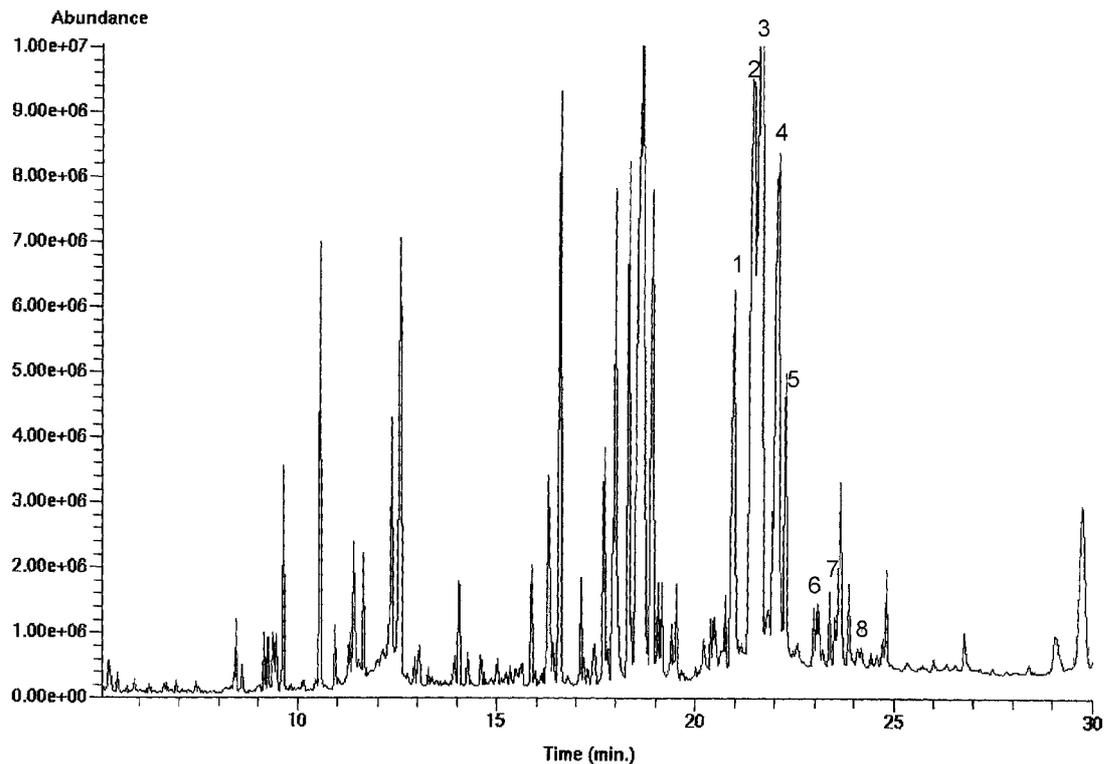


Abb. 2-3 GC-Chromatogramm der flüchtigen Produkte aus der Biotransformation von Sclareol mit *Cunninghamella echinulata* (Sclareol ist vollständig abgebaut)

2.1.1.5 Identifizierung der Transformationsprodukte

Die gezielte Suche nach den Zielverbindungen "Diol", Sclareolid und Ambrox war durch die Auswertung im SIM (single ion monitoring)-Modus möglich. Zur Identifizierung wurden Massenspektren und Retentionszeiten der Referenzsubstanzen herangezogen.

"Diol", Sclareolid und Ambrox wurden in keiner der Proben der getesteten Stämme nachgewiesen. Die Nachweisgrenze von Sclareolid und Ambrox wurde zu $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bestimmt (siehe 4.3.1.1). Auch andere Transformationsprodukte, die aus einem Abbau der Seitenkette des Sclareols resultieren, wurden nicht identifiziert.

Die massenspektrometrische Identifizierung der detektierten Transformationsprodukte (siehe 2.1.1.4) war mittels Elektronenstoßionisation (EI) auf Grund der starken Fragmentierung der Moleküle nicht möglich. Zur Detektion der Molekülonen wurden MS-Analysen unter chemischer Ionisation (CI) durchgeführt. Hierbei wurden drei Produkte mit den Retentionszeiten 20,892 (Produkt A), 21,460 (Produkt B) und

21,997 (Produkt C) nachgewiesen. Die Produkte A und B wurden in den Proben aller Sclareol-transformierenden Stämme gefunden (Ausnahme war *Arthrobacter simplex*, hier wurde nur Produkt A nachgewiesen). Produkt C wurde ausschließlich von *Cunninghamella echinulata* gebildet. Abbildung 2-4 zeigt das Massenspektrum von Produkt A. Die Massenspektren der Produkte B und C wiesen ebenfalls die für die Identifizierung relevanten Massen m/z 325, 307, 289 und 271 auf.

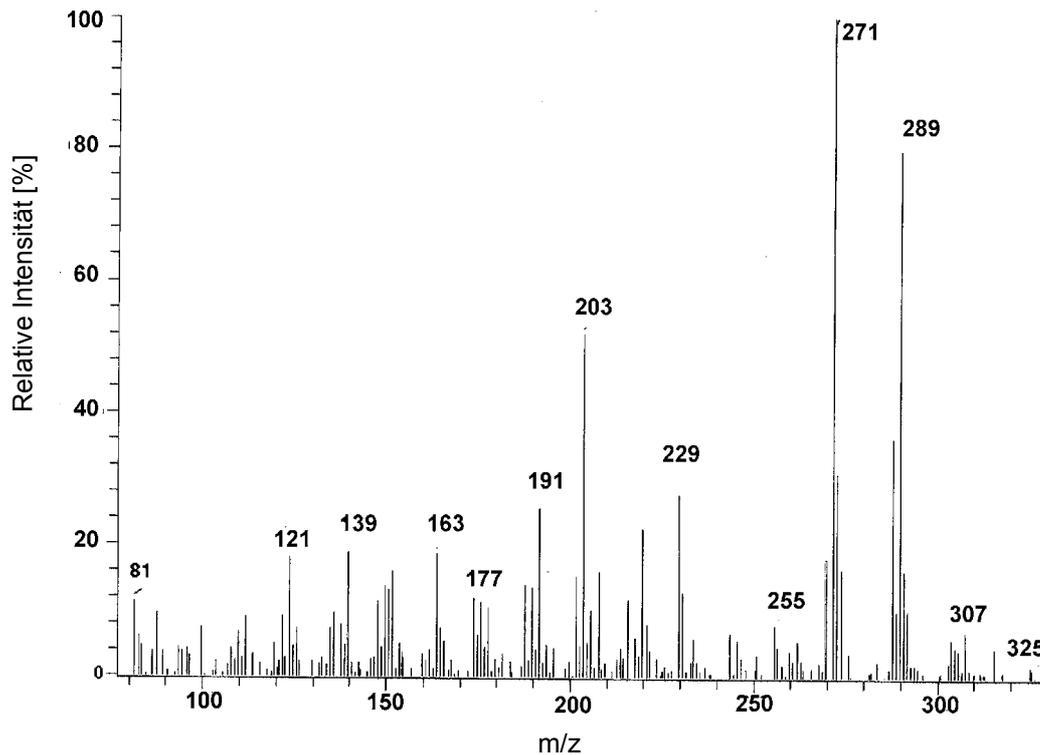


Abb. 2-4 Massenspektrum eines Sclareol-Transformationsproduktes

Die Massenspektren der drei Produkte deuten auf monohydroxylierte Sclareolderivate hin. Das Molekülion ($MH^+ = 325$) stimmt mit der empirischen Formel $C_{20}H_{37}O_3$ überein und die Fragmentionen $m/z = 307, 289, 271$ weisen auf eine dreifache Eliminierung von Wasser hin.

Zur Aufklärung der Position und Stereochemie der eingeführten Hydroxylgruppen sowie für die Identifizierung der anderen im EI-Modus nachgewiesenen Transformationsprodukte wären weitere Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie nötig. Auf diese wurde jedoch im Hinblick auf die primäre Zielsetzung des Screenings, der biotechnologischen Gewinnung von Intermediaten für die Synthese von Ambrox, verzichtet. Da Sclareol olfaktorisch inaktiv ist, konnte zudem davon

ausgegangen werden, dass die hydroxylierten Transformationsprodukte auf Grund ihrer noch geringeren Flüchtigkeit ebenfalls geruchslos sind und damit eine Verwendung als Aromastoffe ausgeschlossen war. Eine weitere Identifizierung erschien daher nicht sinnvoll.

2.1.2 Screening von Naturisolaten

2.1.2.1 Isolierung Sclareol-abbauender Mikroorganismen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Mikroorganismen wurden Bodenproben sowie Blätter und Blüten der Sclareol produzierenden Pflanze *Salvia Sclarea* L. verwendet. Tabelle 2-3 zeigt eine Übersicht über die Orte der Probenahme einschließlich der zugehörigen Kriterien für deren Auswahl.

Tab. 2-3 Orte für die Entnahme von (Boden-) Proben zur Isolierung Sclareol-abbauender Mikroorganismen

Ort der Probenahme	Auswahlkriterium
Wiesenboden	hohe Populationsdichten ausgeprägte Artenvielfalt
Kiefernwald	
Laubwald	
Kompost	
Teichufer	
Parkplatz	Xenobiotika-abbauende, an artfremde Substrate angepasste Mikroorganismen
Straßenrand	
Kanalisationssystem	
Blätter und Blüten von <i>Salvia Sclarea</i> L.	Sclareol-tolerante Mikroorganismen

Die Anreicherung möglicher Sclareol-abbauender Bakterien erfolgte durch die Kultivierung der aus den Proben isolierten Mischpopulationen auf Selektivnährböden (siehe 4.2.3). Neben einem Grundmedium aus Mineralstoffen war auf der Oberfläche verteiltes Sclareol einzige Kohlenstoffquelle (Sclareolagar B). Um die Bioverfügbarkeit des bei Raumtemperatur festen und zudem wasserunlöslichen Substrats zu steigern, wurden zusätzlich für jede Probe Agarplatten mit emulgiertem Sclareol verwendet (Sclareolagar A). Das hiermit einhergehende Risiko der Anreicherung von Mikroorganismen die den Emulgator als Kohlenstoffquelle nutzen,

sollte durch die Verwendung des synthetischen Emulgators Triton X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) minimiert werden. Die Herstellung von Reinkulturen erfolgte durch Verdünnungsausstriche einzelner Kolonien. Die nach 4.2.4.2 angesetzten Submers-Vorkulturen dienten sowohl der Inokulation der experimentellen Kulturen als auch der Herstellung von Gefrierkulturen für die Langzeitlagerung der Bakterien. Durch die Verwendung derselben Vorkultur für Screening und Gefrierkulturen wurde die Lagerung der tatsächlich gescreenten Mikroorganismen gewährleistet. Zusätzlich wurden die Bakterien in periodischen Abständen auf neue Agarplatten überimpft. Ein Wachstum von Mikroorganismen war auf den Agarplatten aller Proben (sowohl Sclareolagar A als auch Sclareolagar B) zu beobachten.

2.1.2.2 Transformationsprodukte

Die Kultivierung und das Screening der isolierten Bakterien wurde nach 4.3.1.4 durchgeführt. Nach der Aufarbeitung der von den Bakterienzellen befreiten Kulturmedien mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion wurden die Proben gaschromatographisch und massenspektrometrisch auf Transformationsprodukte des Sclareols untersucht.

In der Probe eines aus Teichschlamm isolierten Mikroorganismus (Sclareolagar B) wurde ein Abbauprodukt des Sclareols nachgewiesen und mit Hilfe von Referenzspektren aus der Literatur (WULFSON et al., 1966) als Sclareoloxid identifiziert. Sclareoloxid resultiert aus dem Abbau der Seitenkette des Sclareols unter Eliminierung von zwei Kohlenstoffatomen. Das Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse sowie das Massenspektrum des gefundenen Transformationsproduktes zeigen die Abbildungen 2-5 und 2-6.

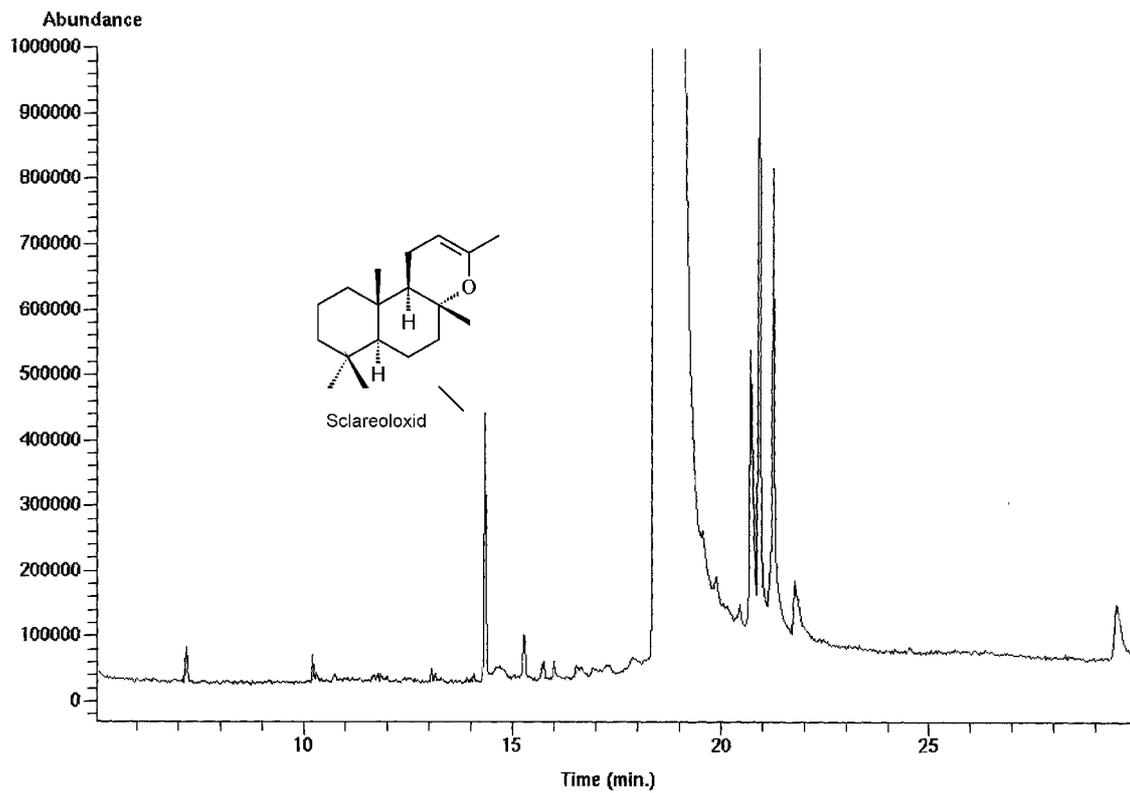


Abb. 2-5 GC-Chromatogramm der Biotransformation von Sclareol zu Sclareoloxid durch einen aus Teichschlamm isolierten Mikroorganismus

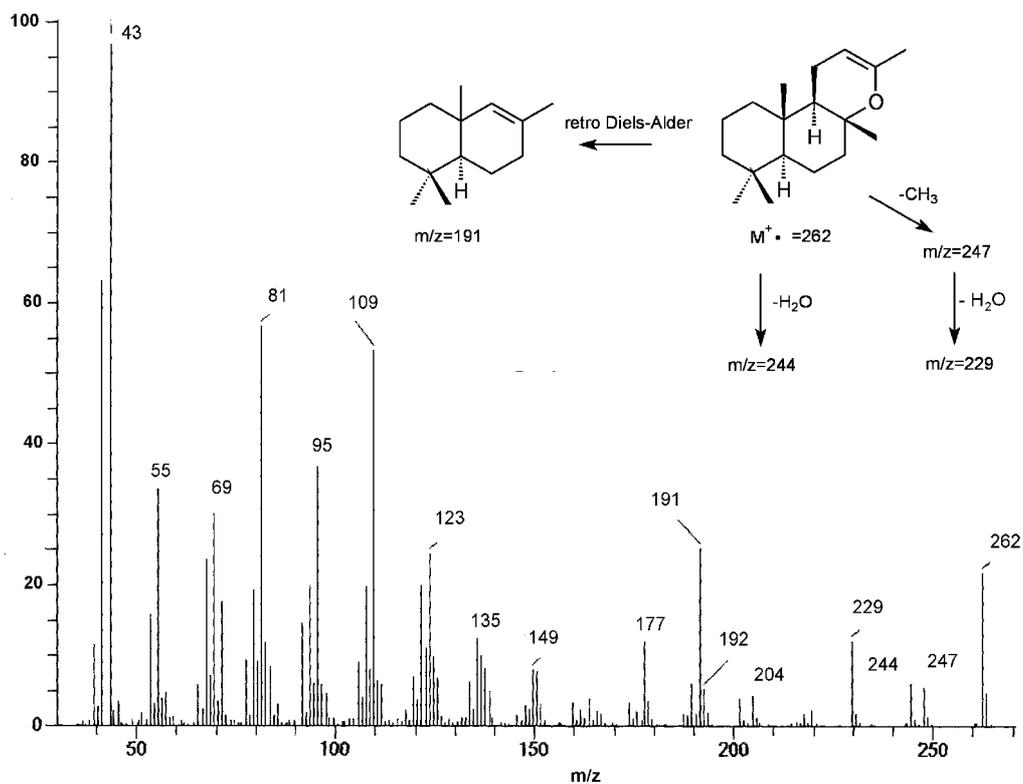


Abb. 2-6 Massenspektrum von Sclareoloxid

Die Biotransformation wurde zweimal reproduziert. Durch die Erhöhung der Zelldichte (siehe 4.2.4.2) wurde die Ausbeute an Sclareoloxid gesteigert (doppelte Peakfläche), wodurch das Vorliegen einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen wurde. In allen darauffolgenden Versuchen, die sowohl mit den Mikroorganismen von der ursprünglichen Agarplatte, den aus dem periodischen Überimpfen erhaltenen Kulturen als auch mit den Mikroorganismen aus der Gefrierkultur durchgeführt wurden, wurde kein Sclareoloxid mehr nachgewiesen.

2.1.3 Zusammenfassung

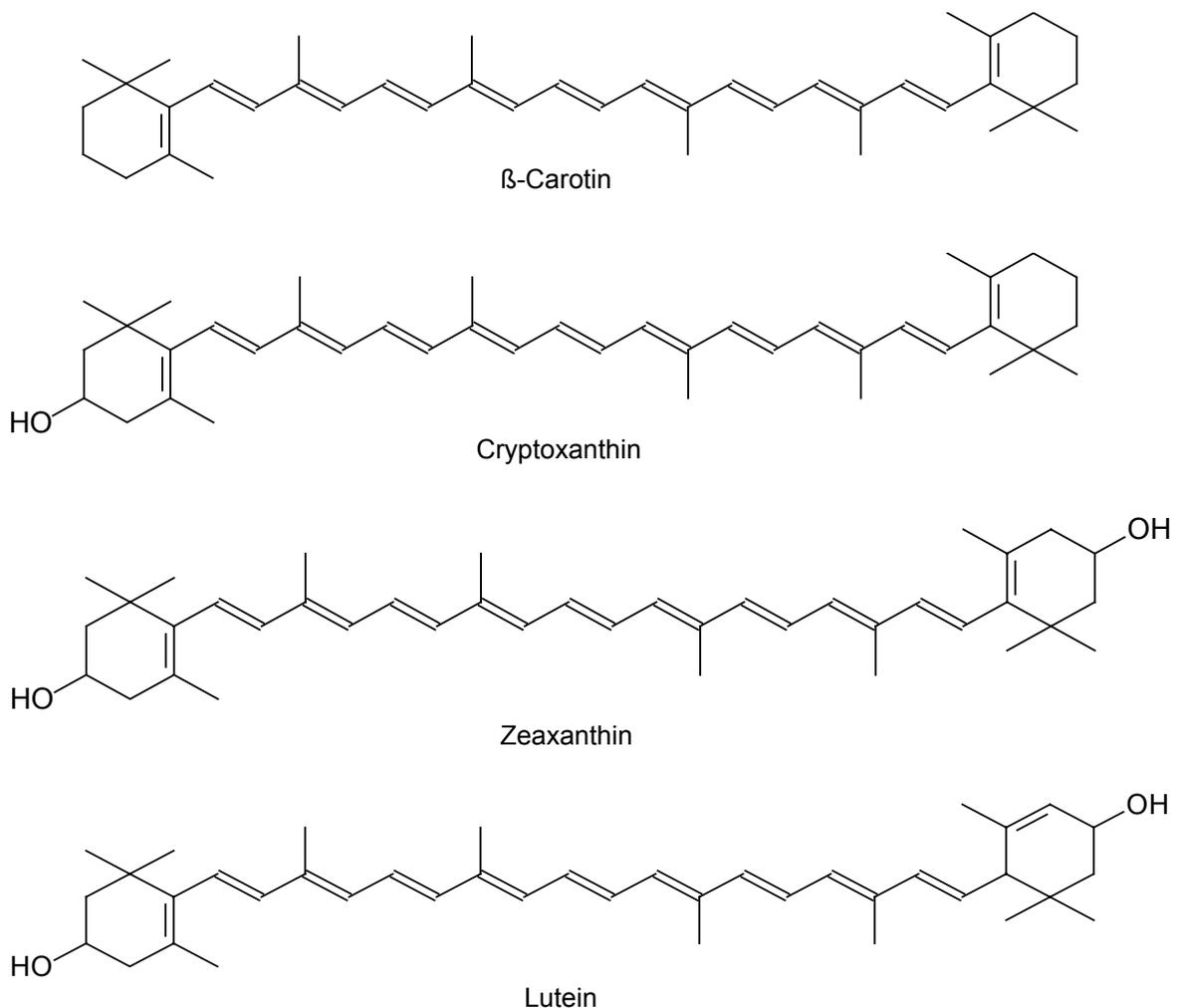
56 Mikroorganismen wurden auf ihre Fähigkeit zur Transformation von Sclareol getestet. Dreizehn Stämme waren zur Transformation des Diterpens befähigt. *Cunninghamella echinulata* und *Trametes versicolor* erwiesen sich als die effektivsten Sclareol-Transformierer. Es wurden jeweils acht verschiedene Transformationsprodukte gebildet. Sclareol wurde innerhalb von zwei Tagen vollständig abgebaut. Die Transformationsprodukte wurden mittels GC-MS teilweise als hydroxylierte Sclareolderivate identifiziert. Mittels Anreicherungskultur wurde aus einer Bodenprobe ein Mikroorganismus isoliert, der Sclareol zu Sclareoloxid abbaute.

2.2 Umsetzung von Carotinoiden mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*

2.2.1 Isolierung der Carotinoide

2.2.1.1 Eingesetzte Carotinoide

Für die Umsetzungen der Carotinoide mittels polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina* sollte eine möglichst große Bandbreite strukturell unterschiedlicher Carotinoide eingesetzt werden. Da diese zum großen Teil nicht kommerziell erhältlich sind, wurden sie aus den entsprechenden pflanzlichen Materialien isoliert. Abbildung 2-7 zeigt eine Zusammenstellung der für die Umsetzungen verwendeten Carotinoide.



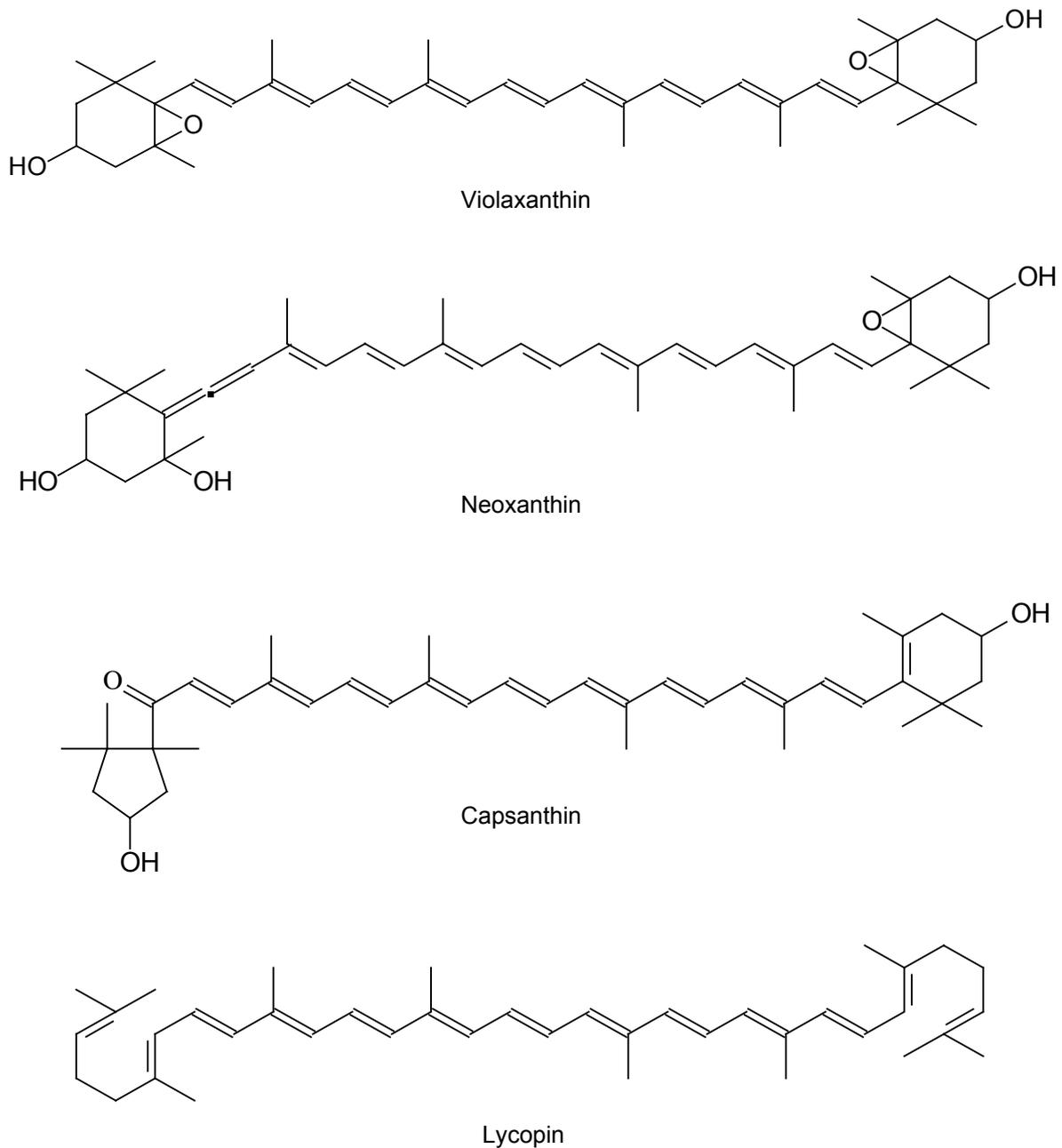


Abb. 2-7 Für die Umsetzungen mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* eingesetzte Carotinoide

2.2.1.2 Herstellung der Extrakte

Als Ausgangsmaterialien für die Isolierung der Carotinoide wurden Gemüsesorten gewählt, die einen vergleichsweise hohen Gehalt der jeweiligen Carotinoide aufweisen (siehe Tabelle 2-4). Zur Isolierung von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein wurde Spinat (*Spinacia oleracea* L.) verwendet. Capsanthin, Cryptoxanthin

und Zeaxanthin wurden aus Paprika (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) und Lycopin aus Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) isoliert.

Zur Herstellung der Extrakte wurde jeweils 1 kg des pflanzlichen Materials eingesetzt. Nach Vorzerkleinerung, Extraktion mit dem entsprechenden Lösungsmittel und gegebenenfalls Verseifung der Carotinoidester (Paprika) (siehe 4.8.1) wurden folgende Ausbeuten erhalten: 8,220 g Spinatextrakt, 0,271 g Paprikaextrakt und 0,202 g Tomatenextrakt. Mittels HPLC wurde der Gehalt der Extrakte an den jeweiligen Carotinoiden bestimmt (siehe 4.8.1.4). Tabelle 2-4 zeigt die Gegenüberstellung der ermittelten Carotinoidgehalte in den Extrakten mit Literaturdaten.

Tab. 2-4 Vergleich der in den Extrakten ermittelten Carotinoidkonzentrationen (mg pro Extrakt aus 1 kg Gemüse) mit in der Literatur angegebenen Carotinoidkonzentrationen (mg kg⁻¹ Gemüse)

Gemüse	Carotinoid	Carotinoid-Gehalt im Extrakt	Literatur (MÜLLER, 1997)
Spinat	Neoxanthin	18	1,6 ; 13,8 -25,4 ^a
	Violaxanthin	37	30,4
	Lutein	60	95,4
Paprika	Capsanthin	12	139,4
	Cryptoxanthin	0,4	10,1
	Zeaxanthin	1	22,0
Tomate	Lycopin	51	30,2 ^b ; 114,4 ^c

^a KIDMOSE et al., 2001, ^b Gewächshaustomaten, ^c Freilandtomaten

Die geringen Carotinoidkonzentrationen des Paprikaextraktes sind vermutlich auf einen unzureichenden Zellaufschluss des pflanzlichen Materials zurückzuführen. Die Konzentration der Carotinoide im Extrakt ermöglichte jedoch die Isolierung von für die Umsetzungen ausreichenden Carotinoidmengen (100 µg Cryptoxanthin, 200 µg Zeaxanthin bzw. Capsanthin je Ansatz, siehe 4.9.1) mittels präparativer HPLC in wenigen Läufen (siehe 2.2.1.5). Auf eine erneute Extraktion wurde daher verzichtet.

2.2.1.3 Isolierung der Carotinoide mittels semipräparativer HPLC

Die Trennung der Carotinoide erfolgte auf einer Nucleosil RP 18 Säule im semipräparativen Maßstab (modifiziert nach KHACHIK und BEECHER, 1988; KIDMOSE et al., 2001, siehe 4.8.2). Um eine ausreichende Auflösung der Carotinoide auch auf der semipräparativen Säule zu erzielen, wurde der Fluss von 10 mL min^{-1} auf 5 mL min^{-1} herabgesetzt. Da alle Zielcarotinoide zu Beginn der chromatographischen Trennung eluierten, konnte der HPLC-Gradient anschließend deutlich verkürzt werden, um so kürzere Trennzeiten und damit einen erhöhten Probendurchsatz zu ermöglichen (siehe 4.4.2). Für eine optimale Beladung der Säule bei ausreichender Auflösung und zugleich guten Produktausbeuten wurden Lösungen der Extrakte in folgenden Konzentrationen hergestellt: Spinatextrakt: 50 mg mL^{-1} Aceton, Paprikaextrakt: 15 mg mL^{-1} Aceton, Tomatenextrakt: 1 mg mL^{-1} Dichlormethan. $500 \text{ }\mu\text{L}$ dieser Lösungen wurden pro Lauf in die HPLC injiziert und die Reinheit der isolierten Carotinoide mittels analytischer HPLC überprüft (siehe 4.8.2). Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Capsanthin und Zeaxanthin wurden nahezu vollständig von den anderen Carotinoiden getrennt (Abb. 2-8, Abb. 2-9). Die HPLC-Chromatogramme des Lycopins und Cryptoxanthins zeigten noch Peaks nicht abgetrennter Carotinoide (Abb. 2-9, Abb. 2-10).

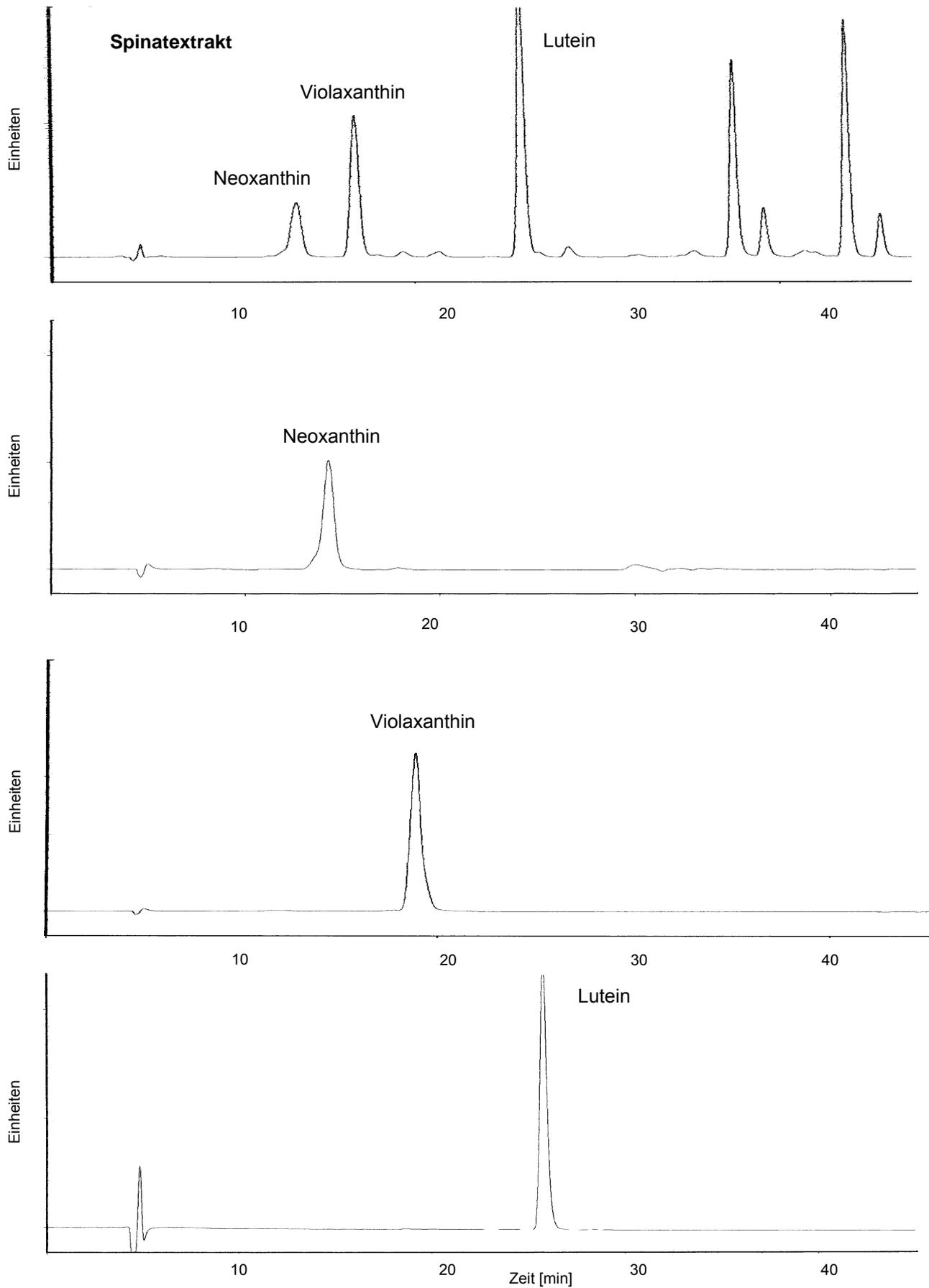


Abb. 2-8 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Spinatextrakt und der daraus isolierten Carotinoide Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein

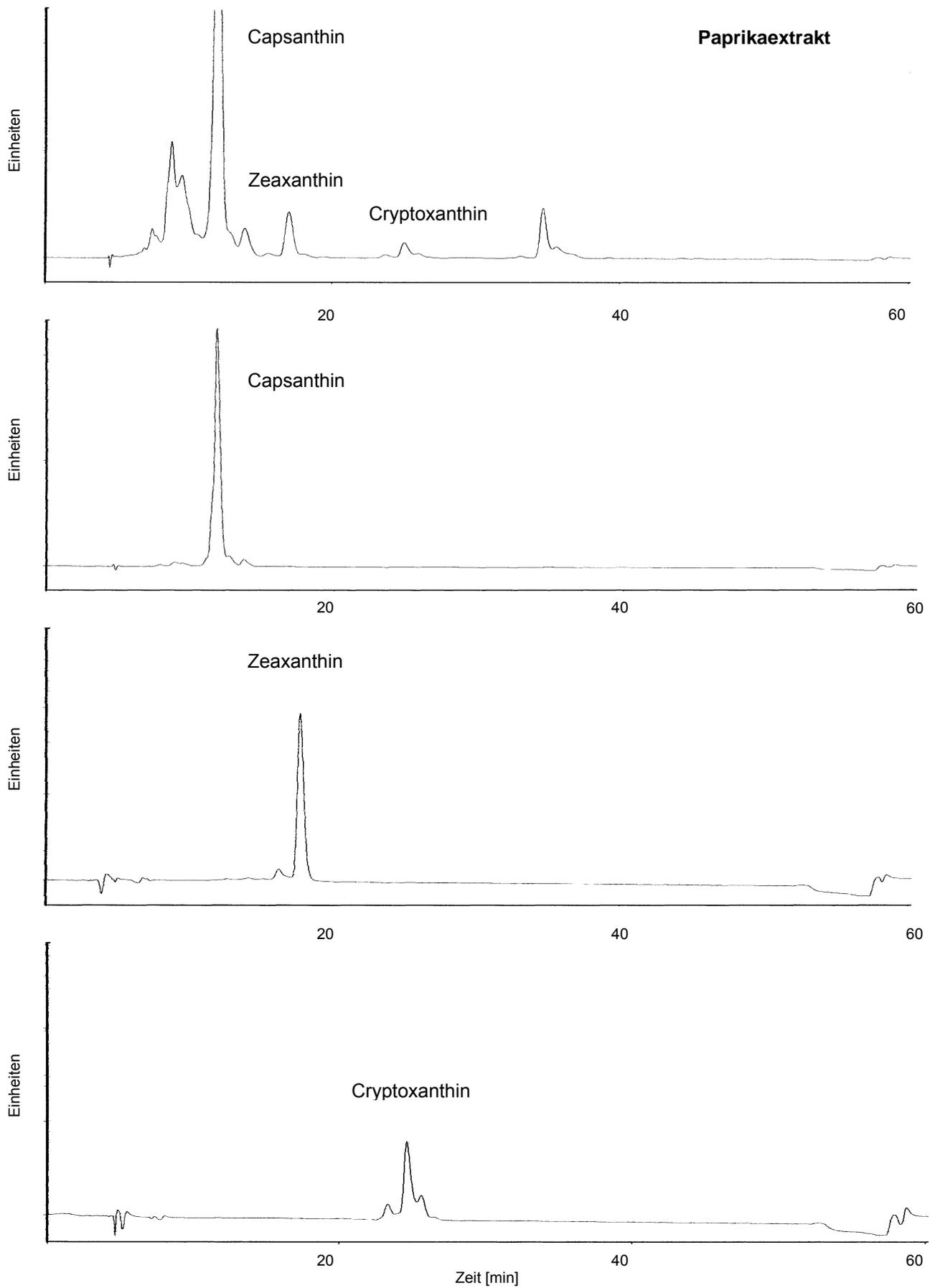


Abb. 2-9 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Paprikaextrakt und der daraus isolierten Carotinoide Capsanthin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin

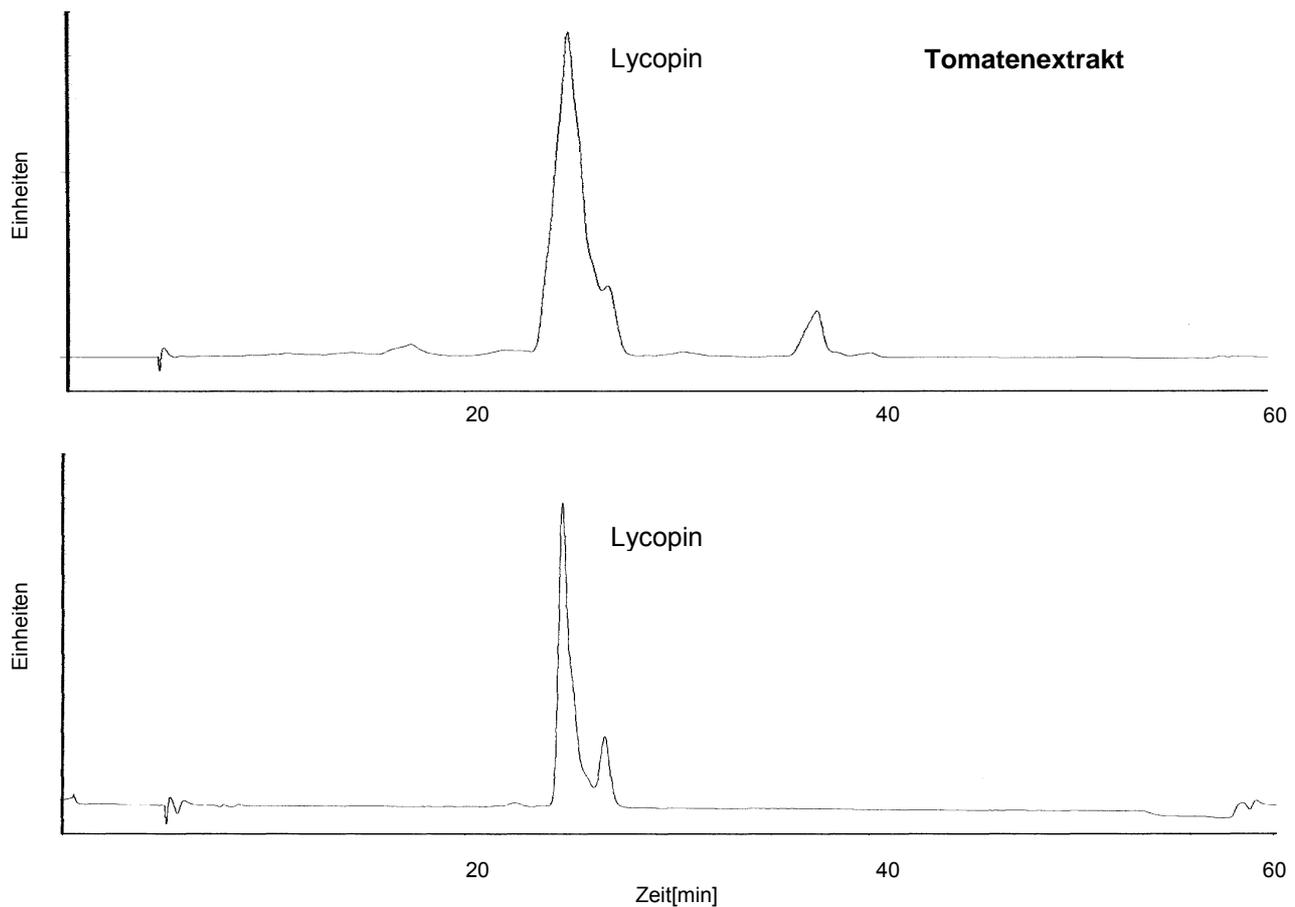
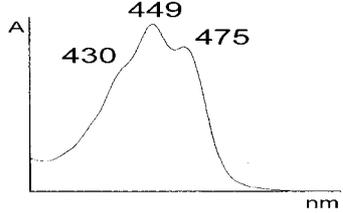
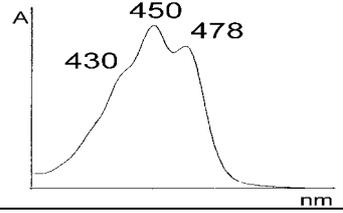
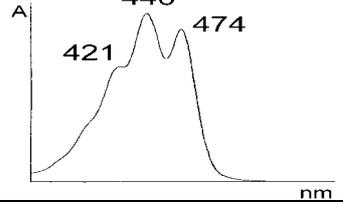
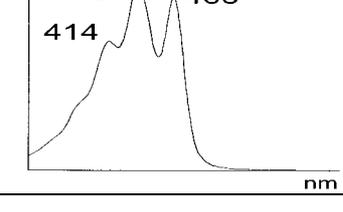
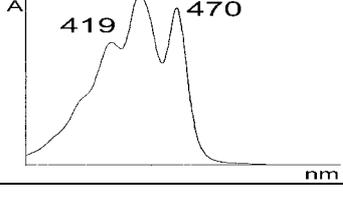
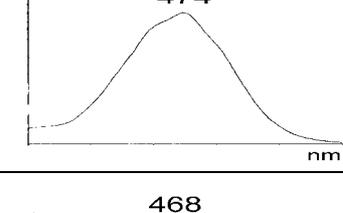
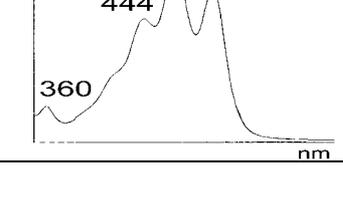


Abb. 2-10 HPLC-Chromatogramme (analytische HPLC, siehe 4.4.2.1) von Tomatenextrakt sowie des daraus isolierten Lycopins

2.2.1.4 Identifizierung der isolierten Carotinoide

Die isolierten Carotinoide wurden spektralphotometrisch identifiziert. Hierzu wurden UV/VIS-Spektren der Carotinoide in Ethanol (Xanthophylle) oder in Petrolether (Lycopin) aufgenommen und die Absorptionsmaxima mit Literaturdaten (BRITTON et al., 1995) verglichen. Tabelle 2-5 zeigt die aufgenommenen UV/VIS-Spektren im Vergleich zu den Literaturspektren.

Tab. 2-5 Spektralphotometrische Identifizierung der aus Spinat, Paprika und Tomate isolierten Carotinoide (Literaturspektren: BRITTON et al., 1995)

Spektrum	Literaturspektrum	Lösungsmittel	Carotinoid
	428 450 478	Ethanol	Cryptoxanthin
	428 450 478	Ethanol	Zeaxanthin
	422 445 474	Ethanol	Lutein
	415 439 467	Ethanol	Neoxanthin
	419 440 470	Ethanol	Violaxanthin
	476	Ethanol	Capsanthin
	446 472 503	Petrolether	Lycopin

2.2.1.5 Quantifizierung der isolierten Carotinoide

Die Quantifizierung der isolierten Carotinoide erfolgte spektralphotometrisch unter Anwendung des Gesetzes von Lambert-Beer. Es wurden verdünnte Lösungen der Carotinoide in geeigneten Lösungsmitteln hergestellt, deren Extinktion bei den in der Literatur für das jeweilige Carotinoid angegebenen Wellenlängen gemessen wurde (siehe 4.8.3.1). Die Quantifizierung der Carotinoide mittels HPLC wurde nach 4.8.3.2 durchgeführt.

Tab. 2-6 Quantifizierung der pro HPLC-Lauf (semipräparative HPLC nach 4.8.2) aus den jeweiligen Gemüseextrakten isolierten Carotinoide, Quantifizierung mittels analytischer HPLC (siehe 4.8.3.2) und UV/VIS-Spektroskopie (siehe 4.8.3.1)

Carotinoid	HPLC	UV/VIS-Spektroskopie
	[µg]	[µg]
Neoxanthin	43	36
Violaxanthin	70	64
Lutein	130	118
Capsanthin	207	198
Cryptoxanthin	14	16
Zeaxanthin	35	29
Lycopin	92	80

Die bisherigen Umsetzungen von β -Carotin mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* wurden bei pH 3,5 - dem für die Spaltung von β -Carotin optimalen pH-Wert - durchgeführt (LANGHOFF, 2002). Neoxanthin und Violaxanthin erwiesen sich bei diesem pH-Wert als instabil. Die UV-Spektren der beiden Carotinoide nach der Umsetzung zeigten eine Auflösung der spektralen Feinstruktur. Die Umsetzungen von Neoxanthin und Violaxanthin wurden daher bei pH 5 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert war die Stabilität der beiden Xanthophylle gegeben und die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* wies noch 50 % der bei pH 3,5 maximal erreichbaren Aktivität auf (LANGHOFF, 2002). Die herabgesetzte Enzymaktivität wurde durch den Einsatz größerer Enzymmengen in den jeweiligen Assays ausgeglichen bis eine Aktivität von 2 mU pro Assay erreicht war (siehe 4.9.2.2).

2.2.2 Optimierung der Umsetzungen

Die Umsetzungen der Carotinoide wurden zunächst in Anlehnung an Langhoff (2002) mit den zellfreien Kulturmedien von *Lepista irina* durchgeführt (siehe 4.9.2.1). Die GC-Chromatogramme dieser Umsetzungen wiesen große Palmitinsäure-Peaks auf, die die Detektion der Carotinoid-Spaltprodukte erheblich erschwerten. Da die Palmitinsäure in den Chromatogrammen der mitgeführten chemischen Blindwerte, bestehend aus unbeimpftem SNL-Medium und Carotinoidlösung in wesentlich geringeren Mengen nachweisbar war, wurden Lipasen in den Kulturüberständen von *Lepista irina* vermutet, die die Esterbindung des Tween 40 (Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat) spalten. Die Vermeidung der Freisetzung der Palmitinsäure und damit die Verbesserung der Qualität der Chromatogramme sollte auf zwei verschiedenen Wegen erzielt werden: zum einen durch die Verwendung des von Lipasen nicht spaltbaren Emulgators Triton X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) und zum anderen durch die Aufreinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* unter Abtrennung der Lipasen mittels FPLC.

2.2.2.1 Vergleich der Umsetzungen bei Emulgierung mit Tween 40 und Triton X 100

Je 10 mL Kulturüberstand von *Lepista irina* wurden mit 2 mL der mit Triton X 100 hergestellten β -Carotin-Lösung bzw. mit 2 mL der mit Tween 40 hergestellten β -Carotin-Lösung versetzt und unter den Standardbedingungen inkubiert (siehe 4.9.2.3). Der Vergleich der erhaltenen GC-Chromatogramme zeigte keine Verbesserung der Chromatogramm-Qualität durch die Verwendung von Triton X 100. Das Chromatogramm der Umsetzung mit Triton X 100 zeigte vor allem im hinteren Bereich viele Peaks, die die Analytik der Carotinoid-Spaltprodukte störten. Hinsichtlich der β -Carotin-Abbauraten und Ausbeuten an β -Ionon wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. β -Carotin wurde in beiden Fällen zu 95 % abgebaut. Die Ausbeute an β -Ionon betrug bei der Umsetzung mit Tween 4,5 mol %, bei der Umsetzung mit Triton 5,2 mol %.

2.2.2.2 Umsetzungen mit aufgereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

2.2.2.2.1 Umsetzung mit (teil-)aufgereinigter polyvalenter Peroxidase

Für eine schnelle und zur Abtrennung der Lipasen möglicherweise ausreichende Aufreinigung des Enzyms wurde zunächst nur ein Reinigungsschritt durchgeführt. Als chromatographische Trennmethode wurde die Gelpermeationschromatographie (GPC) gewählt, da sich diese in vorhergehenden Versuchsreihen für die Aufreinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* als geeignet erwiesen hatte (LANGHOFF, 2002). Die auf einer analytischen Superdex 200 HR10/30 Säule entwickelte Methode (LANGHOFF, 2002) wurde in den präparativen Maßstab übertragen, um die Isolierung ausreichender Enzymmengen für die Umsetzungen zu gewährleisten (siehe 4.7.2). Das Zielenzym eluierte in zwei aufeinanderfolgenden Fraktionen unter Erhalt von 80 % der Ausgangsaktivität. Pro GPC-Lauf wurden 8 mL Enzymlösung mit einer durchschnittlichen Aktivität von 1,5 mU mL⁻¹ erhalten.

Die Umsetzung von β -Carotin mit der (teil-) aufgereinigten Peroxidase erfolgte unter standardisierten Bedingungen: 1 mL β -Carotin-Lösung (100 mg β -Carotin, 10 mg Tween 40 in 1 mL Citrat-Puffer pH 3,5) wurde mit einer Enzymmenge umgesetzt, die einer Aktivität von 2 mU entsprach (ca. 1,5 mL der GPC-Fraktionen) (siehe 4.9.2.2). Die Chromatogramme der Umsetzung mit zellfreiem Kulturüberstand und mit (teil-) aufgereinigter polyvalenter Peroxidase sind in Abbildung 2-11 gegenübergestellt. Durch die Verwendung von aufgereinigtem Enzym war eine deutliche Verbesserung der Qualität der Chromatogramme zu verzeichnen.

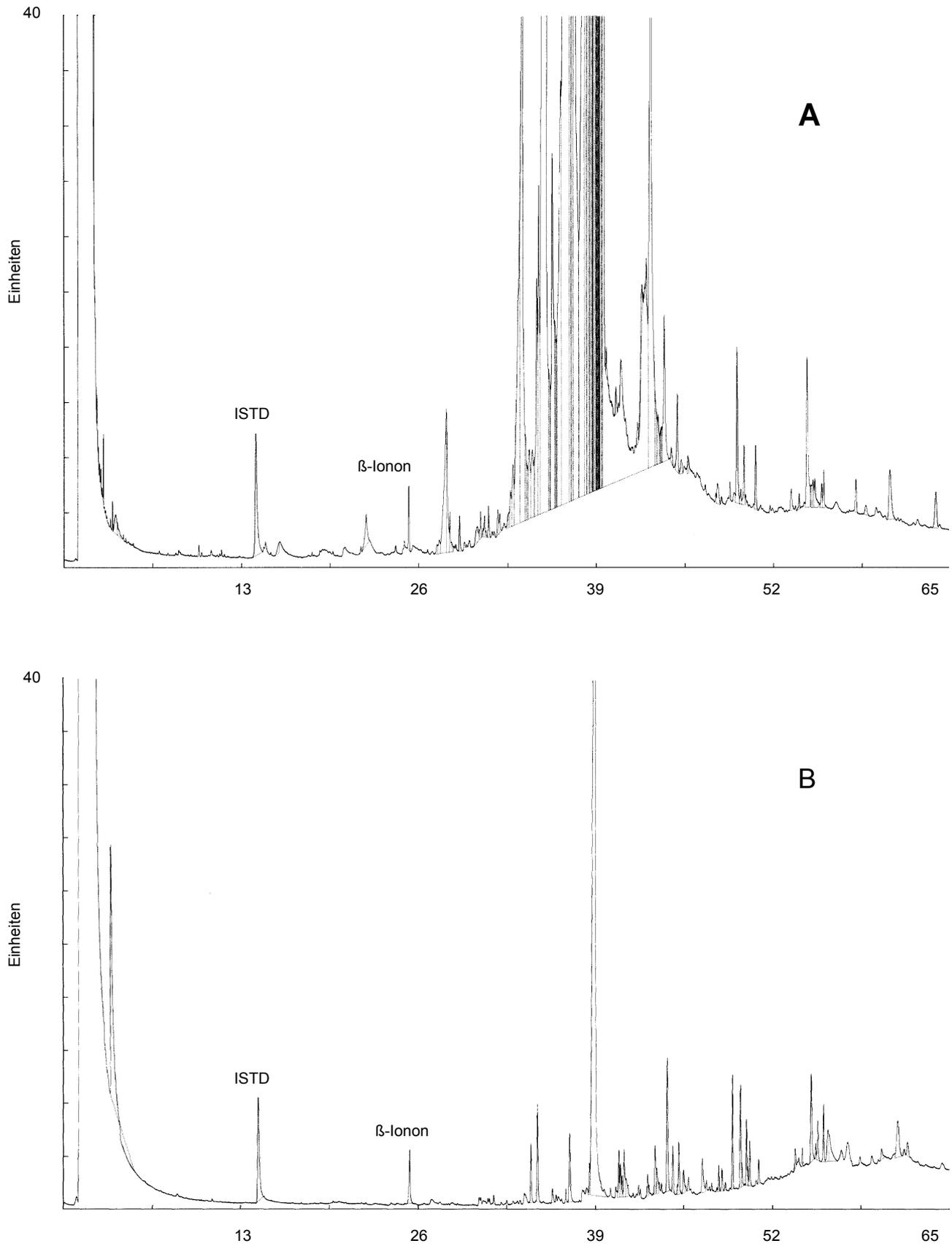


Abb. 2-11 Umsetzung von β -Carotin mit zellfreiem Kulturüberstand (A) und mittels GPC (teil-)aufgereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina* (B)

2.2.2.2 Umsetzungen mit vollständig aufgereinigter polyvalenter Peroxidase

Durch den Einsatz von vollständig aufgereinigtem Enzym sollte überprüft werden, ob sich die Chromatogramm-Qualität weiter verbessern lässt. In vorausgehenden Arbeiten wurde die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* durch die Kombination von HIC, IEC und GPC aufgereinigt (LANGHOFF, 2002). Die Aufreinigung des Enzyms zur Untersuchung der Verbesserung der Chromatogrammqualität erfolgte dagegen nur durch die beiden ersten Reinigungsschritte HIC und IEC (siehe 4.7.3). Die vollständige Abtrennung des Enzyms von anderen Proteinen wurde mittels SDS-Page (siehe 4.6) bereits nach diesen Reinigungsschritten nachgewiesen (Abb. 2-12).

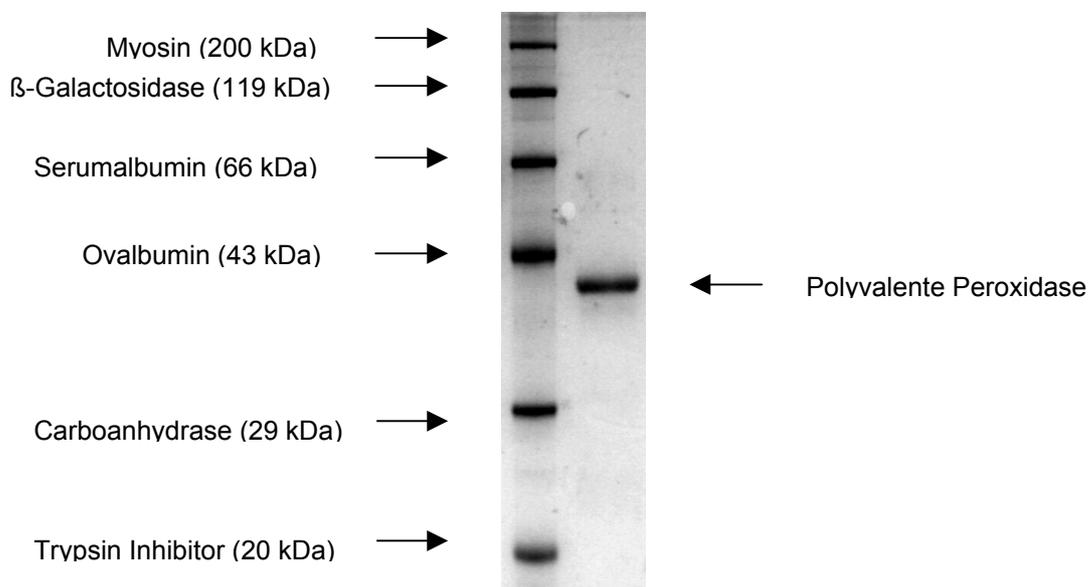


Abb. 2-12 SDS-Page der mittels HIC und IEC aufgereinigten polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*

Die Umsetzung erfolgte durch Inkubation von 100 μ L β -Carotinlösung (5 mg β -Carotin, 50 mg Tween 40 in 50 mL Puffer, siehe 4.7.1.1) mit einer Enzymmenge, die einer Aktivität von 2 mU entsprach (siehe 4.9.2.4). Das erhaltene GC-Chromatogramm war vergleichbar mit dem der Umsetzung mit (teil-)aufgereinigtem Enzym (siehe 2.2.2.1). Es wurde keine weitere Verbesserung der Chromatogramm-Qualität erzielt. Die Umsetzungen der anderen Carotinoide wurden daher im folgenden mit der mittels GPC (teil-)aufgereinigten polyvalenten Peroxidase durchgeführt.

2.2.3 Umsetzungen der Carotinoide

Die Umsetzungen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Pro Ansatz wurde eine durch Gelpermeationschromatographie aufgereinigte Enzymlösung mit einer Aktivität von 2 mU/mL eingesetzt. 100 µg des jeweiligen Carotinoids wurden pro Ansatz mit dem Enzym umgesetzt. Die Inkubation von Neoxanthin und Violaxanthin wurde auf Grund der geringen pH-Stabilität der beiden Xanthophylle bei einem pH-Wert von pH 5 durchgeführt. Die Umsetzungen der anderen Carotinoide erfolgten bei pH 3,5, dem optimalen pH-Wert für die β -Carotinspaltung durch die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina*. Zur Kontrolle jeder Umsetzung wurde jeweils ein Ansatz der Referenzsubstanz β -Carotin mitgeführt. Die Inkubation der jeweiligen Carotinoidlösung ohne Enzym diente als chemischer Blindwert (siehe 4.9.2.2).

2.2.3.1 Abbau der Carotinoide

Alle eingesetzten Carotinoide wurden von der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* abgebaut. Zwischen den Abbauraten der einzelnen Carotinoide wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Lediglich im Fall von Neoxanthin wurde eine niedrigere Abbaurate verzeichnet. Tabelle 2-7 zeigt eine Zusammenstellung der Abbauraten der einzelnen Carotinoide. Zum besseren Vergleich ist auch die relative Abbaurate, bezogen auf den β -Carotinabbau des jeweiligen Kontrollversuches, angegeben.

Tab. 2-7 Abbauraten verschiedener Carotinoide bei der Umsetzung mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* (2h, 34°C, 150 rpm)

Carotinoid	Absolute Abbaurate [%]	Relative Abbaurate ^a
Neoxanthin	71	0,75
Violaxanthin	95	1,0
Lutein	92	1,1
Capsanthin	85	1,0
Zeaxanthin	99	1,1
Cryptoxanthin	84	1,0
Lycopin	94	1,1

^a Abbaurate bezogen auf den β -Carotinabbau des jeweiligen Kontrollversuchs, dem die Zahl 1 zugeordnet wurde

2.2.3.2 Identifizierung der flüchtigen Carotinoid-Spaltprodukte

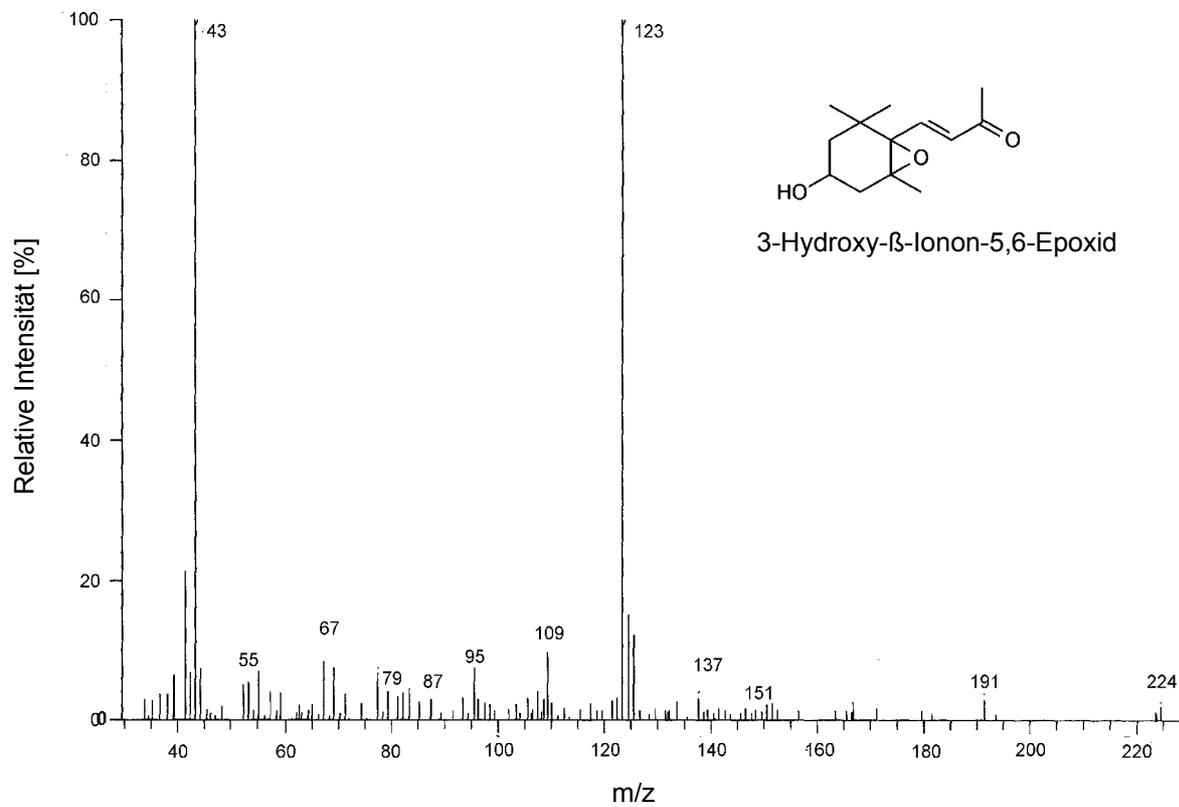
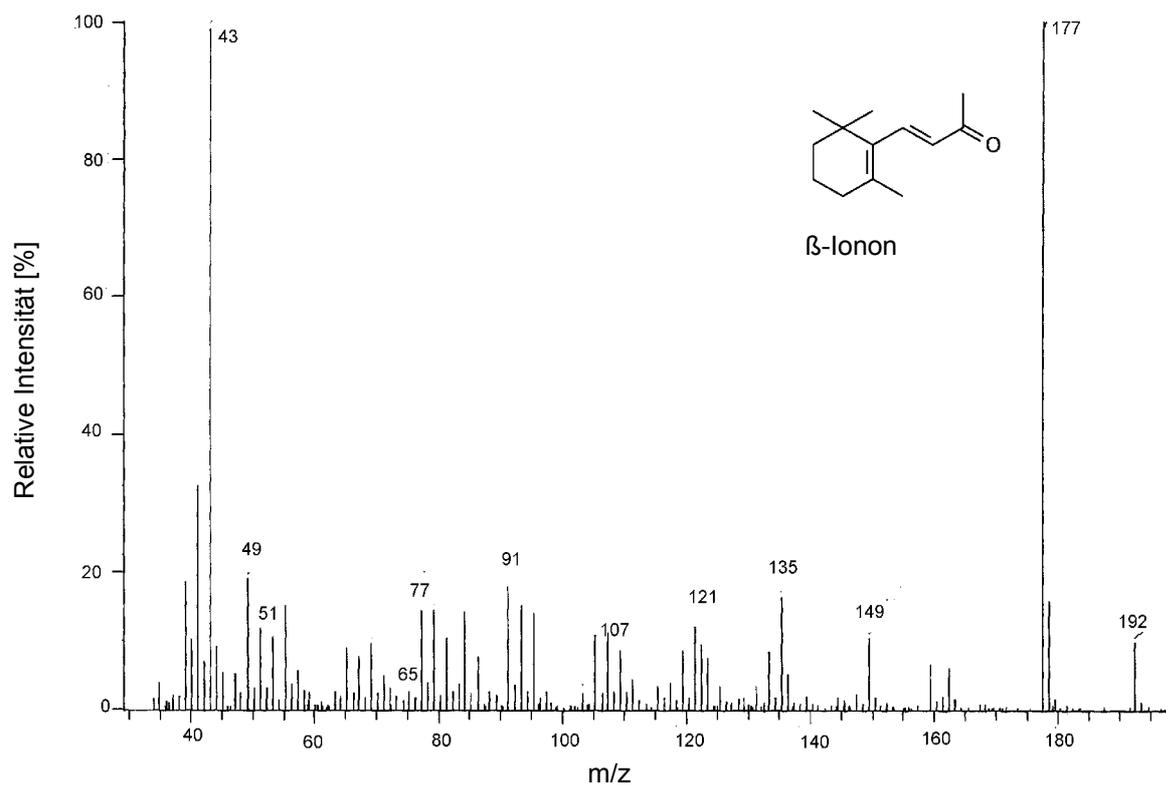
Die Untersuchung der Proben auf flüchtige Carotinoidabbauprodukte erfolgte mittels GC-FID und GC-MS. Zur gezielten Detektion von C₁₃-Spaltprodukten wurden Auswertungen der GC-MS-Chromatogramme im SIM (single ion monitoring) - Modus durchgeführt. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Massenspektren mit Literaturspektren (HOHLER, 1986). Als Spaltprodukte der jeweiligen Carotinoide wurden β -Ionon, 3-Hydroxy- β -Ionon, 3-Hydroxy- α -Ionon und 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid identifiziert (Tab. 2-8). Die hypothetischen C₁₃-Spaltprodukte des Neoxanthins (Grashüpfkerketon), des Lycopins (Pseudoionon) sowie das einen Cyclopentanring aufweisende Spaltprodukt des Capsanthins wurden nicht nachgewiesen. Auch aus der Spaltung anderer Bindungen des Carotinoidgerüsts resultierende Norcarotinoide wurden nicht detektiert. Die Nachweisgrenze von β -Ionon, dem C₁₃-Spaltprodukt des β -Carotins, das als Referenzsubstanz vorlag, wurde zu 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bestimmt. Abbildung 2-13 zeigt die Massenspektren der detektierten C₁₃-Norisoprenoide.

Tab. 2-8 Flüchtige Produkte der Umsetzung von Carotinoiden mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*

Carotinoid	Flüchtige Abbauprodukte
Neoxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid
Violaxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid
Lutein	3-Hydroxy- β -Ionon, 3-Hydroxy- α -Ionon
Capsanthin	3-Hydroxy- β -Ionon
Zeaxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon
Cryptoxanthin	β -Ionon, 3-Hydroxy- β -Ionon
Lycopin	-

Tab. 2-9 Experimentell bestimmte Kovats-Indices der nachgewiesenen C₁₃-Norisoprenoide im Vergleich zu den Kovatsindices aus der Literatur

C ₁₃ -Norisoprenoid	Kovats-Index (DB 5) (experimentell)	Kovats-Index (DB 5) (Literatur: DUQUE et al., 2002)
β -Ionon	1454	1497
3-Hydroxy- β -Ionon-epoxid	1667	1695
3-Hydroxy- β -Ionon	1679	1709
3-Hydroxy- α -Ionon	1623	-



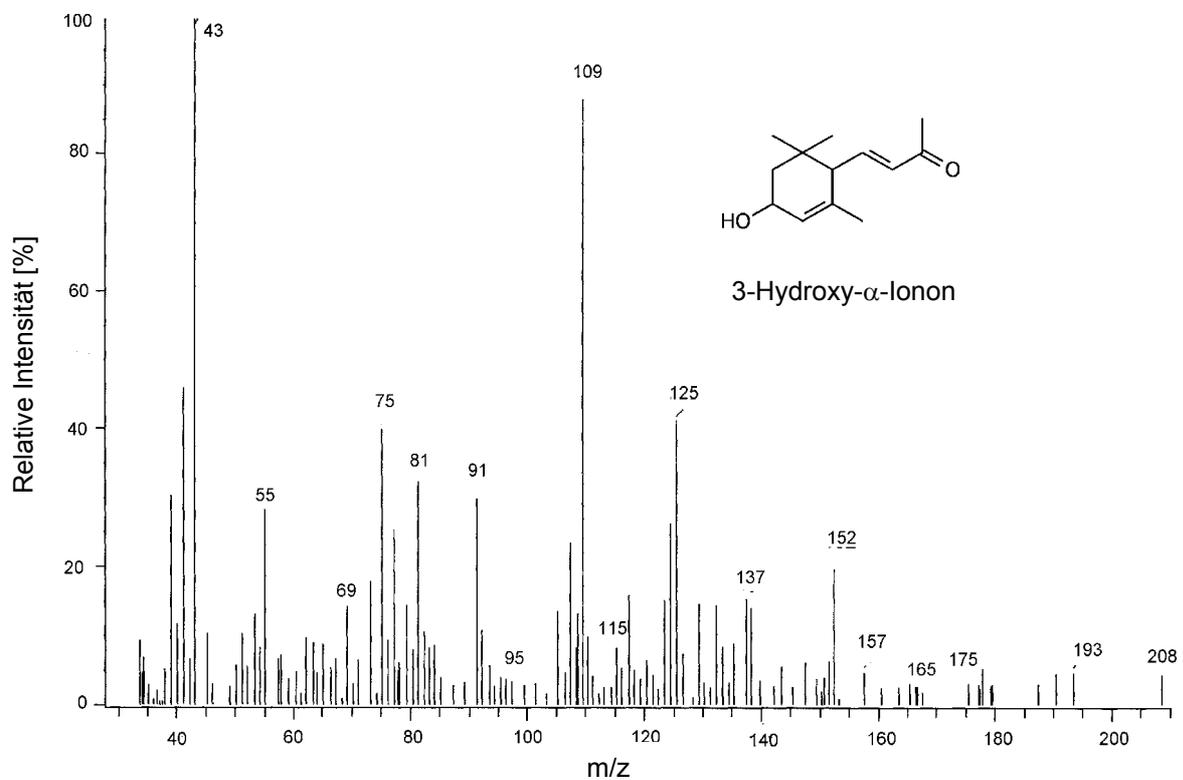
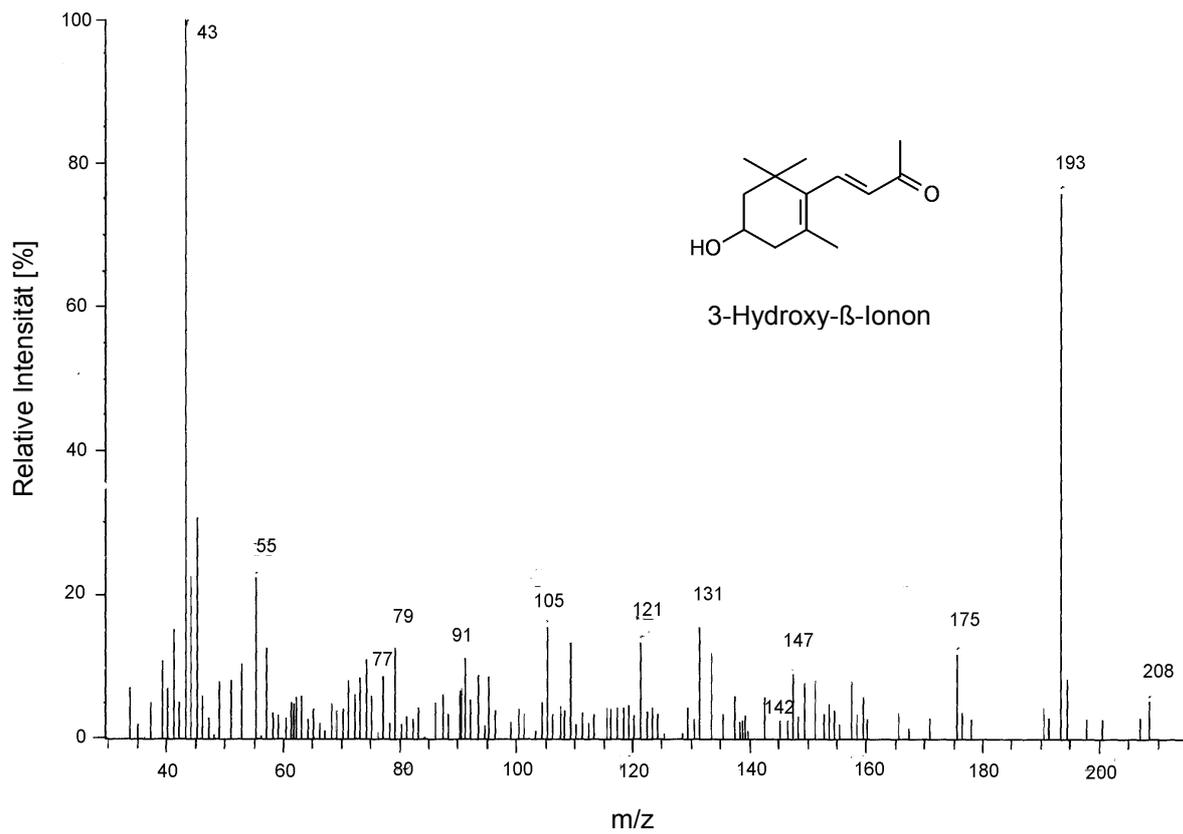


Abb. 2-13 Massenspektren der nachgewiesenen C_{13} -Norisoprenoide aus der Umsetzung von Carotinoiden mittels polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

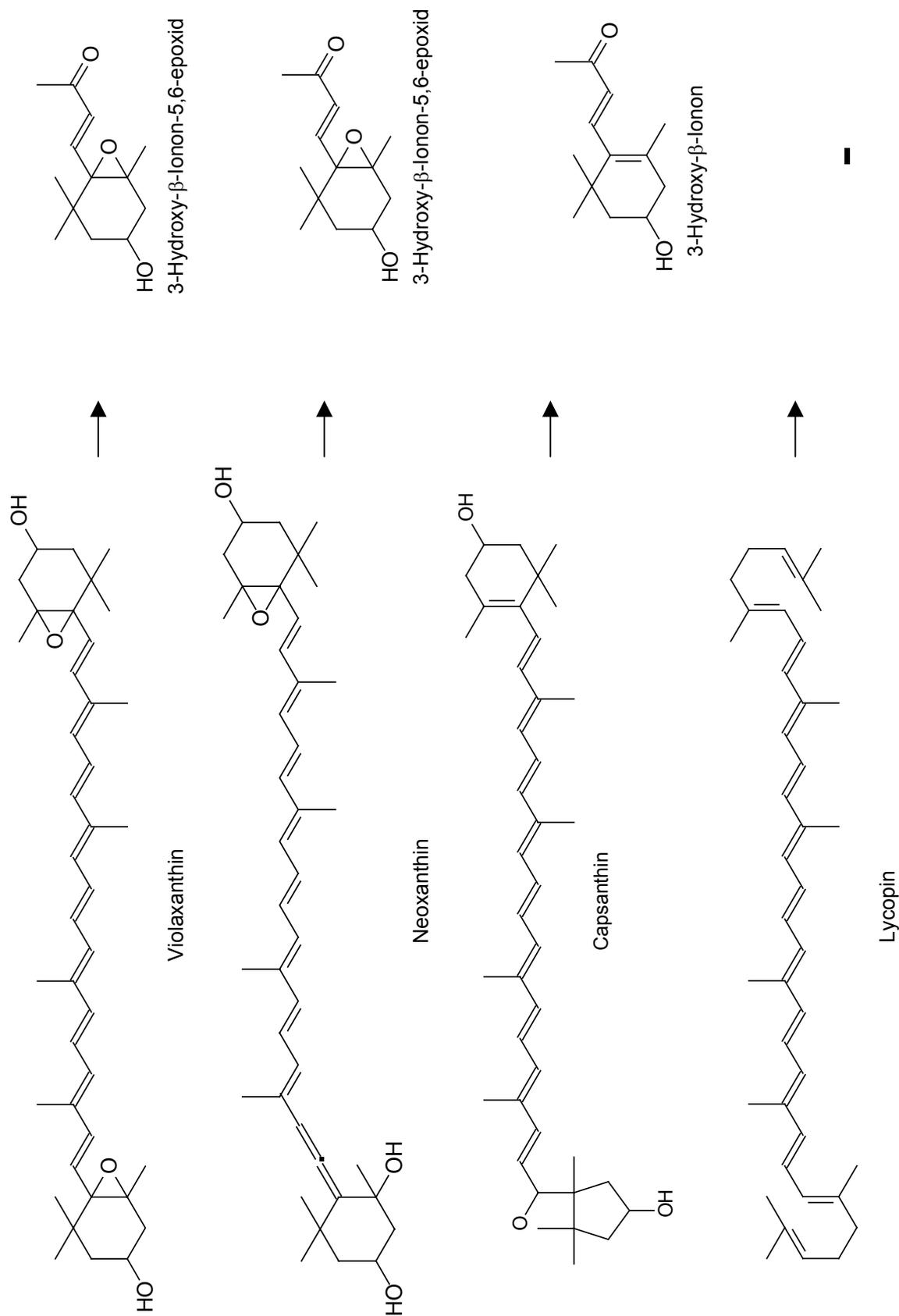


Abb. 2-14 Spaltung der eingesetzten Carotinoide mittels polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

2.2.3.3 Quantifizierung der flüchtigen Carotinoid-Spaltprodukte

Die Quantifizierung der gebildeten C₁₃-Spaltprodukte erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung von α -Terpineol als internem Standard. Tabelle 2-10 fasst die Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammen.

Tab. 2-10 Quantifizierung der flüchtigen Carotinoid-Abbauprodukte in mol% bezogen auf eingesetztes Carotinoid (Inkubation: 2h, 34°C, 150 rpm)

Carotinoid	C ₁₃ -Norisoprenoide [mol%]	β -Ionon Kontrollversuch [mol%]
Neoxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-Epoxid:	2,3
Violaxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-Epoxid:	7,8
Lutein	3-Hydroxy- β -Ionon:	8,4
	3-Hydroxy- α -Ionon:	3,8
Capsanthin	3-Hydroxy- β -Ionon:	7,8
		3,8
Zeaxanthin	3-Hydroxy- β -Ionon:	8,2
		5,3
Cryptoxanthin	β -Ionon:	8,4
	3-Hydroxy- β -Ionon:	10,5
		10,5
Lycopin	-	8,0

2.2.4 Zusammenfassung

Die Carotinoide Lycopin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Lutein, Capsanthin, Neoxanthin und Violaxanthin wurden mittels semipräparativer HPLC in ausreichenden Mengen und guter Reinheit aus pflanzlichen Materialien isoliert. Alle eingesetzten Carotinoide wurden von der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* mit Abbauraten von bis zu 99 % abgebaut. β -Ionon, 3-Hydroxy- β -Ionon, 3-Hydroxy- α -Ionon und 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid wurden als Spaltprodukte der jeweiligen Carotinoide identifiziert. Die Ausbeuten an Carotinoid-Spaltprodukten betrugen bis zu 10 mol%.

2.3 Oxidasescreening

2.3.1 Konzeption der Screeningmethode

Bei der Auswahl der Stämme für das Screening auf extrazelluläre Oxidoreduktasen wurde auf bereits durchgeführte Screenings zurückgegriffen, in denen Mikroorganismen in zellhaltigen Systemen durch die Oxidation von terpenoiden Substraten aufgefallen waren (siehe 2.1: Screening auf Sclareoltransformation und LANGHOFF, 2002). Eine Zusammenstellung der ausgewählten Mikroorganismen zeigt Tab. 2-11.

Tab. 2-11 Für das Screening auf extrazelluläre Oxidasen ausgewählte Mikroorganismen

Nr.	Art	Stamm
1	<i>Cunninghamella echinulata</i>	DSM 1905
2	<i>Cyathus striatus</i>	DSM 1652
3	<i>Lentinellus cochleatus</i>	FSU L 13-2
4	<i>Marasmius scorodonius</i>	CBS 850.87
5	<i>Phellinus pini</i>	DSM 5238
6	<i>Phellinus igniarius</i>	DSM 4818
7	<i>Pleurotus euosmus</i>	DSM 5331
8	<i>Trametes suaveolens</i>	DSM 5237
9	<i>Trametes versicolor</i>	Wag. EIK 39

Zur Induktion der Oxidase-Bildung wurden zwei experimentelle Kulturen jedes Stammes am 2. Kulturtag mit 50 µL Veratrylalkohol bzw. Toluol versetzt. Durch die Entnahme von Kulturüberstand am 4. und am 9. Kulturtag sollte eine Erfassung möglicher gebildeter Oxidasen über einen großen Bereich des Kulturverlaufes gewährleistet werden (siehe 4.3.2.1). Der Test auf extrazelluläre Oxidasen wurde mit zellfreiem Medium durchgeführt. Als Substrate wurden drei Modellsubstanzen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften eingesetzt: 3-Methyl-2-buten-1-ol (Dimethylallylalkohol, allylischer Alkohol), Limonen (cyclisches Terpen) und Thymol (Aromat) (siehe 4.3.2.2). Durch diese strukturelle Bandbreite sollten vorhandene Oxidasen effektiv erfasst werden.

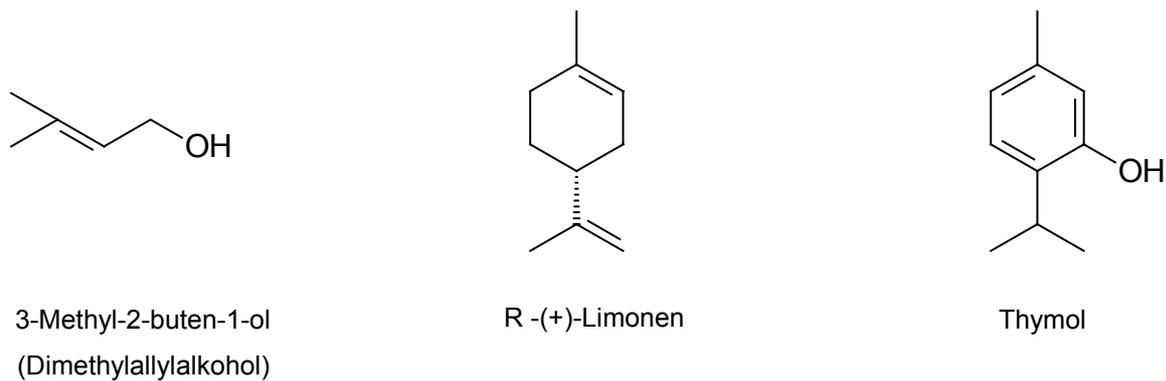


Abb. 2-15 Für das Screening auf extrazelluläre Oxidasen eingesetzte Modell-Substrate

Um eine bessere Bioverfügbarkeit der lipophilen Substrate zu gewährleisten, wurde DMF in einer Konzentration von 3 % (v/v) als Lösungsvermittler im Medium eingesetzt. Die Ansätze wurden 12 h bei 25°C und 150 rpm inkubiert und die Transformationsprodukte mittels Flüssig/Flüssig Extraktion isoliert (siehe 4.3.2.2 und 4.3.3.2). Detektierte Oxidationsprodukte der Modellsubstrate zeigen die Aktivität von extrazellulären Oxidasen an.

2.3.2 Oxidaseaktivitäten

In den Kulturüberständen von *Cyathus striatus*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* wurden Oxidaseaktivitäten nachgewiesen. Mittels GC-MS wurden Hydroxylierungsprodukte des Limonens in den Proben dieser Stämme detektiert. Die Identifizierung der Transformationsprodukte erfolgte über den Vergleich der Massenspektren mit Referenzspektren sowie über den Vergleich der Kovats-Indices mit Literaturdaten. Ein Produkt, welches in den Proben von *Cyathus striatus* und *Trametes versicolor* detektiert wurde, konnte nicht identifiziert werden. Die Vorschläge der Spektrendatenbank deuten auf ein Transformationsprodukt des Limonens hin. Transformationsprodukte des Dimethylallylalkohols und des Thymols wurden nicht nachgewiesen. Tabelle 2-12 fasst die Daten zur Identifizierung der Transformationsprodukte zusammen.

Tab. 2-12 Identifizierung der in den zellfreien Kulturmedien von *Cyathus striatus*, *Marasmius scorodonium* und *Trametes versicolor* nachgewiesenen Transformationsprodukte des Limonens

Produkt	Massenspektrum ^a	KI	KI Literatur ^a	Basidiomycet
(E)-Carveol	152, 134, 119, 109, 95, 91, 84, 67, 55, 41	1222	1217	<i>Cyathus striatus</i> <i>Marasmius scorodonium</i>
(Z)-Carveol	134, 119, 109, 91, 83, 69, 55, 41	1236	1229	<i>Cyathus striatus</i>
4-Terpineol	154, 136, 125, 111, 98, 93, 86, 81, 77, 71, 67, 55, 43	1189	1177	<i>Trametes versicolor</i>
Nicht identifiz.	164, 149, 136, 121, 108, 93, 91, 77, 68, 53	1219	-	<i>Cyathus striatus</i> <i>Trametes versicolor</i>

^a Referenzspektren und Kovatsindices: ADAMS R.P., 1995

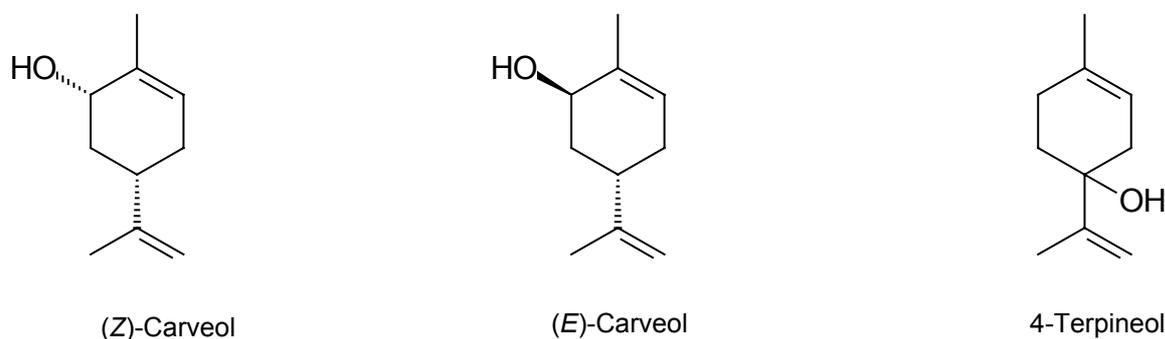


Abb. 2-16 Nachgewiesene Oxidationsprodukte des Limonens

Die Quantifizierung der Transformationsprodukte zeigte, dass nur geringe Produktausbeuten erzielt wurden. Die Konzentration aller Produkte lag unter 1 mg L^{-1} . In den Kulturüberständen ohne Substratzugabe wurden die Produkte nicht nachgewiesen, so dass eine *de novo* Synthese ausgeschlossen werden konnte. Auch im chemischen Blindwert waren die Produkte nicht nachweisbar. In den Ansätzen mit Zugabe von Veratrylalkohol bzw. Toluol wurden im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zugabe geringere Ausbeuten an Oxidationsprodukten festgestellt. Zum Teil waren Oxidationsprodukte in diesen Ansätzen überhaupt nicht nachweisbar (siehe Tab. 2-13 bis 2-15).

Tab. 2-13 *Cyathus striatus*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L⁻¹] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen (- = nicht nachweisbar, < 20 µg L⁻¹ Medium)

Produkt	ohne Induktion	+ Toluol	+ Veratrylalkohol
(E)-Carveol	nachweisbar	-	-
(Z)-Carveol	nachweisbar	-	-
nicht identifiziertes Produkt ^a	0,79	0,20	0,50

Tab. 2-14 *Marasmius scorodonius*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L⁻¹] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen

Produkt	ohne Induktion	+ Toluol	+ Veratrylalkohol
(E)-Carveol	0,63	0,30	0,32

Tab. 2-15 *Trametes versicolor*: Konzentration der Transformationsprodukte im zellfreien Medium [mg L⁻¹] in induzierten und nicht induzierten Ansätzen (- = nicht nachweisbar)

Produkt	ohne Induktion	+ Toluol	+ Veratrylalkohol
4-Terpineol	0,03	-	-
nicht identifiziertes Produkt ^a	0,17	0,10	0,10

^a Quantifizierung über den internen Standard unter Annahme gleicher Responsefaktoren

2.3.3 Zusammenfassung

Neun Pilzstämmen wurden auf die Bildung von extrazellulären Oxidoreduktasen getestet. In den zellfreien Kulturmedien von *Cyathus striatus*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* wurden Oxidoreduktase-Aktivitäten festgestellt. (E)-Carveol, (Z)-Carveol und 4-Terpineol wurden als Hydroxylierungsprodukte des Modellsubstrates Limonen identifiziert.

3 Diskussion

3.1 Screening auf Sclareoltransformation

3.1.1 Auswahl der Mikroorganismen

Durch das Screening sollten Mikroorganismen ermittelt werden, die selektiv die Seitenkette des Sclareols abbauen. Durch Seitenkettenabbau entstandene Transformationsprodukte - Zielprodukte des Screenings waren vor allem Sclareolid und das korrespondierende "Diol" (1-(2-Hydroxy-ethyl)-2,5,5,8a-tetramethyl-decahydro-naphthalen-2-ol) - können als Intermediate zur Synthese von Ambrox eingesetzt werden. Die Mikroorganismen wurden nach bestimmten Kriterien ausgewählt, die im folgenden näher erläutert werden.

3.1.1.1 Stämme der Gattungen *Hyphozyma* und *Cryptococcus* sowie verwandte Stämme

In zwei US-Patenten wird der Abbau von Sclareol zum Sclareolid bzw. zum korrespondierenden "Diol" durch Hefestämme der Gattungen *Hyphozyma* und *Cryptococcus* beschrieben (FARBOOD et al., 1989; FARBOOD et al., 1990). Es erschien naheliegend, dass auch andere Stämme der Gattungen *Hyphozyma* und *Cryptococcus* zum selektiven Seitenkettenabbau des Sclareols befähigt sind. Keiner der im Screening nach diesem Kriterium eingesetzten Stämme zeigte jedoch eine Biotransformation von Sclareol. Die gewählten Screeningbedingungen sind als Ursache hierfür auszuschließen, da im Kontrollversuch mit *Hyphozyma roseoniger* CBS 214.83 aus US Patent Nr. 4,798,799 das "Diol" als Transformationsprodukt eindeutig nachgewiesen wurde (siehe 2.1.1.2). Offensichtlich handelt es sich bei dem Seitenkettenabbau des Sclareols um eine streng stammspezifische biokatalytische Aktivität. Zu berücksichtigen ist zudem, dass die Taxonomie von Mikroorganismen bislang hauptsächlich auf der Analyse des Phänotyps beruht (MADIGAN et al., 1997). Insbesondere im Fall der Gattung *Hyphozyma* wird darauf verwiesen, dass die Klassifizierung ausschließlich auf Grund morphologischer und physiologischer Charakteristika erfolgte (DE HOOG und SMITH, 1986). Da die phylogenetische Verwandtschaft der Stämme nicht geklärt ist, sind unterschiedliche Enzymmuster der einzelnen Stämme denkbar.

Aus diesem Grund wurden auch Stämme der Gattung *Thelebolus* in das Screening aufgenommen, die nach Angaben des Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn phylogenetisch mit der Gattung *Hyphozyma* verwandt ist. Bei keinem der gescreenten Stämme wurden jedoch Transformationsprodukte des Sclareols festgestellt.

3.1.1.2 Labdanseitenketten – abbauender Stamm

Der Bakterienstamm *Nocardia aurantia* ATCC 12674 (= *Rhodococcus* sp. DSM 43287) ist für die Spaltung der Bindung zwischen C₁₃ und C₁₄ der Seitenkette der Isocupressinsäure beschrieben (LIN und ROSAZZA, 1998).

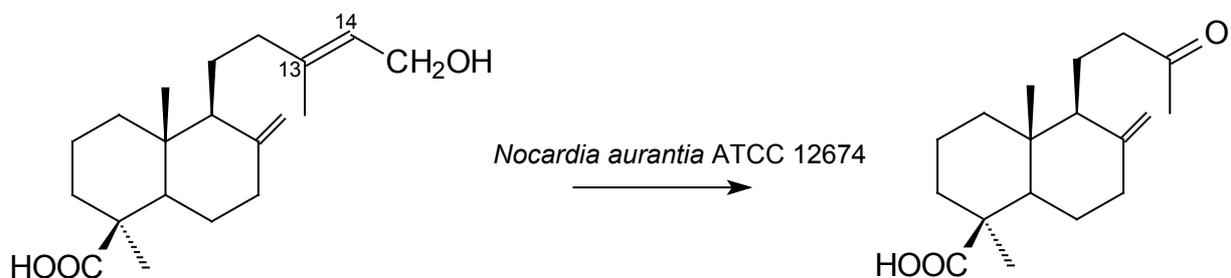


Abb. 3-1 Abbau der Seitenkette von Isocupressinsäure durch *Nocardia aurantia* ATCC 12674 (LIN und ROSAZZA, 1998)

Ein Seitenkettenabbau des Sclareols durch *Nocardia aurantia* ATCC 12674 wurde nicht beobachtet. Sclareol und Isocupressinsäure unterscheiden sich bezüglich der Seitenkette durch unterschiedliche Positionen der Doppelbindung und der Hydroxylgruppe. Vermutlich ist die im Molekül der Isocupressinsäure vorhandene Anordnung im Hinblick auf die Substratspezifität der beteiligten Enzyme und für den Mechanismus der Spaltung die erforderliche strukturelle Voraussetzung. Auch unterschiedliche Substituenten des Labdangrundgerüsts (Carboxylgruppe an C₁₉ und Doppelbindung statt OH-Gruppe an C₈ im Molekül der Isocupressinsäure) können in Bezug auf die Substratspezifität der an der Spaltung beteiligten Enzyme von Bedeutung sein.

3.1.1.3 Steroidseitenketten-abbauende Stämme

Sterole wie Cholesterol und Sitosterol werden als Ausgangsmaterial zur Synthese steroider Hormone und Pharmazeutika eingesetzt. Der selektive Abbau der Steroidseitenketten durch Mikroorganismen führt hierbei unter Erhalt des Steroid-Grundgerüsts zu Primärprodukten, die für weitere Syntheseschritte genutzt werden können.

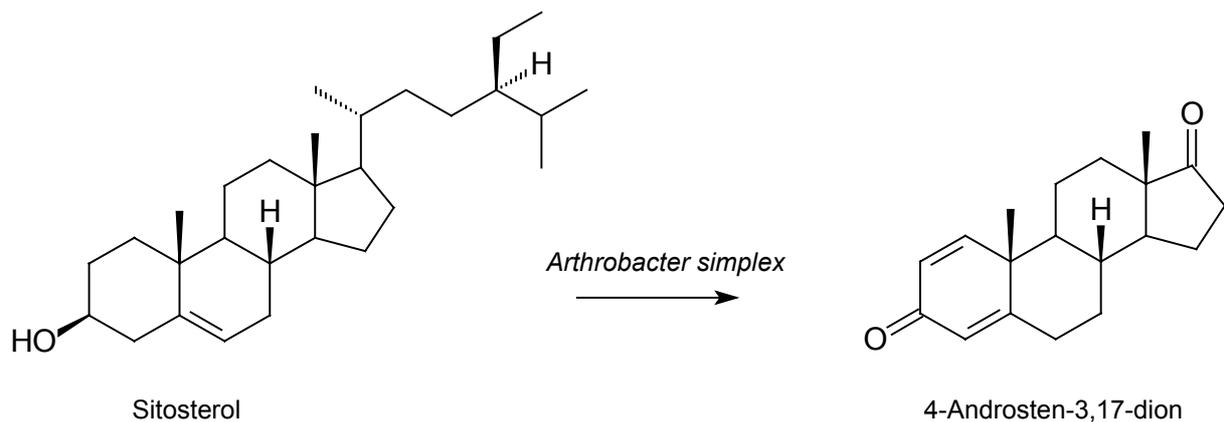


Abb. 3-2 Selektiver Steroidseitenkettenabbau durch *Arthrobacter simplex* (Mathur et al., 1992)

Steroide und Labdane weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf. Beide Gruppen gehören den Isoprenoiden an und bestehen aus einem polycyclischen bzw. bicyclischen Grundgerüst sowie einer Seitenkette. Möglicherweise können Mikroorganismen, die den Seitenkettenabbau von Steroiden katalysieren, auch die Seitenkette des Sclareols selektiv abbauen. Von den im Screening nach diesem Kriterium eingesetzten Stämmen (siehe Tab. 2-1), zeigte *Arthrobacter simplex* die Fähigkeit zur Biotransformation von Sclareol. Ein Abbau der Sclareolseitenkette wurde jedoch nicht beobachtet.

3.1.1.4 Stämme, welche verzweigte Alkane abbauen

Die Seitenkette des Sclareols weist an C₁₃, in β -Stellung zum terminalen C-Atom, eine Methylverzweigung auf. Der Abbau der Seitenkette durch β -Oxidation, dem üblichen mikrobiellen Mechanismus zur Metabolisierung von Alkanen (MADIGAN et al., 1997) ist nicht möglich, da keine intermediären β -Ketoacyl-Derivate gebildet werden können. Es wurden daher Mikroorganismen ausgewählt, die vermutlich unter dem Einsatz anderer Mechanismen zum Abbau von Alkanen mit Verzweigungen in

β -Stellung in der Lage sind. *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 ist zum Abbau der 3,4-Dimethylpentansäure zur 2-Methylpropansäure befähigt (LATZA, 1999).

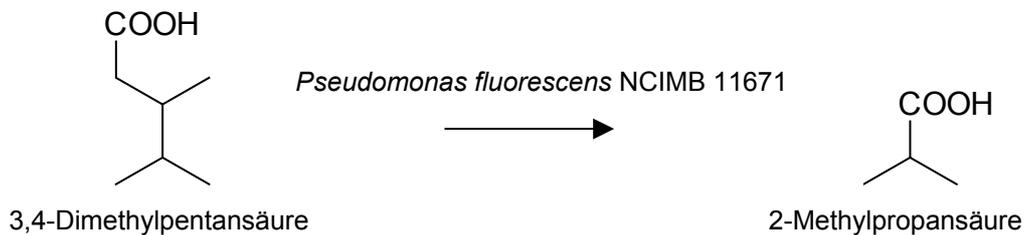


Abb. 3-3 Abbau der β -verzweigten 3,4-Dimethylpentansäure durch *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 (LATZA, 1999)

Das unter 3.1.1.3 bereits genannte Bakterium *Arthrobacter simplex* sowie *Arthrobacter oxydans* bauen die β -verzweigte Alkylseitenkette von Sitosterol ab (MATHUR et al., 1992; DUTTA et al., 1992).

Keiner der im Screening nach diesem Kriterium ausgewählten Stämme war jedoch zum selektiven Seitenkettenabbau des Sclareol in der Lage.

3.1.1.5 Terpen-transformierende Stämme

Der mikrobielle Metabolismus von Terpenen spielt eine wichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf der Natur. Die von Pflanzen synthetisierten Terpene werden hauptsächlich von Mikroorganismen abgebaut. Ausgehend von terpenoiden Substraten sind verschiedene von Mikroorganismen katalysierte Reaktionen wie Oxidationen, Hydroxylierungen, Dehydratisierungen, Hydrolysen sowie die Bildung von neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen und verschiedene Abbaureaktionen beschrieben (JANSSENS et al., 1995). Im Screening sollte das bekannte Potential bestimmter Mikroorganismen zur Terpen-Biotransformation für den Abbau des Sclareols genutzt werden. Der nach diesem Kriterium ausgewählte Zygomycet *Cunninghamella echinulata* sowie der Basidiomycet *Pleurotus eous* transformierten Sclareol unter Bildung von hydroxylierten Produkten (siehe 2.1.1.4). Ein Abbau der Seitenkette wurde nicht festgestellt.

3.1.1.6 Terpen-synthetisierende Stämme

Pilze sind vielseitige Produzenten flüchtiger Terpenoide (JANSSENS et al., 1991). Möglicherweise verfügen Pilze, die Terpene synthetisieren auch über Enzyme, die den Abbau bzw. einzelne Biotransformationen dieser Stoffe katalysieren. Diese Vermutung wurde in dem Screening bestätigt. Sieben der nach diesem Kriterium ausgewählten Stämme (*Chaetomium globosum*, *Cyathus striatus*, *Lentinellus cochleatus*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus eous*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*) waren zur Biotransformation von Sclareol unter der Bildung hydroxylierter Produkte befähigt (siehe 2.1.1.4).

3.1.1.7 Von terpenhaltigen Substraten isolierte Stämme

Terpenkohlenwasserstoffe sind die Hauptbestandteile der aus den Nadeln, Zweigen und Fruchtzapfen von Koniferenarten gewonnenen ätherischen Öle. Die Vertreter der *Cupressae* und *Pinaceae* enthalten zudem zahlreiche oxyfunktionalisierte Labdane wie z.B. Labdanolsäure, Abienol und verschiedene mehrfach hydroxylierte Labdanderivate (BREITMAIER, 1999). Möglicherweise sind von Nadelhölzern isolierte Mikroorganismen, bedingt durch ihr natürliches Terpen- oder sogar Labdan-haltiges Substrat zur Biotransformation von Sclareol befähigt. Diese Vermutung wurde durch das Screening bestätigt. *Phellinus pini*, ein von Kiefernholz isolierter Basidiomycet, bildete verschiedene Transformationsprodukte des Sclareols. Ein Seitenkettenabbau des Sclareols durch *Phellinus pini* wurde jedoch nicht festgestellt.

Auch Schalen von Citrusfrüchten weisen hohe Terpengehalte auf. Die aus ihnen gewonnenen Citrusöle bestehen in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Citrusart bis zu 97 % aus einem komplexen Gemisch verschiedener Terpene (OHLOFF, 1994). Hier liegt ebenfalls die Vermutung nahe, dass die von Terpenhaltigen Citrusschalen isolierten Mikroorganismen zur Biotransformation von Terpenen in der Lage sind. Im Screening fielen *Penicillium italicum*, der Erreger der Blaufäule bei Citrusfrüchten (KRÄMER, 1992) sowie *Botryosphaeria rhodina*, ein von Citrusschalen isolierter Ascomycet, durch die Bildung von Transformationsprodukten des Sclareols auf. Ein Abbau der Sclareolseitenkette wurde jedoch auch hier nicht nachgewiesen.

3.1.2 Toxische Wirkung des Sclareols auf Mikroorganismen

Das aus *Salvia sclarea* L. gewonnene Sclareol ist ein wichtiges bioaktives Diterpen (ULUBELEN et al., 1994). Sclareol fungiert unter anderem als Wachstumsregulator von Pilzen. In Konzentrationen von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ wurde das radiale Wachstum verschiedener Pilzstämmen auf Agarplatten gehemmt. Beobachtet wurde hierbei eine Induktion der Verzweigung des Pilzmycels verbunden mit einem Verlust des apicalen Wachstums, wodurch die Ausbreitung des Mycels insgesamt reduziert wurde. Solche morphologischen Effekte weisen auf eine Regulierung des natürlichen Wachstumsprozesses von Pilzen durch Sclareol hin (BAILEY et al., 1974; BAILEY et al., 1975). Sclareol zeigt zudem antimikrobielle Aktivität. In Konzentrationen von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ wird das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in Submerskultur inhibiert (ULUBELEN et al., 1994). 13-(S)-Sclareol zeigt spezifische Aktivität gegen grampositive Bakterien. Die minimale Konzentration für die Inhibierung des Wachstums verschiedener Bacillus-Arten liegt bei $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MENDOZA et al., 2002).

Im durchgeführten Screening wurde Sclareol in Konzentrationen von $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ eingesetzt (siehe 4.3.1.3). Diese Konzentration liegt in der Größenordnung für die die wachstumshemmenden und antimikrobiellen Wirkungen des Labdams beschrieben sind. Bei 29 der eingesetzten Pilz- und Hefestämme wurde anhand der Wachstumskurven eine deutliche Verzögerung des Wachstums infolge der eingesetzten Sclareolmenge festgestellt. Nach entsprechender zeitlicher Verzögerung wurden jedoch in den meisten Fällen die maximalen Biomasse der Ansätze ohne Sclareolzugabe erreicht. Eine vollständige Inhibierung des Pilzwachstums in Anwesenheit von Sclareol war nur bei *Lentinus lepideus*, *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* zu verzeichnen.

Eine antimikrobielle Wirkung des Sclareols wurde bei den im Screening eingesetzten Bakterienstämmen nicht festgestellt. Das Wachstum war in keinem Fall beeinträchtigt.

Da die Anwesenheit von Sclareol bei den im Screening verwendeten Stämmen in den meisten Fällen lediglich eine Wachstumsverzögerung bewirkte, kann davon ausgegangen werden, dass grundsätzlich vorhandene Fähigkeiten der Stämme zur

Sclareoltransformation im Screening erkannt wurden. Auch der Referenzstamm *Hyphozyma roseoniger* zeigte ein deutlich verzögertes Wachstum in Anwesenheit von Sclareol. Aussagen über die Auswirkung der Sclareoltoxizität auf den Grad der Transformationsleistung können mit den vorhandenen Daten nicht getroffen werden.

3.1.3 Transformationsprodukte des Sclareols

Die aus dem Seitenkettenabbau des Sclareols resultierenden Zielprodukte des Screenings, "Diol", Sclareolid und Ambrox wurden bei keinem der untersuchten Stämme gefunden. Auch andere Seitenkettenabbauprodukte des Sclareols wurden nicht nachgewiesen. Stattdessen wurden von den eingesetzten Mikroorganismen Transformationsprodukte gebildet, deren Massenspektren auf monohydroxylierte Sclareolderivate hinweisen (siehe 2.1.1.5).

3.1.3.1 Selektiver Seitenkettenabbau

Der Abbau der Sclareolseitenkette unter Erhalt des Labdangrundgerüsts zum Sclareolid bzw. zum korrespondierenden "Diol" ist durch die Hefen *Hyphozyma roseoniger*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* und *Bensingtonia ciliata* beschrieben (siehe 1.1.1.3). Für den Abbau von Sclareol zum Sclareolid durch *Cryptococcus albidus* wurde auf der Basis von isolierten Intermediaten ein möglicher Abbaumechanismus vorgeschlagen (Abb. 3-4) (FARBOOD, 1991). Die postulierten Schritte umfassen: allylische Umlagerung, Oxidation des primären Alkohols zur Carbonsäure, Hydroxylierung in β -Position, Spaltung der Bindung zwischen C₁₃ und C₁₄, Baeyer-Villiger Oxidation, Hydrolyse des Esters, Oxidation bis zur Carbonsäure und die Cyclisierung zum Lacton. Das Produkt der allylischen Umlagerung **3** sowie die in β -Stellung hydroxylierte Carbonsäure **6** wurden neben Manoyloxid auch als Intermediate beim Seitenkettenabbau des Sclareols durch *Hyphozyma roseoniger* nachgewiesen. Die Intermediate **3** bis **8** wurden von *Hyphozyma roseoniger* mit Umsatzraten von bis zu 100 % metabolisiert (FARBOOD et al., 1989). Der Seitenkettenabbau von Sclareol durch *Hyphozyma roseoniger* nach einem ähnlichen Mechanismus ist denkbar.

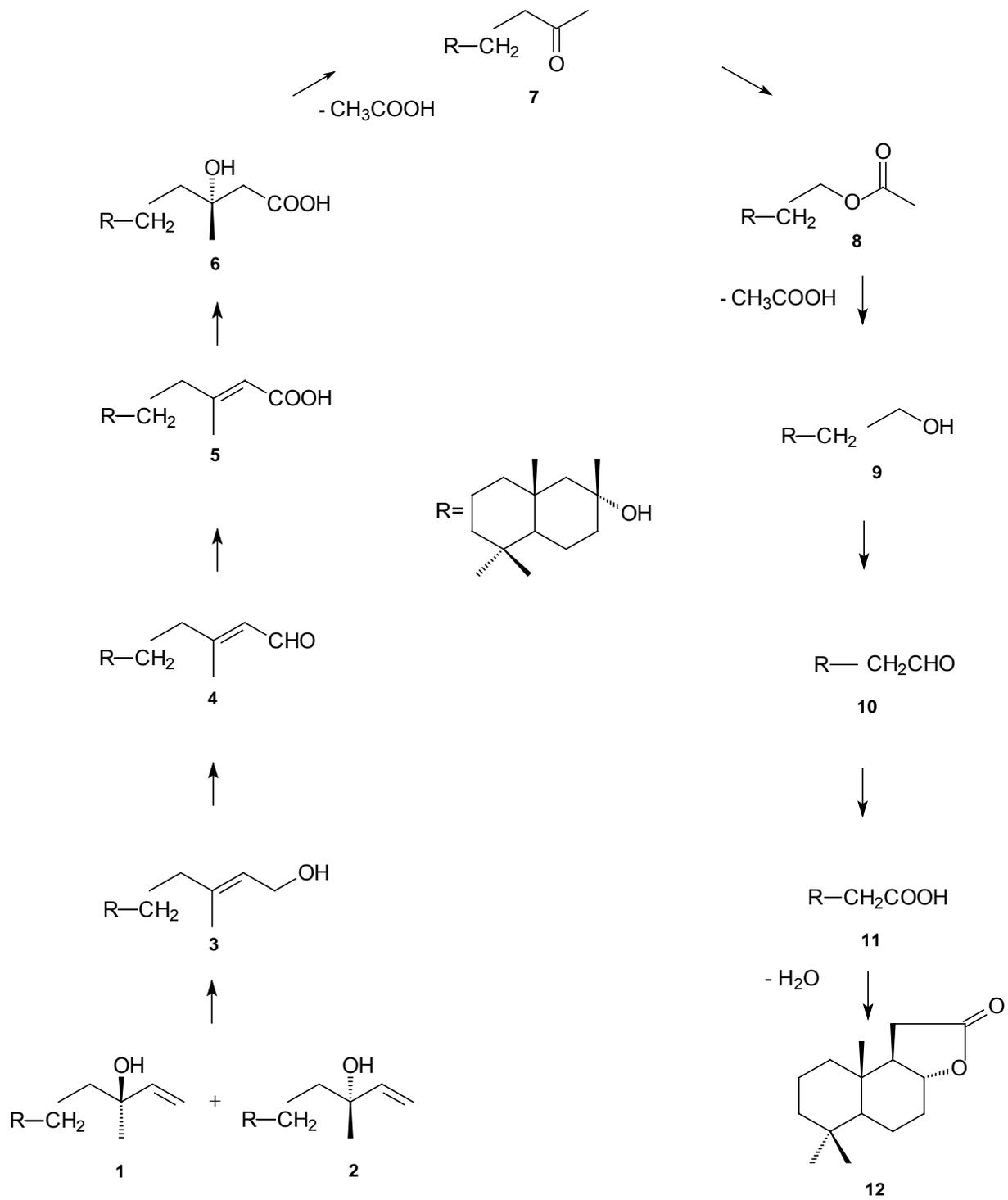


Abb. 3-4 Postulierter Mechanismus des Abbaus von (R)- und (S)-Scareol **1**, **2** zu Scclareolid **12** durch *Cryptococcus albidus* (nach FARBOOD, 1991)

Auch das Bakterium *Nocardia restricta* ITS 162 ist zum Abbau der Seitenkette des Sclareols **1**, allerdings unter Veränderung des Labdangrundgerüsts, befähigt (HIEDA, 1982). Im ersten Schritt erfolgt die Abspaltung von Wasser die zur Bildung von Manool **2** führt. Anschließend wird die Bindung zwischen C₁₃ und C₁₄ der Seitenkette gespalten. Das Produkt dieser Verkürzung der Seitenkette um zwei Kohlenstoffatome ist 14,15-Dinorlabd-8 (17)-en-13-on **3**.

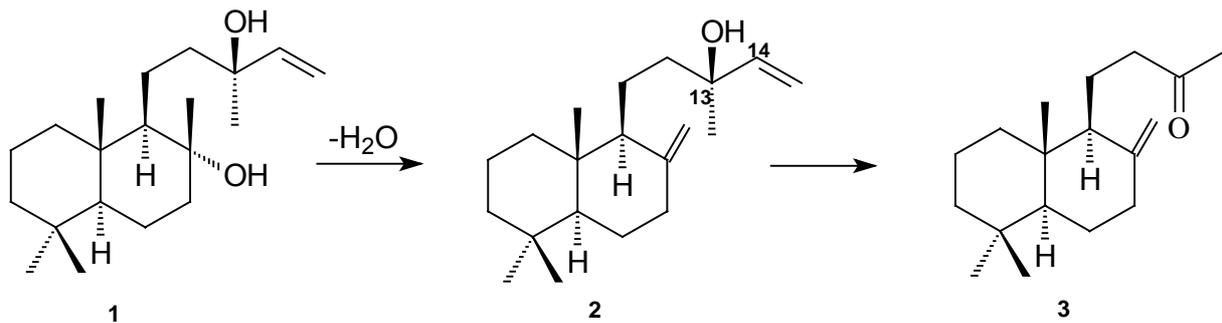


Abb. 3-5 Postulierter Mechanismus des Seitenkettenabbaus von Sclareol durch *Nocardia restricta* ITS 162 (nach HIEDA, 1982)

Obwohl die Anwesenheit von exponierten Seitenketten oftmals den initiierenden Enzymangriff an cyclischen Grundgerüsten erleichtert (FRITSCHKE UND HOFRIECHTER, 2000), ist der oxidative Seitenkettenabbau offensichtlich eine seltene Reaktion im mikrobiellen Metabolismus des Sclareols. Hierauf deuten sowohl das eigene Screening als auch andere Studien zur Biotransformation von Sclareol hin (KOUZI et al., 1993; ABRAHAM, 1994). Es sind lediglich sechs Mikroorganismen-Stämme bekannt, die zu einer Verkürzung der Sclareolseitenkette befähigt sind (siehe oben und 1.1.1.3). Mögliche Gründe hierfür werden im folgenden näher erläutert.

Initiierende Oxidation als Schlüsselreaktion des Seitenkettenabbaus

Der mikrobielle Abbau von Alkenen wird gewöhnlich durch den Angriff von Monooxygenasen initiiert, die das Alken in das entsprechende Epoxid überführen (VAN HYLCKAMA Vlieg und JANSEN, 2000). In der Seitenkette des Sclareols liegt eine terminale Doppelbindung vor. Das korrespondierende Epoxid ist als Produkt der Biotransformation von Sclareol durch *Botrytis cinerea* und *Cephalosporium aphidicola* beschrieben (FAROOQ und TAHARA, 2000; HANSON et al., 1994). Ein weiterer Abbau der Seitenkette wurde bei diesen Mikroorganismen jedoch nicht beobachtet.

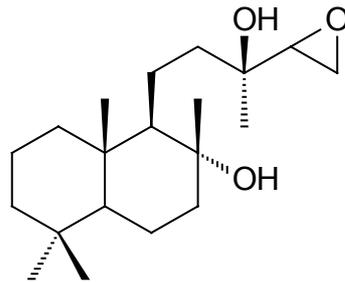


Abb. 3-6 14-Sclareolepoxid

Im eigenen Screening wurde das 14-Sclareolepoxid nicht nachgewiesen. Möglicherweise wird der Seitenkettenabbau schon durch die nicht stattfindende initiiierende Epoxidbildung verhindert. Denkbar ist, dass Doppelbindungen epoxidierende Monoxygenasen von den eingesetzten Mikroorganismen nicht gebildet werden oder ein limitiertes Substratspektrum aufweisen. Eine Monoxygenase aus *Rhodococcus sp.* AD 45 beispielsweise epoxidiert selektiv die sterisch gehinderte Doppelbindung des Isoprenmoleküls (VAN HYLKAMA Vlieg et al., 1999). Die der Sclareolseitenkette analoge Doppelbindung am drittem Kohlenstoffatom wird nicht angegriffen.



Abb. 3-7 Epoxidierung von Isopren durch *Rhodococcus sp.* AD 45 (VAN HYLKAMA Vlieg et al., 1999)

Diese Regiospezifität könnte auch der Grund für die selektive Spaltung der Seitenkette der Isocupressinsäure im Gegensatz zu der Seitenkette des Sclareols durch den im Screening eingesetzten *Rhodococcus*-Stamm (*Rhodococcus sp.* DSM 43287) sein (siehe 3.1.1.2). Sclareol und Isocupressinsäure unterscheiden sich bezüglich der Seitenkette durch eine unterschiedliche Anordnung der Doppelbindung und der Hydroxylgruppe. Isocupressinsäure, deren Doppelbindung analog zu der 1-2-Doppelbindung des Isoprenmoleküls ist, wird oxidiert. Auch hier wird eine initiiierende Epoxydierung postuliert (LIN und ROSAZZA, 1998). Die Oxidation der Doppelbindung des Sclareols, die bezüglich ihrer Lage der 3-4-Doppelbindung des Isoprenmoleküls analog ist, wurde dagegen nicht nachgewiesen.

Bei dem von FARBOOD (1991) postulierten Mechanismus wird der Seitenkettenabbau nicht durch eine Epoxidierung initiiert. Die Aktivierung der Seitenkette erfolgt über eine allylische Umlagerung mit anschließender Oxidation der entstandenen terminalen Hydroxylgruppe zur Carbonsäure. Auch zu diesem Mechanismus scheint keines der im Screening eingesetzten Mikroorganismen in der Lage zu sein.

Die subterminale Oxidation ist ein seltenerer Typ des primären Angriffs von Mikroorganismen auf Alkane (FRITSCHKE und HOFRICHTER, 2000). Die Möglichkeit des Abbaus der Sclareolseitenkette ausgehend vom hydroxylierten Kohlenstoff C₁₃ ist auszuschließen, da hier ein tertiärer Alkohol vorliegt, so dass eine weitere Oxidation zum Keton nicht möglich ist.

Methylverzweigung in der Seitenkette des Sclareols

Alkane werden von Mikroorganismen durch β -Oxidation abgebaut. Der mikrobielle Metabolismus von verzweigten Alkanen ist erschwert. Während Verzweigungen in α -Stellung lediglich eine sterische Hinderung darstellen und die Spaltung der intermediären β -Ketoacyl-CoA-Derivate zu Propanoyl-CoA statt zu Acetyl-CoA führt, ist eine β -Oxidation von in β -Stellung verzweigten Alkanen nicht möglich, da keine intermediären β -Ketoacyl-Derivate gebildet werden können. Es muss daher auf andere Abbaustrategien wie die α -Oxidation oder die Eliminierung von Alkylverzweigungen zurückgegriffen werden (SCHAEFFER et al., 1979).

Sclareol weist eine Methylverzweigung an C₁₃ in β -Stellung zum terminalen C-Atom auf. Hierdurch wird ein Abbau der Seitenkette durch β -Oxidation ausgehend vom terminalen C-Atom verhindert. Offensichtlich war keiner der im Screening eingesetzten Mikroorganismen-Stämme zum Abbau der Sclareolseitenkette über einen anderen Mechanismus befähigt.

Im Screening wurden drei Bakterien eingesetzt, die für den Abbau von in β -Stellung verzweigten Alkanketten beschrieben sind. *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 baut 3,4-Dimethylpentansäure zu 2-Methylpropansäure ab (siehe 3.1.1.4) (LATZA, 1999). Auf der Basis von nachgewiesenen Intermediaten wurde hier ein Abbau über die Eliminierung der Alkylverzweigung postuliert. *Arthrobacter simplex* und *Arthrobacter oxydans* bauen selektiv die in β -Stellung verzweigte Seitenkette von

Sitosterol ab (siehe 3.1.1.3). Anhand von Markierungen mit ^{14}C -Isotopen konnte ein Mechanismus über die Eliminierung von Alkylverzweigungen nachgewiesen werden (FUJIMOTO et al., 1982).

Keiner der drei Bakterienstämme zeigte im Screening den selektiven Seitenkettenabbau von Sclareol. Möglicher Grund hierfür könnte die limitierte Substratspezifität der beteiligten Enzyme sein. Bei einer Katalyse des Seitenkettenabbaus durch intrazelluläre Enzyme wäre zudem der Transport des Substrats in die Zelle erforderlich. Die Spezifität von Transportmechanismen der selektiv permeablen Membranen könnte den Transport des Sclareols in die Zellen verhindern.

3.1.3.2 Hydroxylierung

Monohydroxylierte Sclareolderivate sind als Produkte des mikrobiellen Metabolismus von Sclareol bekannt. Beschrieben sind Hydroxylierungen in 2α -, 3α -, 3β -, 6α -, 18- und 19 - Stellung (ABRAHAM, 1994; ARANDA ET AL, 1991; KOUZI UND MC CHESNEY, 1991). Abbildung 3-8 zeigt einen Überblick über die bislang nachgewiesenen monohydroxylierten Transformationsprodukte.

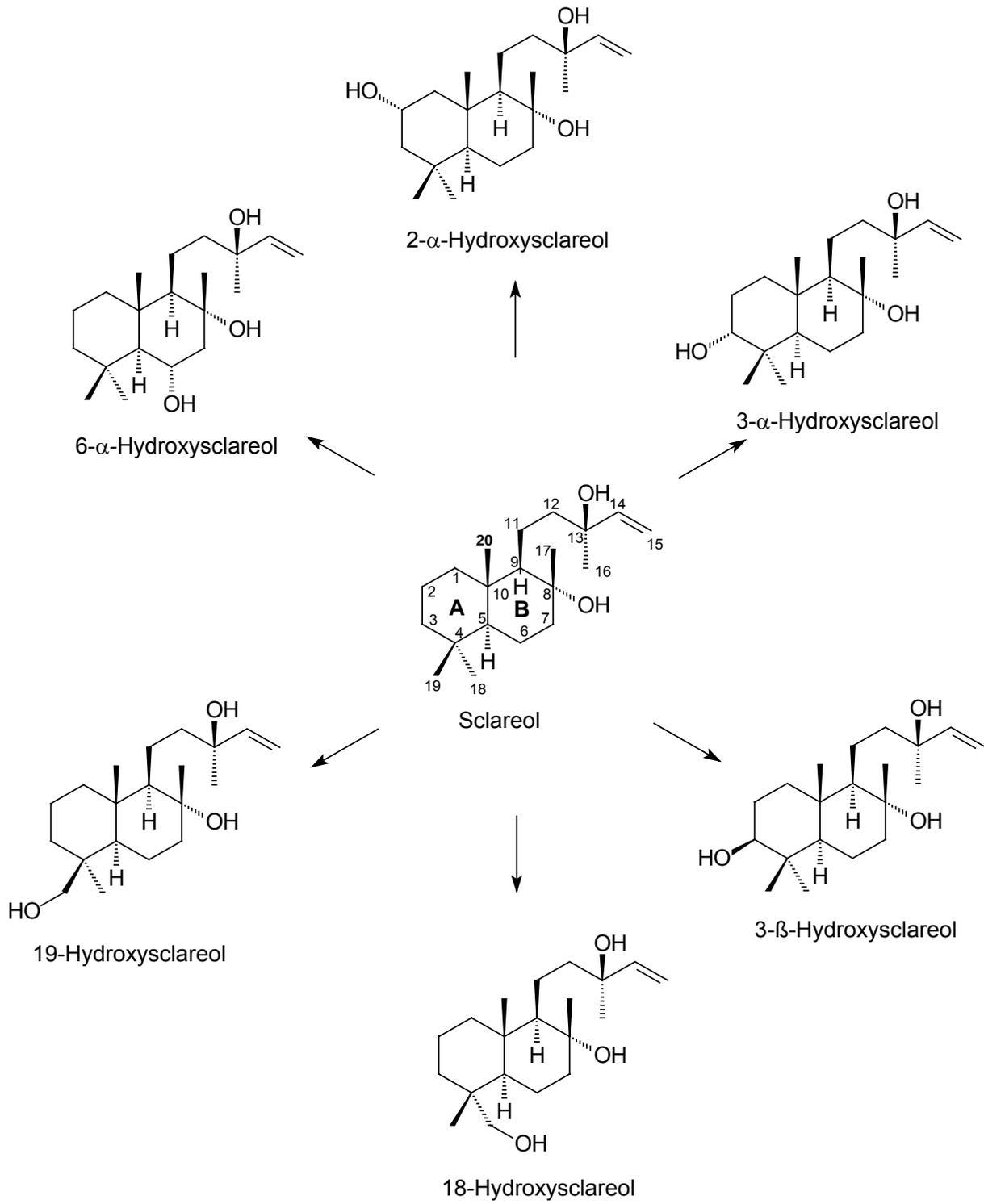


Abb. 3-8 Monohydroxylierte Transformationsprodukte des Sclareols (nach ABRAHAM, 1994; ARANDA et al, 1991; KOUZI UND MC CHESNEY, 1991).

Die Hydroxylierung des Sclareolmoleküls mittels mikrobieller Enzyme ist durch eine hohe Regio- und Stereospezifität gekennzeichnet. Die Hydroxylierung erfolgt ausschließlich am Labdan-Grundgerüst und zwar vorwiegend an Ring A und seinen Substituenten. Die Hydroxylierung in 6 α -Stellung an Ring B wurde nur bei *Mucor plumbeus* nachgewiesen (ARANDA et al., 1991). Die 3 β - und 18-Stellung, gefolgt von der 2 α - und 3 α -Stellung sind offensichtlich die bevorzugten Positionen der mikrobiellen Hydroxylierung von Sclareol (KOUZI et al., 1993).

Die Einführung von Hydroxylgruppen in das Sclareolmolekül an anderen C-Atomen als den oben beschriebenen ist vermutlich infolge sterischer Hinderungen durch die Labdanseitenkette oder durch die Substituenten des Labdangrundgerüsts erschwert. Auch im Substratmolekül bereits vorhandene oxygenierte Funktionen werden als richtungsweisende Elemente für weitere Hydroxylierungen diskutiert. Da polare Substituenten als Bindungsstelle für hydroxylierende Enzyme fungieren, ist deren Position und Stereochemie entscheidend für die Ausrichtung des Substrats im aktiven Zentrum und somit für die Lenkung des enzymatischen Angriffs (FLITSCH et al., 2002).

Die Hydroxylierung ist offensichtlich der bevorzugte Weg der mikrobiellen Metabolisierung von Sclareol. Im vorliegenden Screening wurden Hydroxylierungsprodukte des Sclareols sowohl mit Basidiomyceten, Ascomyceten und Zygomyceten als auch mit Bakterien gefunden. Auch in anderen Studien zum mikrobiellen Metabolismus des Sclareols (ABRAHAM, 1994; KOUZI UND MC CHESNEY, 1991) in denen über 200 Stämme unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft gescreent wurden, wurden ausschließlich Hydroxylierungsprodukte detektiert. Hydroxylierungen werden von Monooxygenasen, die ubiquitär in nahezu allen lebenden Zellen vorkommen, katalysiert (FLITSCH et al., 2002). Durch sie erfolgt die Erstaktivierung von unaktivierten, auch artfremden Substraten für die weitere Metabolisierung (FRITSCH und HOFRICHTER, 2000).

3.1.4 Naturisolate

Mikroorganismen kommen in der Natur in Mischpopulationen vor, die aus einer Vielzahl von Stämmen und Arten mit unterschiedlichen morphologischen und physiologischen Eigenschaften bestehen (BAST, 1999). Durch die Anwendung selektiver Bedingungen in geeigneten Testsystemen lassen sich Mikroorganismen mit spezifischen physiologischen Fähigkeiten isolieren.

Im Screening auf Sclareoltransformation wurden zunächst aus einem großen Mikroorganismen-Pool, diejenigen Stämme selektioniert, die Sclareol als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können (siehe 4.2.3). Dies bietet im Gegensatz zum Screening von Stämmen aus Kultursammlungen den Vorteil, dass von Anfang an ausschließlich mit Stämmen, die ein Sclareol-abbauendes Potential aufweisen, gearbeitet wird. Die Identifizierung möglicher Metabolite erfolgte im Anschluss durch das Screening der isolierten Stämme in Submerskultur (siehe 4.3.1.4).

3.1.4.1 Auswahl der Proben zur Isolierung Sclareol-abbauender Mikroorganismen

Die Zusammensetzung von Mikroorganismen-Populationen in der Natur ist von den spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Habitate, insbesondere dem Angebot von Nährstoffen und den physikalischen Wachstumsbedingungen abhängig (MADIGAN et al., 1997). Voraussetzung für eine Anreicherung der angestrebten Mikroorganismen ist deren grundsätzliche Anwesenheit im Inokulum. Es wurden daher Proben gewählt, die Sclareol-abbauenden Mikroorganismen geeignete Wachstumsbedingungen bieten (*Salvia sclarea* L.), oder in denen die Anwesenheit von Mikroorganismen mit Sclareol-degradierendem Potential aus anderen, unten aufgeführten Gründen vermutet wurde.

Mikroorganismen von *Salvia Sclarea* L.

In den Blüten von *Salvia sclarea* L. ist Sclareol in einer Konzentration von 4 mg g^{-1} enthalten. Die Konzentration von Sclareol in den Blättern beträgt $0,05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (BANTHORPE et al., 1990). Möglicherweise können von der Pflanze *Salvia sclarea* L. isolierte Bakterien, bedingt durch ihr natürliches Sclareol-haltiges Substrat, Sclareol metabolisieren.

Bodenproben, von möglicherweise mit Xenobiotika verunreinigten Orten

Orte wie Tankstellen, Straßen und Parkplätze sind einer erhöhten Belastung an Xenobiotika ausgesetzt. Hier sind Bakterien zu vermuten, die Xenobiotika tolerieren oder diese sogar als Substrate zur Energie- und Kohlenstoffgewinnung nutzen. Möglicherweise können diese, an artfremde Substrate angepassten Mikroorganismen auch Sclareol metabolisieren.

Bodenproben aus Wäldern, Wiesen und Seeufern

Wald - und Wiesenböden, sowie Seeufer sind für hohe Populationsdichten und Artenvielfalt bekannt. Das biochemische Potential von Böden ist zudem bedeutend größer, als das zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierte. Neben vorhandenen messbaren Aktivitäten sind auch nichtinduzierte Enzyme aktiver Mikroorganismen sowie das Potential von im Ruhezustand befindlichen Mikroorganismen Bestandteil der potentiellen metabolischen Gesamtaktivität (TATE, 2000). Es erschien daher sinnvoll diese Proben im Screening einzusetzen.

3.1.4.2 Transformationsprodukte isolierter Mikroorganismen

Als Sclareolabbauprodukt eines aus einer Schlammprobe isolierten Mikroorganismus wurde Sclareoloxid identifiziert (siehe 2.1.2.2). Sclareoloxid ist als Metabolit von Sclareol beschrieben. In der Muskatellersalbeipflanze *Salvia sclarea* L. ist es vermutliches Intermediat der Bildung von Ambrox aus Sclareol (OHLOFF, 1994). Auch als Produkt mikrobieller Transformationen wurde Sclareoloxid nachgewiesen. FARBOOD (1989) identifizierte Sclareoloxid als Intermediat der Biotransformation von Sclareol zum korrespondierendem "Diol" durch *Hyphozyma roseoniger*. Sclareoloxid ist geruchslos (DIMOGLO et al., 1995), es wird zur chemischen Synthese von Ambrox eingesetzt (Abb. 3-9) (DAVEY et al., 1998).

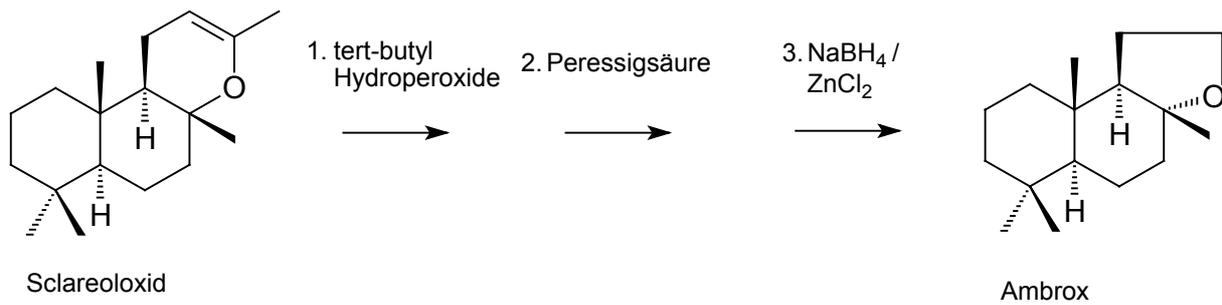


Abb. 3-9 Chemische Synthese von Ambrox aus Sclareoloxid (DAVEY et al., 1998)

Die Biotransformation von Sclareol zum Sclareoloxid durch den isolierten Mikroorganismus wurde nur zweimal reproduziert. Durch die Erhöhung der Zelldichte wurde eine erhöhte Ausbeute erzielt, wodurch das Vorliegen einer enzymatischen Reaktion bestätigt wurde. Mögliche Gründe für die ausbleibende Aktivität können eine potentielle genetische Instabilität des Stammes oder in der künstlichen Umgebung möglicherweise fehlende Wachstumsfaktoren bzw. Cofaktoren der beteiligten Enzyme sein. Denkbar ist auch eine Induktion der beteiligten Enzyme durch Substrate, die unter den Laborbedingungen nicht mehr vorhanden sind. Die mangelnde Aktivität der Bakterien von der gelagerten Ausgangsplatte kann auf dem eingetretenen Zelltod der Sclareol-transformierenden Bakterien oder auf nun auf den Agarplatten vorherrschenden, die Primärprodukte des Sclareolabbaus metabolisierenden, Bakterien beruhen.

Obwohl auch von den anderen Agarplatten mit auf der Oberfläche verteiltem festen Sclareol ein deutliches Wachstum von Bakterien festgestellt wurde und jeweils Stämme isoliert werden konnten, waren in den Proben dieser Stämme keine Transformationsprodukte des Sclareol nachweisbar. Im Gegensatz zur Plattenkultivierung wurde in Submerskultur zudem nur ein geringes Wachstum der Bakterien festgestellt. Möglicherweise wurden zum Teil Mikroorganismen isoliert, die den Agar als Kohlenstoffquelle verwerten können, obwohl dieser von den meisten Mikroorganismen nicht angegriffen wird (BAST, 1999). Auch die Bioverfügbarkeit des Sclareols hat vermutlich einen Einfluss. Bei der mikrobiellen Metabolisierung von wasserunlöslichen Kohlenwasserstoffen ist beispielsweise die Bildung von Bio-Tensiden durch Mikroorganismen beschrieben, die der Emulgierung der Substrate dienen und so deren Aufnahme ermöglichen (HOMMEL, 1990). Ein solcher Mechanismus wäre auch im Fall des Sclareols denkbar und bei der statischen

Agarplattenkultivierung im direkten Kontakt zum Sclareol vermutlich wesentlich effektiver als in der Submerskultur.

Bei den mit emulgiertem Sclareol geführten Kulturen war vermutlich der Emulgator Triton X 100 die selektionierende Kohlenstoffquelle. Mikrobielles Wachstum war auf allen Platten zu verzeichnen, Sclareoltransformationsprodukte wurden jedoch bei keinem der isolierten Stämme nachgewiesen.

3.2 Spaltung von Carotinoiden durch die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina*

In vorausgegangenen Arbeiten wurde eine von *Lepista irina* gebildete polyvalente Peroxidase isoliert, die β -Carotin an der Doppelbindung zwischen C₉ und C₁₀ unter Bildung von β -Ionon spaltet. Auch die Spaltung von α -Carotin unter Freisetzung der entsprechenden C₁₃-Ketone β -Ionon und α -Ionon wurde beschrieben (LANGHOFF, 2002). Zur Untersuchung der Substratspezifität der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* sowie der möglichen Gewinnung weiterer olfaktorisch aktiver Norisoprenoide sollten zusätzliche Carotinoide mit dem Enzym umgesetzt werden.

3.2.1 Carotinoide

3.2.1.1 Auswahl der Carotinoide

Im Hinblick auf die zu untersuchende Substratspezifität sollte eine möglichst große strukturelle Bandbreite an Carotinoiden erfasst werden (siehe Abb. 2-7). Es wurden sowohl Carotine (reine Kohlenwasserstoffe), als auch Xanthophylle eingesetzt. Aus der Gruppe der Carotine wurde neben den bereits untersuchten, eine Cyclohexenyl-Substruktur aufweisenden Isomeren α - und β -Carotin das acyclische Lycopin ausgewählt. Aus der Gruppe der Xanthophylle wurden unter anderem Carotinoide mit hydroxylierten Hexenylringen eingesetzt. Hierzu gehören Cryptoxanthin (Hydroxylierung an einem Ring, an C₃) sowie die Isomere Zeaxanthin und Lutein (Hydroxylierung an beiden Ringen, an C₃ und C_{3'}). Das Epoxycarotinoid Violaxanthin weist Epoxidgruppen zwischen C₅ und C₆ beider Hexenylringe auf. Mit Capsanthin wurde ein Xanthophyll ausgewählt, das eine Cyclopentyl-Substruktur sowie eine Oxogruppe in der Polyenkette an C₆ aufweist. Auch Neoxanthin zeichnet sich durch eine Modifikation der Polyenkette, eine kumulierte Doppelbindung zwischen C₇ und C₈ aus.

Weiteres Kriterium für die Auswahl der Carotinoide war deren Funktion als potentielle Vorstufen von Aroma-relevanten Norisoprenoiden. Die auf Grund der oxidativen Spaltung der jeweiligen Carotinoide entstehenden C₁₃-Norisoprenoide Grashüpferketon, 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid, 3-Hydroxy- β -Ionon und 3-Hydroxy- α -Ionon sind als Precursoren von Aromastoffen in Pflanzen wie beispielsweise Wein

und Tabak bekannt (WILLIAMS et al., 1992; WAHLBERG, 2002). Pseudoionon, das C₁₃-Spaltprodukt des Lycopins, ist als Aromastoff unter anderem in Tomaten beschrieben (BELITZ und GROSCH, 2001).

3.2.1.2 Isolierung der Carotinoide

Als Ausgangsmaterialien wurden Gemüsesorten verwendet, die eine vergleichsweise hohe Konzentration an den zu isolierenden Carotinoiden aufweisen (siehe Tab. 2-4).

Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein sind neben β -Carotin die typischen Chloroplasten-Carotinoide und als solche in allen photosynthetischen Geweben vorhanden. Vor allem Spinat (*Spinacia oleracea* L.) zeichnet sich durch einen hohen Gehalt dieser Carotinoide (MÜLLER, 1997), insbesondere des in pflanzlichen Materialien nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Neoxanthins aus. Die Carotinoide liegen in den Chloroplasten in Form von Chlorophyll-Carotinoid-Komplexen vor. Da sie nicht kovalent an die Proteine gebunden sind, ist die Isolierung der freien Carotinoide durch Extraktion mit dem entsprechenden Lösungsmittel möglich (GOODWIN, 1988).

Zur Isolierung des Lycopins wurde die Tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.) ausgewählt. Lycopin ist das Hauptcarotinoid der Tomate. Der Anteil des Lycopins am Gesamtcarotinoidgehalt der Tomate beträgt bis zu 90%. Lycopin liegt in kristalliner Form in den Chromoplasten der Tomate vor (GROSS, 1991).

Capsanthin ist das typische Carotinoid der Paprika (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*). In anderen Pflanzen wird es kaum nachgewiesen. Neben Capsanthin bestimmen auch Zeaxanthin, Cryptoxanthin und β -Carotin das Carotinoidmuster der Paprika. Die Carotinoide sind konzentriert in den Lipidtröpfchen, den Plastoglobuli der Chromoplasten (GROSS, 1991). Die Xanthophylle liegen hierbei verestert mit verschiedenen Fettsäuren vor. Zur Isolierung der freien Carotinoide ist daher eine Verseifung erforderlich.

Mittels semipräparativer HPLC wurden Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Capsanthin und Zeaxanthin nahezu vollständig von den anderen im jeweiligen Extrakt

vorhandenen Carotinoiden getrennt (siehe 2.2.1.3). Die Chromatogramme von Lycopin und Cryptoxanthin zeigten geringe Mengen nicht abgetrennter Carotinoide (siehe Abb. 2-9 und 2-10). Im Fall des Lycopins könnte es sich um ein cis-Isomer des Hauptcarotinoids all-trans-Lycopin handeln. Typisch für die Spektren von cis-Isomeren der Carotinoide ist eine zusätzliche cis-Bande mit einem Absorptionsmaximum, welches etwa 142 nm unter der Bande mit der höchsten Wellenlänge liegt (BRITTON et al., 1995). Das UV/VIS-Spektrum des Lycopins weist eine cis-Bande bei $\lambda = 360$ nm auf (Die Bande mit der höchsten Wellenlänge liegt bei 499 nm) (siehe Tab. 2-5). Die Abtrennung des cis-Lycopins bei der Isolierung von all-trans-Lycopin ist als problematisch beschrieben (HAKALA und HEINONEN, 1994). Die Peaks im Chromatogramm des Cryptoxanthins konnten auf Grund der typischen Feinstruktur der Spektren (drei getrennte Banden im VIS-Bereich) als Carotinoide identifiziert werden. Eine Aussage über die Art der vorliegenden Carotinoide ist nicht möglich. Da die nicht abgetrennten Carotinoide nur in geringen Mengen vorlagen und damit Aussagen über die Substratspezifität der polyvalenten Peroxidase von *Lepista irina* nicht beeinträchtigt wurden, wurde, auch im Hinblick auf die geringe Stabilität der Carotinoide, auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

Die pro HPLC-Lauf isolierten Mengen an Carotinoiden betragen von 14 μg (Cryptoxanthin) bis zu 207 μg (Capsanthin) (siehe Tab. 2-6). Hierdurch war die Isolierung der für die Enzymtests ausreichenden Carotinoidmengen (200 μg) in wenigen Läufen möglich. Lediglich im Fall des Cryptoxanthins musste die Umsetzung mit einer reduzierten Carotinoidmenge erfolgen (siehe 4.9.2.2).

3.2.2 Optimierung der Umsetzungen

Die Chromatogramme der anfänglich mit den zellfreien Kulturüberständen von *Lepista irina* durchgeführten Umsetzungen der Carotinoide zeigten große Palmitinsäurepeaks, die die Detektion der Carotinoidspaltprodukte erheblich erschwerten (siehe Abb. 2-11 A). Es wurden Lipasen im Medium vermutet, die die Esterbindung des Tween 40 (Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat) unter Freisetzung von Palmitinsäure spalten.

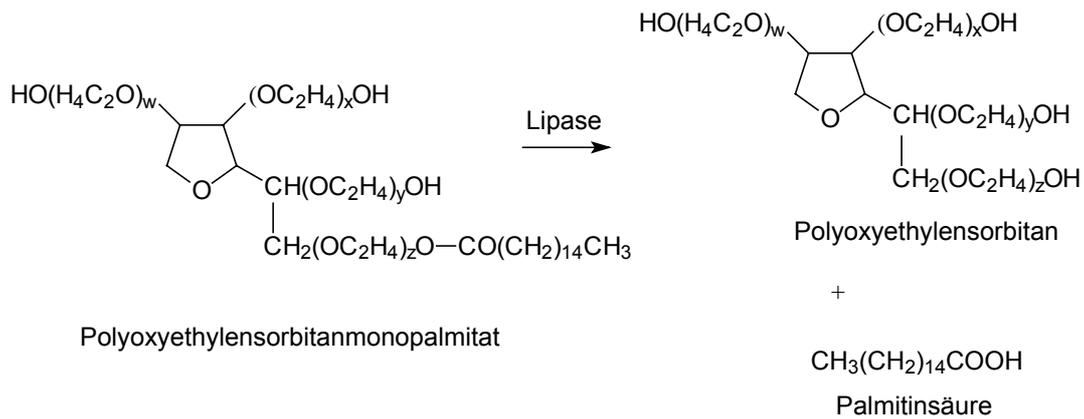


Abb. 3-10 Enzymatische Spaltung von Tween 40 zu Polyoxyethylsorbitan und Palmitinsäure

Es wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Verbesserung der Qualität der Chromatogramme verfolgt. Zum einen wurde Tween 40 durch den von Lipasen nicht spaltbaren Emulgator Triton X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) ersetzt und zum anderen erfolgte die Abtrennung der polyvalenten Peroxidase von den Lipasen mittels FPLC. Die Überprüfung der Qualität der Chromatogramme erfolgte anhand von Umsetzungen mit der Referenzsubstanz β -Carotin.

Durch den Einsatz von Triton X 100 wurde keine Verbesserung der Chromatogramm-Qualität erzielt. Vermutlich enthält der Emulgator Triton X 100 Verunreinigungen, die aus dessen Herstellung resultieren. Der Austausch des Emulgators zeigte keine Auswirkungen auf die β -Carotin-Abbauraten sowie die Menge an gebildetem β -Ionon. Die Emulgierung des β -Carotins und somit die Verfügbarkeit des Substrats für die polyvalente Peroxidase ist durch beide Emulgatoren gleich gut gegeben.

Die Aufreinigung der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* erfolgte in einem Reinigungsschritt mittels präparativer GPC. Es wurde eine deutliche Verbesserung der Chromatogramme erzielt (siehe 2.2.2.2.1). Wahrscheinlich sind die Lipasen schon in diesem Schritt weitgehend von der polyvalenten Peroxidase getrennt worden. Die Umsetzung mit vollständig aufgereinigtem Enzym (siehe 2.2.2.2.2) zeigte keine weiteren Verbesserungen. Die restliche Palmitinsäure, die in der gleichen Größenordnung auch im chemischen Blindwert gefunden wurde, ist vermutlich ein Rückstand der Herstellung.

Die Durchführung der Umsetzungen mit (teil-)aufgereinigtem Enzym bietet neben einer besseren Qualität der GC-Chromatogramme zudem den Vorteil, dass Sekundärreaktionen der primären Spaltprodukte, die von anderen im Medium vorliegenden Enzymen katalysiert werden, weitgehend ausgeschlossen werden können.

3.2.3 Substratspezifität Carotinoid-spaltender Enzyme

3.2.3.1 Substratspezifität von Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen

Carotinoide können durch Prozesse wie Photooxidation und Co-Oxidation unspezifisch gespalten werden. Die Synthese von biologisch aktiven Apocarotinoiden erfordert jedoch einen präziseren Mechanismus (SCHWARTZ et al., 1997). Die selektive Spaltung der Carotinoide erfolgt durch Enzyme. Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen spalten selektiv nur solche Carotinoide, deren Struktur dem späteren biologisch aktiven Apocarotinoid entspricht. Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen zeichnen sich neben einer hohen Substratspezifität auch durch eine hohe Regioselektivität des enzymatischen Angriffes aus.

Carotin-15,15'-Monooxygenasen spalten selektiv die 15-15'-Bindung des β -Carotins. Hierdurch erfolgt die Bildung von Retinal (Abb. 3-11), einem C₂₀-Apocarotinoid. Retinal ist als prosthetische Gruppe des Rhodopsins, einem Chromoprotein in der Retina, an der Umwandlung von Lichtenergie in neurochemische Signale während des Sehprozesses beteiligt. Bei Belichtung kommt es zu einer photochemischen Isomerisierung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal. Die damit einhergehende Konformationsänderung des Rhodopsins führt über eine Reaktionskaskade zum Nervenimpuls.

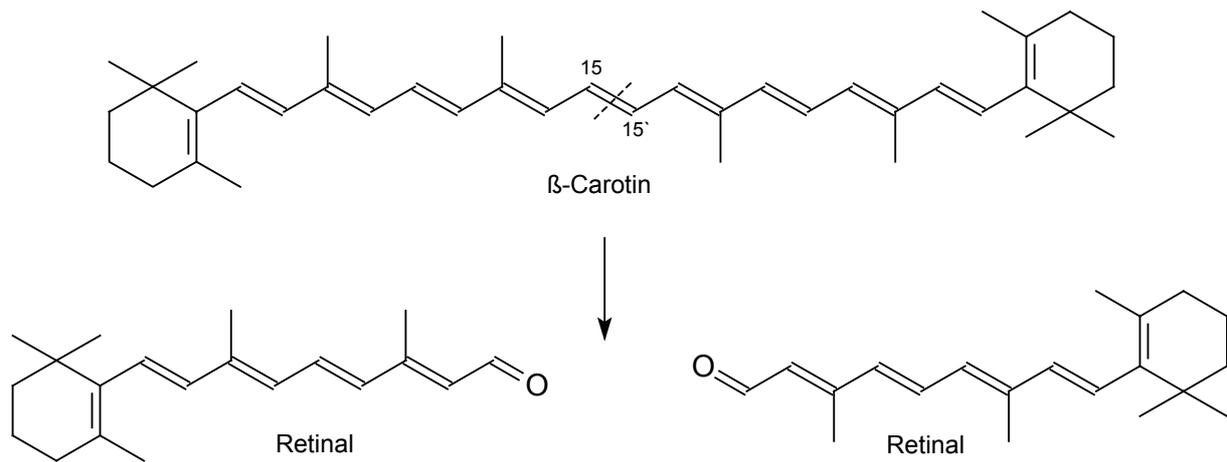


Abb. 3-11 Enzymatische Spaltung von β -Carotin zu Retinal durch Carotin-15,15'-Monooxygenasen

Die Substratspezifität der aus Hühnerdarmschleimhaut (*Gallus gallus*) isolierten β,β -Carotin-15,15'-Monooxygenase ist eingehend untersucht worden (WOGGON, 2000; WIRTZ, 1998). Gespalten wurden neben β -Carotin ausschließlich Carotinoide, die zumindestens einen nicht substituierten β -Ionon-Ring aufweisen, wie Cryptoxanthin, α -Carotin und 3-Oxoechinenon, deren Spaltung somit zu mindestens einem Molekül Retinal führt. Carotinoide mit Substituenten an beiden β -Iononringen wie Lutein, Zeaxanthin, Canthaxantin und Astaxanthin wurden nicht gespalten. Modifikationen an der Polyenkette wie fehlende Methylgruppen oder Änderungen der 15,15'-Bindung (Einfach-, Dreifachbindung, cis-Konfiguration) wurden ebenfalls nicht toleriert. Bei Apocarotinolen wurde eine mit abnehmender Kettenlänge einhergehende Abnahme der Spaltungsaktivität festgestellt. Lycopin als acyclisches Carotinoid wurde nicht gespalten. Die rekombinante Carotin-15,15'-Monooxygenase aus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) spaltet β -Carotin, Zeaxanthin und Neoxanthin dagegen nicht (LINTIG und VOGT, 2000). Die rekombinante β,β -Carotin-15,15'-Monooxygenase aus der Maus (*Mus musculus*) spaltet neben β -Carotin auch Lycopin mit einer schwächeren Aktivität (REDMOND et al., 2001). Die rekombinante humane β,β -Carotin-15,15'-Monooxygenase spaltet β -Carotin und Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Lycopin werden nicht metabolisiert (LINDQVIST und ANDERSSON, 2002).

Pflanzliche 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen (NCEDs) spalten selektiv 9-(Z)-Epoxy-carotinoide an der C₁₁-C₁₂-Bindung, die in direkter Nachbarschaft zur C₉-C₁₀-(Z)-Bindung liegt. Hierdurch entsteht 2-(Z)-4-(E)-Xanthoxin und ein C₂₅-Apocarotinoid. 2-(Z)-4-(E)-Xanthoxin ist Intermediat der Biosynthese von Abscisinsäure, die als pflanzlicher Wachstumsregulator fungiert. Abscisinsäure ist nur in der (Z)-Konfiguration biologisch aktiv (SCHWARTZ et al., 1997; Schwartz et al., 2003).

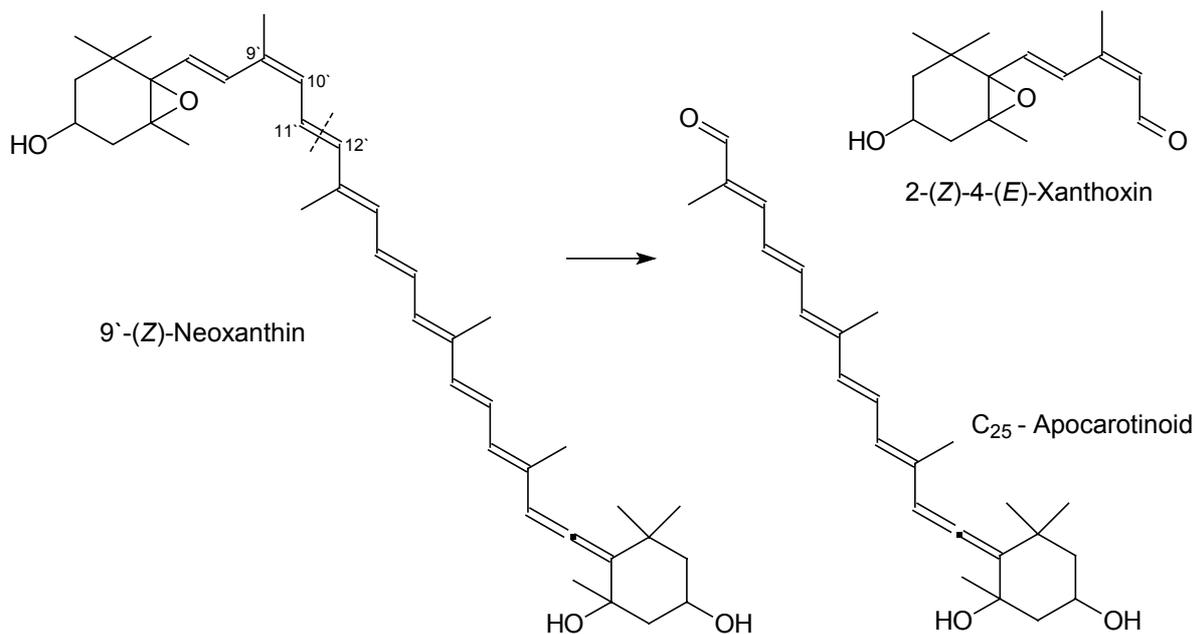


Abb. 3-12 Spaltung von 9-(Z)-Neoxanthin zu Xanthoxin und dem komplementären C₂₅-Apocarotinoid durch 9-(Z)-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen

Die Substratspezifität des rekombinanten Proteins VP 14 (9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenase aus Mais) ist umfassend untersucht worden (SCHWARTZ et al., 2003). Das Enzym spaltet ausschließlich Carotinoide mit 9-(Z)-Bindungen. Eine gewisse Flexibilität ist bezüglich der Substitution des später im Xanthoxinmolekül enthaltenen Hexenyl-Ringes gegeben. Eine Epoxygruppe ist nicht unbedingt erforderlich. So wurden neben den bevorzugten Substraten 9-(Z)-Neoxanthin und 9-(Z)-Violaxanthin, deren Spaltung zu Xanthoxin führt, auch 9-(Z)-Zeaxanthin, 9-(Z)-Lutein und 9-(Z)-Lactucaxanthin umgesetzt. 9-cis-Epoxy-Carotinoid-Dioxygenasen wurden auch in der Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.), der Tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.), der Avocado (*Persea americana* Mill. cv Lula), der Apfelsine (*Citrus sinensis* L.) und der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) nachgewiesen (QIN und ZEEVAART, 1999;

THOMPSON et al., 2000; CHERNYS und ZEEVAART, 2000; KALALA et al., 2001; NEILL et al., 1998).

Auch Spaltungen der Carotinoide an der Bindung zwischen C₉ und C₁₀ werden enzymatisch katalysiert. Die biologische Funktion der entstehenden Apocarotinoide ist noch nicht bekannt (SCHWARTZ, 2001). Die C₁₃-Spaltprodukte bestimmter Carotinoide sind jedoch olfaktorisch aktiv oder stellen Precursoren von Aromastoffen dar.

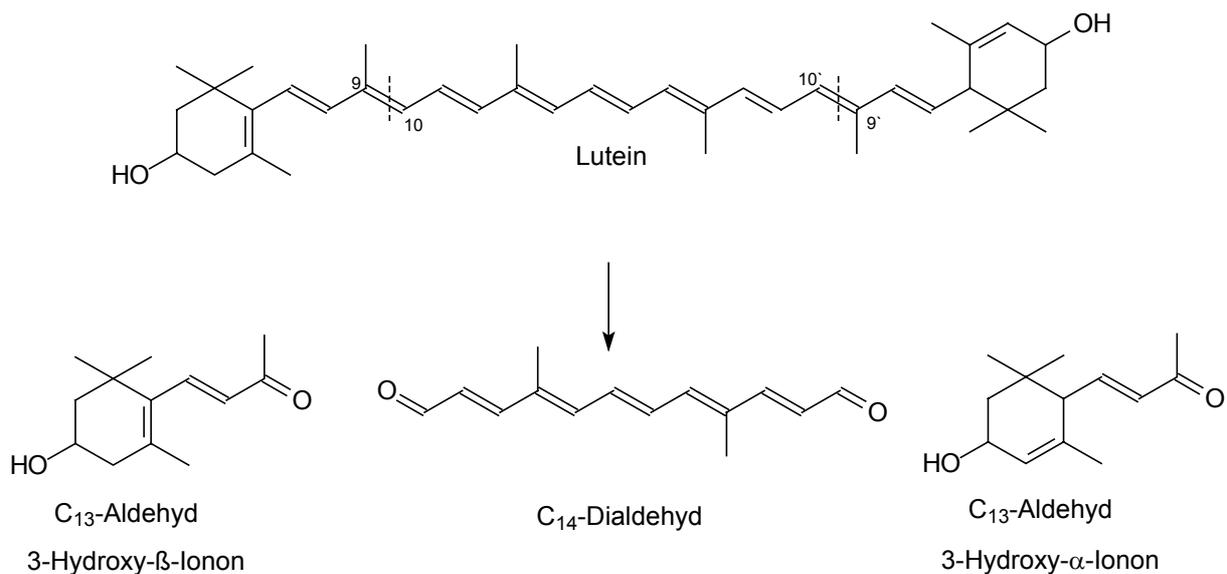


Abb. 3-13 Enzymatische Spaltung von Lutein an den Bindungen zwischen C₉ und C₁₀

Ein rekombinantes Protein der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) spaltet β-Carotin, Lutein, Zeaxanthin und all-trans-Violaxanthin zu dem zentalem C₁₄-Dialdehyd und den jeweiligen C₁₃-Aldehyden. (Z)-Bindungen werden mit verringerter Aktivität gespalten, ebenso Bindungen in Nachbarschaft zu kumulierten Doppelbindungen. Bei Umsetzungen von (Z)-Violaxanthin war das C₂₇-Epoxy-Apocarotinal das Hauptprodukt der Spaltung. Bei Umsetzungen des Enzyms mit (Z)-Neoxanthin wurden sowohl das C₂₇-Epoxy-Apocarotinal als auch das C₂₇-Apocarotinal mit der kumulierten Doppelbindung nachgewiesen (SCHWARTZ et al., 2001). Eine rekombinante 9-10, 9'-10'-Dioxygenase aus Safran (*Crocus sativus* L.) spaltet Zeaxanthin (BOUVIER et al., 2003). Ein rekombinantes Enzym aus der Maus spaltet β-Carotin an der C₉-C₁₀-Bindung zu β-Ionon und dem C₂₇-Apocarotinal. Auch Lycopin wird unter der Bildung von Apocarotinalen gespalten (KIEFER et al., 2001).

Enzymatische Spaltungen der Bindungen zwischen C₇ und C₈ von Carotinoiden sind ebenfalls beschrieben. Ein rekombinantes Protein aus Safran (*Crocus sativus* L.) spaltet Zeaxanthin zu Crocetin-Dialdehyd und 3-Hydroxy-β-Cyclocitral. (Z)- und (E)-Violaxanthin werden nicht umgesetzt (Bouvier, 2003). Eine Dioxygenase aus *Microcystis* katalysiert die gleiche Reaktion. β-Carotin und Zeaxanthin werden gespalten, Echinenon und Myxoxanthophyll nicht (JÜTTNER und HÖFLACHER, 1985).

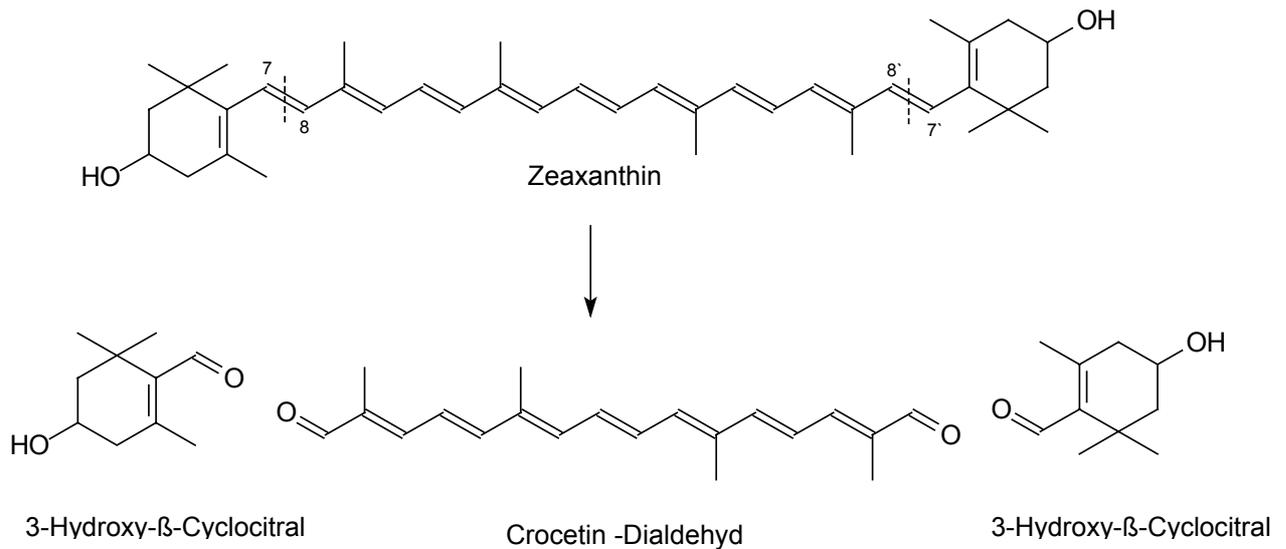


Abb. 3-14 Enzymatische Spaltung der C₇-C₈ Bindung von Zeaxanthin

3.2.3.2 Substratspezifität der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina*

Alle eingesetzten Carotinoide wurden von der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* abgebaut (siehe 2.2.3.1). Als flüchtige Produkte wurden die aus der Spaltung der C₉-C₁₀-Bindungen der jeweiligen Carotinoide resultierenden C₁₃-Ketone β-Ionon, 3-Hydroxy-β-Ionon, 3-Hydroxy-α-Ionon und 3-Hydroxy-β-Ionon-5,6-epoxid nachgewiesen (siehe 2.2.3.2). Im Fall des Lycopins wurde kein flüchtiges Abbauprodukt detektiert. Bei den Umsetzungen von Neoxanthin und Capsanthin waren Grashüpferketon bzw. das einen Cyclopentylring aufweisende C₁₃-Norcarotenoid des Capsanthins nicht nachweisbar.

Gegenüber den teilweise hochspezifischen Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen weist das Carotinoid-spaltende Enzym aus *Lepista irina* eine wesentlich geringere Substratspezifität auf. Während die unter 3.2.3.1 beschriebenen Carotinoid-Mono-

und Dioxygenasen ausschließlich Carotinoide umsetzen, die zur Bildung biologisch aktiver Norcarotinoide führen, akzeptiert die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* alle im Test eingesetzten Carotinoide als Substrat. Die Abbauraten der Carotinoide sowie die Produktbildungsraten waren vergleichbar (siehe Tab. 2-7 und Tab. 2-10).

Die Unterschiede in der Substratspezifität im Vergleich zu den beschriebenen Carotinoid-Mono- und Dioxygenasen lassen sich vermutlich auf die Art des Enzymes aus *Lepista irina* zurückführen. Es handelt sich nicht um eine spezielle Carotinoid-Dioxygenase, sondern um eine polyvalente Peroxidase. Vergleiche von Aminosäuresequenzen des Carotinoid-spaltenden Enzyms aus *Lepista irina* mit Aminosäuresequenzen aus Datenbanken ergaben hohe Homologien zu einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (LANGHOFF, 2002). Polyvalente Peroxidasen katalysieren neben Manganperoxidasen und Ligninperoxidasen den Abbau von Lignin. Sie wurden auch in anderen Basidiomyceten nachgewiesen (MESTER und FIELD, 1998; CAMARERO et al., 1996; SAKAR et al., 1997; HEINFLING et al., 1998). Die dem Carotinoid-spaltenden Enzym aus *Lepista irina* homologe polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* zeichnet sich durch eine geringe Substratspezifität aus. Das Enzym oxidiert Mn^{2+} -Ionen, H_2O_2 , ABTS, Hydrochinone, substituierte Phenole, Naphtholderivate sowie Azo- und Phthalocyaninfarbstoffe. In der Struktur des Proteinmoleküls wurden verschiedene Substratbindungsstellen nachgewiesen (HEINFLING et al., 1998; RUIZ-DUENAS et al., 2001).

Eine ähnlich geringe Substratspezifität ist damit auch bei der homologen polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* wahrscheinlich. Die polyvalenten Peroxidasen metabolisieren nicht ausschließlich Lignin sondern oxidieren unspezifisch auch andere Substrate wie Carotinoide. Diese sind vermutlich durch das im Herbst anfallende Laub auch natürliches Substrat der polyvalenten Peroxidasen. Da der Abbau der Substrate - auch der der Carotinoide - vermutlich der Energie- und Kohlenstoffgewinnung und nicht der Bildung biologisch aktiver Verbindungen dient, werden alle eingesetzten Carotinoide unspezifisch metabolisiert.

Als flüchtige Produkte der Umsetzungen wurden ausschließlich die aus der Spaltung der C_9 - C_{10} -Bindungen des Carotinoidgerüsts resultierenden Nor-Carotinoide nachgewiesen. Carotinoid-Dioxygenasen, die selektiv C_9 - C_{10} -Bindungen spalten sind

beschrieben (siehe 3.2.3.1). In Früchten scheint die C₉-C₁₀-Bindung bevorzugter Ort der enzymatischen Carotinoid-Spaltung zu sein (ENZELL, 1985). Im vorliegenden Fall ist das Vorliegen einer solchen Regioselektivität jedoch nicht abschließend beurteilbar. Auf Grund der gewählten analytischen Bedingungen (GC, HPLC mit UV/VIS-Detektion bei 450 nm) waren nur flüchtige Produkte und die ursprünglichen Carotinoide nachweisbar. Aus Spaltungen anderer Bindungen des Carotinoidgerüsts resultierende längerkettige Apocarotinoide konnten nicht detektiert werden. Umsetzungen der Referenzsubstanz β -Carotin mit der polyvalenten Peroxidase sind jedoch in vorherigen Arbeiten auf längerkettige Apocarotinoide untersucht worden (LANGHOFF, 2002). β -Apo-10'-Carotinal wurde in Spuren nachgewiesen. Dies deutet auf eine initiierte oxidative Spaltung der C₉-C₁₀-Bindung hin. Berechnungen zu molekularen Mechanismen zeigten zudem, dass die oxidative Spaltung der C₉-C₁₀-Bindung von β -Carotin thermodynamisch begünstigt ist (MOHAMED et al., 2001). Zur Klärung der Frage, ob die Spaltung selektiv an der Bindung zwischen C₉ und C₁₀ oder an mehreren Bindungen des Carotinoidgerüsts stattfindet oder ob möglicherweise die gefundenen C₁₃-Norcarotinoide Sekundärprodukte primär entstandener längerkettiger Apocarotinoide sind, ist die Durchführung weiterer Untersuchungen nötig.

Trotz signifikanten Abbaus des Lycopins wurden weder das erwartete Spaltprodukt Pseudoionon noch andere flüchtige Produkte detektiert. Möglicherweise werden durch die Spaltung entstandene acyclische C₁₃-Norcarotinoide im Gegensatz zu cyclischen C₁₃-Norcarotinoiden durch die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* sofort weiteroxidiert. Denkbar ist auch ein bei acyclischen Carotinoiden anders verlaufender Mechanismus der Carotinoidspaltung.

Grashüpferketon, das hypothetische Spaltprodukt der C₉-C₁₀-Bindung des Neoxanthins wurde nicht nachgewiesen, obwohl das Neoxanthin unter den gewählten Bedingungen nahezu quantitativ abgebaut wurde. Auch 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-Epoxid, welches aus der Spaltung zwischen C₉' und C₁₀' resultiert, wurde detektiert. Auf Grund der höheren Hydrophilie des Grashüpferketons und des damit im Gegensatz zu den anderen Norcarotinoiden erhöhten Siedepunktes wurde zunächst vermutet, dass das Apocarotinoid unter den gewählten GC-Bedingungen nicht erfasst werden konnte. Doch auch nach Silylierung mit BSA konnte kein

Grashüpferketon nachgewiesen werden. Möglicherweise verhindert die Modifikation der Polyenkette, die kumulierte Doppelbindung an C₆ bis C₈, die Spaltung der angrenzenden C₉-C₁₀-Bindung. Eine ähnliche Substratspezifität ist für die 9-10,9'-10'-Dioxygenase aus der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) beschrieben (siehe 3.2.3.1).

Bei den Umsetzungen des Capsanthins mit der polyvalenten Peroxidase aus *Lepista irina* wurde das Spaltprodukt der C₉-C₁₀-Bindung mit dem Cyclopentylring trotz effektiven Abbaus des Capsanthins und der Detektion des Spaltproduktes der C₉'-C₁₀'-Bindung, 3-Hydroxy-β-Ionon, nicht nachgewiesen. Möglicherweise ist hier ein enzymatischer Angriff auf die 9-10-Bindung durch die Modifikation des endständigen Ringes - ein Cyclopentylring anstelle eines Hexenylringes - sowie durch die Oxogruppe an der zentralen Polyenkette verhindert.

3.2.4 Aromaeigenschaften der gebildeten C₁₃-Norisoprenoide

Die Spaltung der eingesetzten Carotinoide durch die polyvalente Peroxidase aus *Lepista irina* führte zu den flüchtigen C₁₃-Norisoprenoiden β-Ionon, 3-Hydroxy-β-Ionon, 3-Hydroxy-α-Ionon und 3-Hydroxy-β-Ionon-5,6-epoxid (siehe 2.2.3.2).

Das durch die enzymatische Spaltung von β-Carotin und Cryptoxanthin entstandene β-Ionon ist als Aromastoff bekannt. Die Geruchseindrücke von β-Ionon werden als holzig, blumig und himbeerartig beschrieben (OHLOFF, 1994). Natürlicherweise kommt β-Ionon in den etherischen Ölen der Blüten verschiedener Pflanzen vor, wie vor allem *Viola odorata* L., *Boronia megastigma* Nees. und *Osmanthus fragrans* Lour.. Auch in Früchten, wie beispielsweise der Himbeere (*Rubus idaeus* L. ssp. *idaeus*), wurde β-Ionon nachgewiesen (OHLOFF, 1994; LARSEN und POLL, 1990). Auf Grund des niedrigen Geruchsschwellenwertes und der attraktiven Aromaeigenschaften ist β-Ionon von großem wirtschaftlichen Interesse.

Bei dem durch die Spaltung von Lutein entstandenen 3-Hydroxy-α-Ionon, dem aus Lutein, Zeaxanthin und Capsanthin gebildeten 3-Hydroxy-β-Ionon sowie dem aus Violaxanthin und Neoxanthin entstandenen 3-Hydroxy-β-Ionon-5,6-epoxid handelt es

sich nicht um Aromastoffe. Diese C₁₃-Norcarotinoide stellen jedoch wichtige Aromastoff-Precursoren dar, die – vorwiegend gebunden in glycosidischer Form - in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen wurden. So wurden 3-Hydroxy-β-Ionon und 3-Hydroxy-β-Ionon-5,6-epoxid in Trauben, in verschiedenen Früchten der Gattung *Prunus* (Aprikose, Pfirsich, gelbe Pflaume), im Tabak, in der Sternfrucht, der Quitte (nur 3-Hydroxy-β-Ionon) in Lulo-Früchten (*Solanum quitoense*) und der *Boronia megastigma* Nees. identifiziert (WILLIAMS et al., 1992; KRAMMER et al., 1991; WAHLBERG, 2002; WINTERHALTER und SCHREIER, 1995; LUTZ und WINTERHALTER, 1992; DUQUE et al., 2002; MAC TAVISH et al., 2002). 3-Hydroxy-α-Ionon wurde nicht nachgewiesen, jedoch wurden beispielsweise im Tabak C₁₃-Norisoprenoide gefunden, die als Folgeprodukte des 3-Hydroxy-α-Ionon angesehen werden können (WAHLBERG, 2002).

Zur Überführung der Aromastoff-Precursoren in die jeweiligen Aromastoffe sind verschiedene enzymatische und säurekatalysierte Reaktionen nötig. Anhand von nachgewiesenen C₁₃-Norisoprenoiden wurden Abbauege postuliert, die Oxidationen, Dehydrogenierungen, Reduktionen, Eliminierungen und Umlagerungen beinhalten (WAHLBERG, 2002; WILLIAMS et al., 1992; WAHLBERG und ENZELL, 1987).

In Tabak wurde ausgehend von (3*R*)-3-Hydroxy-α-Ionon ein Syntheseweg postuliert, der zu den vier isomeren Megastigma-4,6,8-trien-3-onen führt, die als „Herz des Tabakaromas“ beschrieben sind (WAHLBERG, 2002) (Abb. 3-15). Zunächst erfolgt die Oxidation von (3*R*)-3-Hydroxy-α-Ionon zu 3-Oxo-α-Ionon, das anschließend zu 3-Oxo-α-Ionol reduziert wird. Durch Umlagerung zu 3-Oxo-retro-α-Ionol und nachfolgender Dehydratisierung entstehen die Megastigma-4,6,8-trien-3-one.

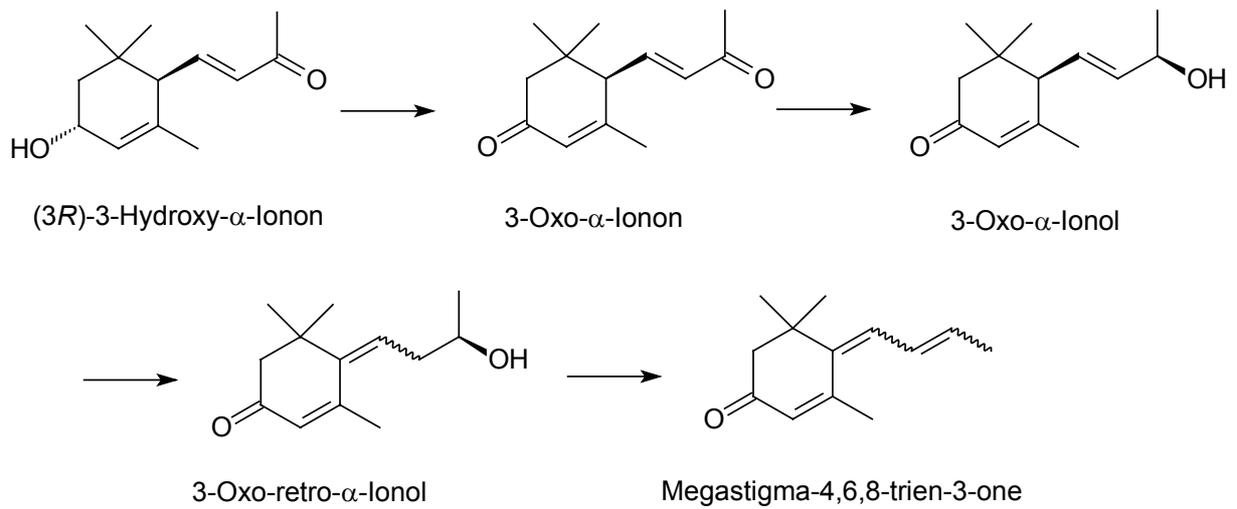


Abb. 3-15 Postulierter Biosyntheseweg der vier isomeren Megastigma-4,6,8-trien-3-one aus (3R)-3-Hydroxy-α-ionon in Tabak (nach WAHLBERG, 2002)

Ausgehend vom 3-Hydroxy-β-ionon-5,6-epoxid ist ein Biosyntheseweg für die Bildung von Vitispiran in Wein postuliert worden (WILLIAMS et al., 1992).

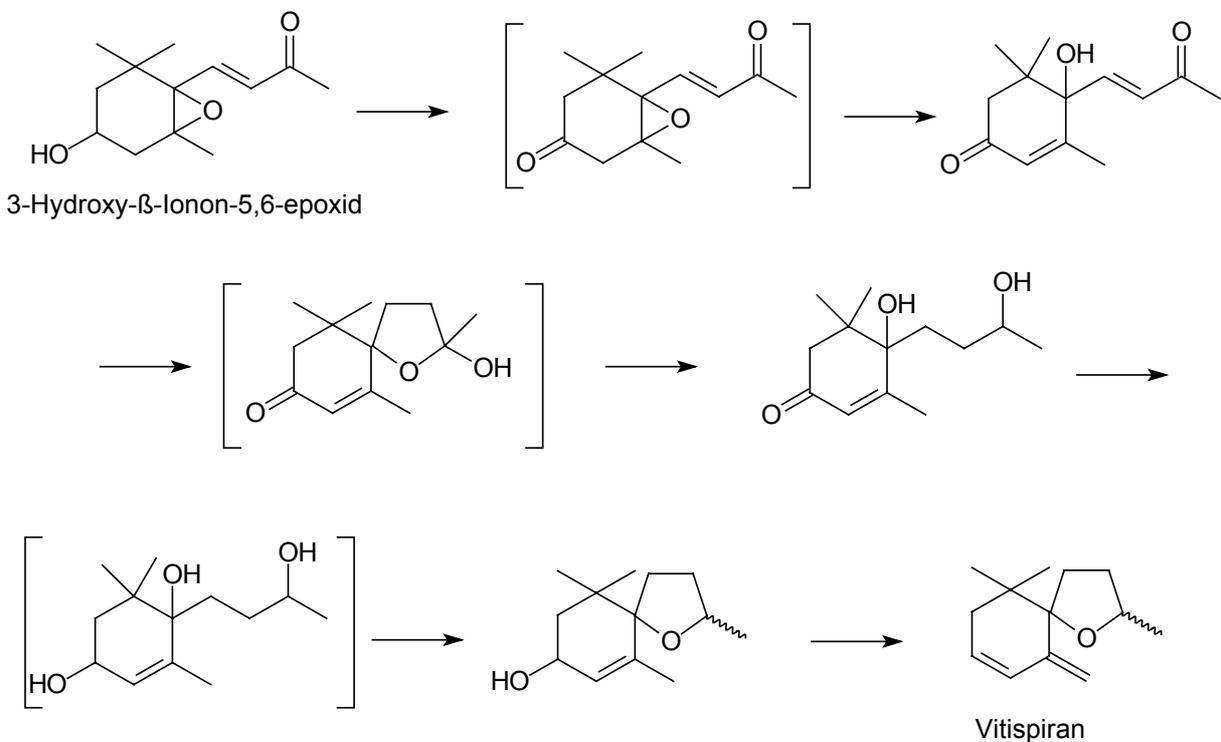


Abb. 3-16 Postulierte Biosynthese von Vitispiran aus 3-Hydroxy-β-ionon-5,6-epoxid in Wein (nicht nachgewiesene, eingefügte Intermediate sind in Klammern angegeben) (nach WILLIAMS, 1992)

Studien zum Abbau von 3-Hydroxy- β -Ionon zeigten die Bildung von 3,4-Didehydro- β -iononen als Hauptprodukte (WINTERHALTER UND SCHREIER, 1995). 3,4-Didehydro- β -Ionon ist als Aromstoff im schwarzem Tee identifiziert worden (SANDERSON und GRAHAM, 1973).

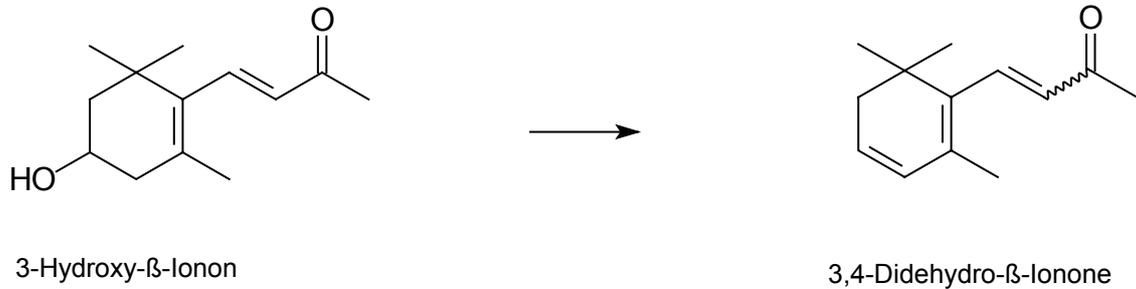


Abb. 3-17 Abbau von 3-Hydroxy- β -Ionon zu 3,4-Didehydroiononen

Ausgehend von den gefundenen C_{13} -Carotinoid-Spaltprodukten 3-Hydroxy- β -Ionon, 3-Hydroxy- α -Ionon und 3-Hydroxy- β -Ionon-5,6-epoxid ist die Bildung weiterer flüchtiger Abbauprodukte beschrieben (WILLIAMS et al., 1992; WAHLBERG, 2002).

3.3 Oxidasescreening

Ziel des Screenings war die Detektion von durch Mikroorganismen gebildeten extrazellulären Oxidoreduktasen, die die Oxidation von Terpenen, Aromaten oder Verbindungen mit Allylgruppen, als typische Stoffklassen von Aromastoffen katalysieren. Hierzu wurden drei Modellsubstanzen - Dimethylallylalkohol (allylischer Alkohol), Limonen (Terpen) und Thymol (Aromat) - mit den zellfreien Kulturmedien verschiedener Pilze umgesetzt.

In den zellfreien Kulturüberständen von *Cyathus striatus*, *Marasmius scorodonius* und *Trametes versicolor* wurden Oxidoreduktase-Aktivitäten nachgewiesen. (E)-Carveol, (Z)-Carveol und 4-Terpineol wurden als Oxidationsprodukte des Modellsubstrates Limonen identifiziert (siehe 2.3.2). Die Ausbeuten an Oxidationsprodukten lagen unter 1 mg L⁻¹ Medium. In den zellfreien Medien der mit Veratrylalkohol und Toluol versetzten Kulturen wurden deutlich geringere Ausbeuten als in den nicht supplementierten Ansätzen erzielt. Zum Teil waren in diesen Ansätzen keine Oxidationsprodukte nachweisbar (siehe Tab. 2-13 bis 2-15).

Cyathus striatus, *Trametes versicolor* und *Marasmius scorodonius* sind Basidiomyceten, die von Holz bzw. von Blättern (*Marasmius scorodonius*) isoliert wurden (DSMZ, 2003). Als Weißfäulepilze bauen sie die Lignocellulose von Pflanzenresten und Holz in der Natur ab. Am Abbau der Lignocellulose sind verschiedene Oxidoreduktasen beteiligt (LEONOWICZ et al., 1999).

Tab. 3-1 Am Abbau der Lignocellulose beteiligte Oxidoreduktasen (nach LEONOWICZ et al., 1999)

Enzym (empfohlener Name)	EC-Nummer
Ligninperoxidase	1.11.1.14
Manganperoxidase	1.11.1.13
Laccase	1.10.3.2
Meerrettich-Peroxidase	1.11.1.7
Protocatechuic-3,4-Dioxygenase	1.13.11.3
Catechol-1,2-Dioxygenase	1.13.11.1
Superoxid Dismutase	1.15.1.1
Glyoxalat Oxidase	1.2.3.5

Enzym (empfohlener Name)	EC-Nummer
Glucose-1-Oxidase	1.1.3.4
Aryl-Alkohol-Oxidase	1.1.3.7
Pyranose-2-Oxidase	1.1.3.10
Cellobiose-Chinon-Oxidoreduktase	1.1.5.1
Cellobiose Dehydrogenase	1.1.99.18

Trametes versicolor ist für die Bildung von Ligninperoxidase, Manganperoxidase und Laccase beschrieben (ROGALSKI et al., 1991). Möglicherweise wurden die im Screening beobachteten Transformationen von Limonen durch Enzyme katalysiert, deren eigentliche physiologische Funktion der Abbau von Lignocellulose, dem natürlichen Substrat von Weißfäulepilzen ist. Diese Enzyme weisen möglicherweise eine geringe Substratspezifität auf, so dass auch Terpene, die auch natürlicherweise im Holz vorhanden sind, oxidiert werden können. Auch eine Katalyse durch andere bislang nicht identifizierte Enzyme ist denkbar.

Alle anderen im Screening eingesetzten Stämme (siehe Tab. 2-11), in deren Proben keine Transformationsprodukte der Modell-Substrate nachgewiesen wurden, hatten im Screening auf Sclareoltransformation in zellhaltigen Ansätzen Sclareol-Transformationsprodukte gebildet (siehe Tab. 2-2). Möglicherweise wurde die Biotransformation von Sclareol durch zelluläre Enzyme katalysiert, die in den hier gewählten Testsystemen nicht vorhanden sind. Denkbar ist auch, dass die Substratspezifität der Sclareol-hydroxylierenden Enzyme die Oxidation der hier eingesetzten Substrate nicht zulässt, oder dass die Bioverfügbarkeit der Modellsubstrate (Einsatz von DMF als Lösungsvermittler) im Gegensatz zu der des Sclareols (emulgiert mit Tween 80) nicht ausreichend war.

Die nachgewiesenen Transformationsprodukte 4-Terpineol, (Z)- und (E)-Carveol werden durch die allylische Hydroxylierung des eingesetzten Modell-Substrates Limonen, einem cyclischen Monoterpenkohlenwasserstoff, gebildet. Allylische Hydroxylierungen von Limonen sind bereits durch verschiedene Mikroorganismen beschrieben. Ein *Pseudomonas*-Stamm, *Penicillium italicum* und *Aspergillus cellulosa* oxidieren Limonen neben anderen Oxidationsprodukten zu Carveol. (DHAVALIKAR und BHATTACHARYYA 1966, BOWEN 1975, NOMA et al. 1992). *Pleurotus sapidus* transformiert Limonen zu (Z)-/(E)-Carveol und Carvon (ONKEN und BERGER

1999). 4-Terpineol entsteht bei der Biotransformation von Limonen durch *Penicillium italicum* (BOWEN, 1975). In allen genannten Fällen wurde mit zellhaltigen Systemen, nicht mit zellfreien Kulturmedien gearbeitet.

Oxidationsprodukte der Modell-Substrate Dimethylallylalkohol und Thymol wurden bei den gescreenten Stämme nicht nachgewiesen. Dimethylallylalkohol und Thymol weisen im Gegensatz zu dem reinen Kohlenwasserstoff Limonen Hydroxylgruppen auf. Hierdurch ist eine höhere Wasserlöslichkeit und damit eine erhöhte Bioverfügbarkeit gegeben. Möglicherweise verhindert jedoch die Substratspezifität der gebildeten Oxidasen die Transformation der beiden Substrate. Dimethylallylalkohol und Thymol wurden im Screening als Modellsubstanzen für allylische und aromatische Verbindungen eingesetzt. Die grundsätzliche Fähigkeit der gebildeten Oxidasen zur Transformation dieser Verbindungsklassen kann nicht ausgeschlossen werden und muss durch weitere Untersuchungen mit anderen Substraten geklärt werden.

Die Konzentrationen der im Screening nachgewiesenen Transformationsprodukte waren gering ($< 1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ Medium). Ob dieser Befund auf geringe Oxidaseaktivitäten oder auf andere Ursachen zurückzuführen ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ein möglicher Grund neben geringen Oxidaseaktivitäten könnte die geringe Wasserlöslichkeit des Limonens von $20,4 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sein. In den zellfreien Medien liegen damit von der eingesetzten Limonenkonzentration ($108 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, siehe 4.3.2.2) nur 19 % des eingesetzten Limonens in gelöster, für die Enzyme zugänglicher Form vor. Als problematisch könnte sich zudem die hohe Flüchtigkeit des Limonens erweisen (Der Dampfdruck von Limonen beträgt bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ $0,20 \text{ kPa}$ (WEIDENHAMMER et al., 1993).

Toluol und Veratrylalkohol hatten in anderen Arbeiten eine induzierende Wirkung auf die Oxidasebildung der Mikroorganismen *Phlebia radiata* und *Rhodococcus opacus* gezeigt (Kantellinen et al., 1989; DUETZ et al., 2001). Bei den im vorliegenden Screening getesteten Stämme wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen. Die Ausbeuten an Oxidationsprodukten in den mit Toluol und Veratrylalkohol versetzten Ansätzen waren sogar deutlich geringer. In einigen Fällen wurden keine Oxidationsprodukte nachgewiesen (siehe Tab. 2-13 bis 2-15). Möglicherweise haben

Veratrylalkohol und Toluol eine toxische Wirkung auf die getesteten Pilzstämmen. Als lipophile Aromaten können sie sich in die Lipiddoppelschichten der Membranen einlagern und damit deren Funktionen wie beispielsweise Stofftransporte sowie die Anordnung membrangebundener Enzymkomplexe stören.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

4.1.1 Mikroorganismen

Tab. 4-1 Verwendete Mikroorganismen

Art	Kultursammlung	Stammnummer
<i>Arthrobacter oxydans</i>	DSM	6612
<i>Arthrobacter simplex</i>	DSM	20130
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CBS	447.62
<i>Chaetomium globosum</i>	DSM	1962
<i>Cryptococcus curvatus</i>	DSM	70022
<i>Cryptococcus laurentii</i>	DSM	70766
<i>Cryptococcus macerans</i>	DSM	70822
<i>Cryptococcus terreus</i>	DSM	43066
<i>Cunninghamella echinulata</i>	DSM	1905
<i>Cyathus africanus</i>	DSM	1593
<i>Cyathus striatus</i>	DSM	1652
<i>Cystoderma carcharias</i>	CBS	157.47
<i>Fomitopsis pinicola</i>	DSM	4957
<i>Ganoderma applanatum</i>	CBS	250.61
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	CBS	444.61
<i>Gordonia rubripertincta</i>	DSM	43248
<i>Hyphozyma lignicola</i>	CBS	325.93
<i>Hyphozyma sanguina</i>	CBS	406.52
<i>Hyphozyma roseoniger</i>	CBS	214.83
<i>Hyphozyma variabilis var. odora</i>	CBS	328.80
<i>Hyphozyma variabilis var. variabilis</i>	CBS	330.78
<i>Hypomyces odoratus</i>	CBS	764.68
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	CBS	311.29
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS	2359

<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	DSM	1013
<i>Lentinellus cochleatus</i>	FSU	L 13-2
<i>Lentinus lepideus</i>	CBS	581.63
<i>Lepista irina</i>	CBS	458.79
<i>Lepista nuda</i>	CBS	300.53
<i>Marasmius scorodoni</i>	CBS	850.87
<i>Omphalotus olearius</i>	DSM	3398
<i>Paxillus involutus</i>	CBS	477.89
<i>Penicillium citrinum</i>	DSM	1179
<i>Penicillium digitatum</i>	DSM	2748
<i>Penicillium italicum</i>	DSM	2755
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	DSM	5136
<i>Phellinus igniarius</i>	DSM	4818
<i>Phellinus pini</i>	DSM	5238
<i>Phlebia radiata</i>	DSM	5111
<i>Pholiota populnea</i>	CBS	264.32
<i>Pholiota squarrosa</i>	CBS	570.87
<i>Pleurotus eous</i>	DSM	5331
<i>Pleurotus sapidus</i>	DSM	8266
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NCIMB	11671
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM	12585
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM	43066
<i>Rhodococcus sp.</i>	DSM	43287
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS	3008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	1250
<i>Talaromyces emersonii</i>	DSM	2432
<i>Thelebolus caninus</i>	CBS	710.69
<i>Thelebolus microsporus</i>	CBS	115.53
<i>Thelebolus psychrophilus</i>	CBS	375.58
<i>Thelebolus stercoreus</i>	CBS	265.67
<i>Trametes hirsuta</i>	CBS	282.73
<i>Trametes suaveolens</i>	DSM	5237
<i>Trametes versicolor</i>	Wag.	EIK 39

Kultursammlungen:

- CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
- DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- FSU = Pilzkultursammlung der Friedrich Schiller Universität, Weimar
- Wag. = Landwirtschaftliche Universität, Wageningen
- NCIMB = National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, Schottland

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
Pepton	f. Mikrobiol.	Fluka
Agar-Agar	f. Mikrobiol.	Merck
KH ₂ PO ₄	f. Mikrobiol.	Merck
K ₂ HPO ₄	99 %	Merck
MgSO ₄	Chem. rein DAB 7	Riedel-de-Haën
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	99 %	Baker
NH ₄ NO ₃	> 98,5 %	Merck
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	99,5 %	Merck
NaCl	> 99,5 %	Merck
Borsäure	99,8 %	Riedel-de-Haën
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-de-Haën
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	puriss. p.a.	Fluka
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	> 98 %	Fluka
MnSO ₄ x H ₂ O	99 %	Merck
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	99 %	Baker
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	99 %	Merck
SeO ₂	98 %	Merck
KI	99,5 %	Merck
Ammoniummolybdat	> 99 %	Fluka
Titriplex III	> 99 %	Merck

Tab. 4-3 Substrate und Referenzsubstanzen

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Ambrox	-	BASF/P&G
Campher	p.a.	Roth
β -Carotin	> 97 %	Fluka
Dimethylallylalkohol	> 97 %	Merck
β -Ionon	95 %	Fluka
<i>R</i> -(+)-Limonen	98	Fluka
Neoxanthin	1,137 mg L ⁻¹	DHI ^a
Sclareol	-	Adrian
Sclareolid	97 %	Aldrich
α -Terpineol	99 %	Fluka
Thymol	99,5 %	Sigma
Veratrylalkohol	96 %	Aldrich
Violaxanthin	0,6 mg L ⁻¹	DHI

^a DHI Water and Environment, Hørsholm, Dänemark

Tab. 4-4 Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid	97 %	Fluka
Citronensäure Monohydrat	puriss. p.a.	Fluka
Glycerol	99 %	Merck
KOH	p.a.	Riedel-de-Haën
LiAlH ₄	> 97 %	Fluka
NaCl	> 99,5 %	Merck
NaHCO ₃	reinst	Riedel-de-Haën
NaOH	reinst	Riedel-de-Haën
Na ₂ SO ₄	98 %	Riedel-de-Haën
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	p.a.	Fluka
(NH ₄) ₂ SO ₄	99,5 %	Merck
H ₂ SO ₄	90 %	Merck
Triton X 100	-	Sigma
Tween 40	-	Sigma
Tween 80	-	Fluka

4.1.3 Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Fassware) wurden vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt.

Tab. 4-5 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Verwendung	Qualität	Herkunft
Aceton	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Acetonitril	HPLC	HPLC	Promochem
Dichlormethan	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Dichlormethan	HPLC	HPLC	Baker
DMF	Lösungsvermittler	HPLC	Roth
Ethanol, unvergällt	Kultivierung	redest.	Kraul und Wilkening
Ethanol	Photometrie	HPLC	Roth
Ether	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Ethylacetat	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Ethylacetat	HPLC	HPLC	Roth
Hexan	HPLC	HPLC	Roth
Methanol	Verseifung	redest.	Hochschullieferung
Methanol	HPLC	HPLC	Baker
Pentan	Extraktion	redest.	Hochschullieferung
Petrolether	Photometrie	HPLC	Roth
Toluol	Induktion	HPLC	Roth

4.1.4 Gase

Tab. 4-6 Gase

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

^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 Sonstige Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaage	SBC	Scaltec
Autoklav	VST 50/70	Zirbus
Brutschrank	BE 500	Memmert
Gefrierschrank	VX 350 Series 2	Jouan
Kältezelle	CS 0900 S	Viessmann
Kühlschrank	KS 1300 E	Foron
Lichtmikroskop	Will H-500	Hund GmbH
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
Mixer	Rotor GT 800	
pH-Meter	731 Calimatic	Knick
Power Supply 2		Bio Rad
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi
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
Waage	BL 610	Satorius
Wasserbad	Julabo 20 B	Julabo
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus
Zentrifuge	Sorvall RT7 Plus	Kendro

4.2 Mikrobiologie

4.2.1 Kulturmedien

Nr. 1 Standard-Nähr-Agar (SNA)

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 I	1,0	mL L ⁻¹

Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH

Nr. 2 Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Agar (HPG)

D(+)-Glucose-Monohydrat	40	g L ⁻¹
Pepton	5,0	g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0	g L ⁻¹
Agar-Agar	15	g L ⁻¹

Nr. 3 Sclareol-Agar (A): emulgiertes Sclareol

NH ₄ NO ₃	1,0	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,5	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,2	g L ⁻¹
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1	g L ⁻¹
NaCl	0,1	g L ⁻¹
Agar-Agar	15	g L ⁻¹
Sclareol	0,5	g L ⁻¹
Triton X 100	3,75	g L ⁻¹
Spurenelementlösung III	1	mL L ⁻¹

Nr. 4 Sclareol-Agar (B): "festes" Sclareol

Wie Agar Nr. 3 ohne Zugabe von Sclareol und Triton X 100. Nach dem Gießen der Platten wurden 15 mg Sclareol in 100 µL Ethanol gelöst und direkt auf die Oberfläche jeder Platte gegeben. Das Ethanol wurde bei Raumtemperatur abgedampft.

Nr. 5 Standard-Nähr-Medium (SNL)

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 I	1,0	mL L ⁻¹

Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH

Nr. 6 Standard-Nähr-Medium supplementiert mit Kobalt und Selen

Wie Medium Nr. 5, aber Ersatz der Spurenelementlösung I durch Spurenelementlösung II.

Nr. 7 Mineralsalzmedium

NH ₄ NO ₃	1,0	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1,0	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,5	g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2	g L ⁻¹
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1	g L ⁻¹
NaCl	0,1	g L ⁻¹
Spurenelementlösung III	1,0	mL L ⁻¹

Spurenelementlösung I

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09	g L ⁻¹
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08	g L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03	g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005	g L ⁻¹
Titriplex III	0,4	g L ⁻¹

Spurenelementlösung II

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g L ⁻¹
SeO ₂	0,007 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
Titriplex III	0,4 g L ⁻¹

Spurenelementlösung III

Borsäure	0,05 g L ⁻¹
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,04 g L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,04 g L ⁻¹
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,02 g L ⁻¹
Ammoniummolybdat	0,02 g L ⁻¹
KI	0,01 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,004 g L ⁻¹
Titriplex III	0,4 g L ⁻¹

4.2.2 StammhaltungPilze

Von jedem verwendeten Pilz-Stamm wurden zwei Stammkulturen auf Standard-Nähr-Agar gehalten. Die Kulturen wurden in einem Abstand von 6 Monaten periodisch überimpft. Hierzu wurden etwa 1 cm² große Stücke der alten Kulturen auf neue Agarplatten übersetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C bis zu ausreichendem Wachstum des Pilzmycels. Die Stammkulturen wurden bei +4 °C gelagert.

Hefen

Die Hefen wurden in Schrägagarröhrchen auf HPG-Agar gehalten. In Abständen von 6 Monaten wurden die Kulturen in neue Schrägagarröhrchen überführt. Die Kultivierung der Hefen erfolgte bei 24 °C je nach Wachstum des Stammes über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen. Die angewachsenen Kulturen wurden bei +4 °C gelagert.

Bakterien

Bakterien wurden als Gefrierkulturen gelagert. Hierzu wurden 10 mL einer angewachsenen SNL-Submerskultur mit 4,5 mL einer sterilen Glycerin/Medium(SNL)-Mischung (1:1) versetzt. Aliquots (1 mL) dieser Zellsuspensionen wurden in Eppendorfcaps bei - 80 °C gelagert.

4.2.3 Naturisolate

4.2.3.1 Isolierung von Bodenbakterien

Die Isolierung der Bodenbakterien erfolgte mittels Anreicherungskultur auf Sclareol enthaltenden Selektivnährböden. Die Bodenproben wurden in einer Tiefe von 0-10 cm unter der Erdoberfläche entnommen und in sterile, mit Wattestopfen verschlossene Kulturkolben überführt. 2 g der jeweiligen Probe wurden in 50 mL 0,9 % Kochsalzlösung suspendiert und zur Abtrennung der Bodenpartikel über ein steriles Faltenfilter gegeben. Das Filtrat wurde zentrifugiert (3300 g, 5°C, 10 min), der Überstand verworfen und das zurückbleibende Bakterienpellet in 300 µL 0,9 % Kochsalzlösung resuspendiert. Je 100 µL dieser Zellsuspensionen wurden auf Sclareolagar A und B ausplattiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 24 °C im Brutschrank bis zur deutlich sichtbaren Koloniebildung. Zur Herstellung von Reinkulturen wurde dreimal ein Verdünnungsausstrich einzelner Bakterienkolonien auf dem zugehörigen Sclareolagar durchgeführt. Die so erhaltenen Kulturen wurden durch periodisches Überimpfen auf den jeweiligen Sclareolagar sowie ausgehend von den nach 4.2.4.2 angezogenen Vorkulturen als Gefrierkulturen (siehe 4.2.2) aufbewahrt.

4.2.3.2 Isolierung von Bakterien der Pflanze *Salvia sclarea* L.

Zur Isolierung der Bakterien wurden von Blättern, Blüten und Stiel der Pflanze *Salvia Sclarea* L. Abdrücke auf Sclareolagar A und B hergestellt. Die Agarplatten wurden bei 24 °C bis zur deutlich sichtbaren Koloniebildung inkubiert. Die Herstellung von Reinkulturen und die Aufbewahrung der isolierten Bakterien erfolgte analog zu 4.2.3.1.

4.2.4 Kulturführung

Alle Submerskultivierungen wurden bei 24°C, 150 rpm und unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden 300 mL Kulturkolben mit 100 mL Kulturmedium verwendet.

4.2.4.1 Sclareolscreening mit definierten Mikroorganismen

Pilze

Zur Inokulation der Vorkultur wurde ein etwa 1 cm² großes Agar-Stück der jeweiligen Stammkultur in 100 mL SNL-Medium überführt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes ein bis drei Wochen. Die experimentellen Kulturen wurden durch Inokulation von 100 mL SNL-Medium mit 10 mL homogenisierter Vorkultur hergestellt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen.

Hefen

Zur Herstellung der Vorkultur wurden Hefezellen direkt von der Schrägagarkultur in 100 mL SNL-Medium überführt und zwei Tage kultiviert. Die experimentellen Kulturen wurden durch Inokulation von 100 mL SNL-Medium mit 10 mL Vorkultur angesetzt. Die Kultivierung der Hefen erfolgte analog zu der der Pilze über einen Zeitraum von zwei Wochen.

Bakterien

Die nach 4.2.2 hergestellten Gefrierkulturen wurden im Wasserbad bei 24°C aufgetaut. Zellmaterial wurde entnommen und auf SNL-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 24 °C über einen Zeitraum von

24 Stunden. Zur Herstellung der Vorkulturen wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 100 mL SNL-Medium überführt und 24 h kultiviert. Die experimentellen Kulturen wurden durch Inokulation von 100 mL SNL-Medium mit 10 mL Vorkultur hergestellt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen.

4.2.4.2 Sclareolscreening mit Naturisolaten

Von den nach 4.2.3 hergestellten Reinkulturen auf Sclareolagar A und B wurde zur Herstellung der Vorkulturen jeweils eine Kolonie in einen 50 mL Mineralsalzmedium enthaltenden 200 mL Erlenmeyerkolben überführt. Die ausgehend von Sclareolagar A hergestellten Vorkulturen wurden mit 15 mg Sclareol und 100 mg Triton X 100 gelöst in 1 mL Ethanol supplementiert; die ausgehend von Sclareolagar B hergestellten Vorkulturen wurden mit 15 mg Sclareol gelöst in 1 mL Ethanol versetzt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen. Zur Herstellung der experimentellen Kulturen wurden 100 mL Mineralsalzmedium mit 10 ml der Vorkultur inokuliert. Die experimentellen Bakterienkulturen wurden vier Tage kultiviert.

Kultivierung mit erhöhter Zelldichte

Die Herstellung der Vorkultur sowie die Inokulation der experimentellen Kultur erfolgte wie oben beschrieben. Die experimentelle Kultur wurde zunächst unter ausschließlicher Zugabe von 1 mL Ethanol ohne Sclareol angezogen. Am 4. Kulturtag wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation vom Medium getrennt. Mit dem erhaltenen Bakterienpellet wurde die zweite experimentelle Kultur (100 mL Mineralsalzmedium) angeimpft, die nach der Zugabe von 15 mg Sclareol gelöst in 1 mL Ethanol über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert wurde.

4.2.4.3 Oxidasescreening

Zur Herstellung der Vorkultur wurde ein etwa 1 cm² großes Agar-Stück der jeweiligen Stammkultur in 100 ml SNL-Medium (Nr. 6, supplementiert mit Kobalt und Selen) überführt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes ein bis drei Wochen. Zur Inokulation der experimentellen Kulturen wurden 10 mL homogenisierte Vorkultur in einen 250 mL

SNL-Medium Nr. 6 enthaltenden 500 mL Kulturkolben pipettiert. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von neun Tagen.

4.2.4.4 Kultivierung von *Lepista irina*

Ein etwa 1 cm² großes Agar-Stück der bis zu vier Wochen alten Stammkultur wurde in 100 mL SNL-Medium überführt und homogenisiert. Die Vorkultur wurde sieben Tage kultiviert. Zur Herstellung der experimentellen Kulturen wurden 10 mL Vorkultur ohne vorherige Homogenisation in einen 250 mL SNL-Medium enthaltenden 500 mL Kulturkolben pipettiert. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von zehn Tagen.

4.2.5 Bestimmung einiger Kulturparameter

4.2.5.1 pH-Wert

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

4.2.5.2 Glucose-Gehalt

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

4.2.5.3 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.

4.2.5.4 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit

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

4.2.5.5 Test auf Peroxide

Der Gehalt des Mediums an Peroxiden wurde direkt nach der Probenahme mit Peroxidteststreifen, Merck Test Peroxydes (Merck) abgeschätzt.

4.3 Screening

4.3.1 Sclareoltransformation

4.3.1.1 Synthese der Referenzsubstanz 1-(2-Hydroxy-ethyl)-2,5,5,8a-tetramethyl-decahydro-naphthalen-2-ol ("Diol")

Ambrox und Sclareolid standen als Referenzsubstanzen zur Verfügung. Das Diol wurde ausgehend vom Sclareolid synthetisiert: 40 mL einer 0,4 M Lösung von Sclareolid in Ether wurden tropfenweise und unter Kühlung zu 20 mL einer 0,4 M Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in Ether gegeben. Die Mischung wurde unter Rückflusskühlung 4 h gerührt und anschließend mit Eiswasser versetzt, bis kein Wasserstoff mehr entwickelt wurde. Der entstandene Aluminiumhydroxid-Niederschlag wurde durch Zugabe von 10 % Schwefelsäure gelöst. Nach der Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase dreimal mit 50 mL Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Umsatz: 100 % (GC-MS). Zur Aufnahme von Massenspektren wurden die Standards in die GC-MS injiziert. Mittels GC-FID wurden für Sclareolid und Ambrox die Nachweisgrenzen bestimmt.

4.3.1.2 Überprüfung des Screeningverfahrens mit *Hyphozyma roseoniger*

Der Referenzstamm aus US Patent Nr. 4,798,799 *Hyphozyma roseoniger* CBS 214,83 wurde wie in 4.2.4.1 beschrieben kultiviert. Nach dreitägigem Anwachsen wurde die experimentelle Kultur mit einer Lösung aus 20 mg Sclareol und 70 mg Tween 80 in 1 mL Ethanol versetzt. Ab dem Zeitpunkt der Substratdosierung wurden über den gesamten Kulturverlauf jeden zweiten Tag 10 mL Probe entnommen. Das Medium wurde von den Hefezellen durch Zentrifugation (3300 g, 5°C, 20 min) getrennt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -18 °C gelagert. Die Isolierung der Transformationsprodukte erfolgte nach 4.3.3.1.

4.3.1.3 Screening von definierten Mikroorganismen

Die nach 4.2.4.1 angesetzten experimentellen Pilz- und Hefekulturen wurden am 3. Kulturtag mit einer Lösung aus 20 mg Sclareol und 70 mg Tween 80 in 1 mL

Ethanol versetzt. Ab dem Zeitpunkt der Substratdosierung wurde über den gesamten Kulturverlauf jeden zweiten Tag 10 mL Probe entnommen. (Die Probenahme am Tag der Substratdosierung erfolgte ausschließlich zur Bestimmung der Trockenmasse). Das Medium wurde in Abhängigkeit von der Viskosität der Probe entweder durch Absaugen oder durch Zentrifugation (3300 g, 5°C, 20 min) vom Pilzmycel bzw. den Hefezellen getrennt und bis zur Aufarbeitung bei -18 °C gelagert. Bei jeder Probenahme erfolgte die Bestimmung der Kulturparameter nach 4.2.5.1 bis 4.2.5.4. Die Isolierung der Transformationsprodukte erfolgte nach 4.3.3.1.

Bei den nach 4.2.4.1 angesetzten experimentellen Bakterienkulturen erfolgte die Zugabe der Lösung aus 20 mg Sclareol und 70 mg Tween 80 in 1 mL Ethanol bereits am 2. Kulturtag. Die Probenahme wurde am 3. Kulturtag durchgeführt. Das gesamte Probevolumen wurde zur Trennung des Mediums von den Bakterienzellen zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min). Die Bestimmung der Kulturparameter erfolgte nach 4.2.5.1 bis 4.2.5.4. Die Isolierung der Transformationsprodukte erfolgte gemäß 4.3.3.1.

Zur Unterscheidung der Transformationsprodukte des Sclareols von möglichen Abbauprodukten des Tweens bzw. *de novo* synthetisierten Produkten der Mikroorganismen wurde für jeden verwendeten Stamm eine Kultivierung unter Zugabe von 70 mg Tween 80 in 1 mL Ethanol - ohne Sclareol - analog den oben beschriebenen Verfahren mitgeführt. Als chemischer Blindwert diente nicht beimpftes Standard-Nähr-Medium, das analog den oben beschriebenen Verfahren behandelt wurde.

4.3.1.4 Screening von Naturisolaten

Die nach 4.2.4.2 angesetzten experimentellen Bakterienkulturen von Sclareolagar A wurden sofort nach der Inokulation mit einer Lösung aus 50 mg Sclareol und 400 mg Triton X 100 in Ethanol versetzt, die nach 4.2.4.2 angesetzten experimentellen Bakterienkulturen von Sclareolagar B wurden sofort nach der Inokulation mit 50 mg Sclareol gelöst in 1 mL Ethanol supplementiert. Die Probenahme erfolgte am 4. Kulturtag. Die gesamte Kultur wurde zur Trennung von Medium und Bakterien zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min). Die Isolierung der Transformationsprodukte erfolgte nach 4.3.3.1. Blindwerte wurden ohne Sclareol, bei den Kulturen von

Sclareolagar A unter Zugabe von 400 mg Triton X 100 in Ethanol, bei den Kulturen von Sclareolagar B unter Zugabe von 1 mL Ethanol, für jeden Stamm mitgeführt. Als chemischer Blindwert diente nicht beimpftes Mineralsalzmedium, das analog den oben beschriebenen Verfahren behandelt wurde.

4.3.2 Oxidasescreening

4.3.2.1 Induktion und Probenahme

Eine Induktion wurde bei zwei von den nach 4.2.4.3 angesetzten experimentellen Kulturen des jeweils verwendeten Stammes durchgeführt. Hierzu wurden die Kulturen am 3. Kulturtag mit 50 µL Toluol bzw. 50 µL Veratrylalkohol versetzt. Zwei weitere Kulturen dienten als Ansatz ohne Induktion bzw. als Blindwert und wurden in der gleichen Weise behandelt wie die induzierten Kulturen.

Am 5. Kulturtag wurden 100 mL Medium steril entnommen und zur Trennung von Medium und Mycel zentrifugiert (3300 g, 5°C, 20 min). Das zellfreie Medium wurde bis zur Verwendung für die Oxidaseassays nach 4.3.2.2 bei -18 °C gelagert. Am 9. Kulturtag wurde die restliche Kultur (150 mL) in gleicher Weise aufgearbeitet und gelagert. Die Bestimmung der Kulturparameter erfolgte nach 4.2.5.1 bis 4.2.5.4. Der Test auf Peroxide im Medium wurde nach 4.2.5.5. durchgeführt.

4.3.2.2 Oxidaseassay

Zur Durchführung des Oxidaseassays wurden die am 5. und 9. Kulturtag entnommenen zellfreien Kulturüberstände der jeweiligen Kulturen vereinigt (Gesamtvolumen des jeweiligen Ansatzes: 100 mL). Die Kulturüberstände der beiden induzierten Kulturen sowie der Kulturüberstand der nicht induzierten Kultur jedes Stammes wurden mit 4 mL DMF sowie 200 µL einer ethanolischen 0,4 molaren Lösung der Substrate Thymol, Limonen und Dimethylallylalkohol versetzt. Der Kulturüberstand des Blindwertes wurde unter Zugabe von 4 mL DMF ohne Substratdosierung mitgeführt. Als chemischer Blindwert diente 100 mL SNL-Medium Nr. 6, das unter Zugabe von DMF und der Substrate analog behandelt wurde. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 24 °C und 150 rpm über einen Zeitraum von 12 Stunden. Die Isolierung der Transformationsprodukte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion wurde gemäß 4.3.3.2 durchgeführt.

4.3.3 Isolierung der Transformationsprodukte

4.3.3.1 Sclareolscreening

Die Isolierung der Transformationsprodukte erfolgte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion. Die Proben jeder Kultivierung wurden vereinigt und dreimal mit jeweils 50 mL eines Pentan/Ether-Gemisches ($v/v = 1:1,12$) extrahiert. 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 über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreuxkolonne bei 40 °C Badtemperatur und Normalruck bis auf 2 mL aufkonzentriert. Die Proben wurden mittels GC-FID und GC-MS auf Transformationsprodukte untersucht.

4.3.3.2 Oxidasescreening

Nach dem Oxidaseassay wurden die Proben analog zu 4.3.3.1 aufgearbeitet. Als interner Standard wurde 1 mL einer 0,13 mM ethanolischen Campherlösung zugegeben. Die Analyse der Proben erfolgte mittels GC-FID und GC-MS.

4.4 Chromatographie

4.4.1 Gaschromatographie (GC)

4.4.1.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

Gaschromatograph:	Fisons series 8000
Injektor:	Split-Splitless (1:10), Splitöffnung nach 1 min Injektionsvolumen: 2 µL
Trennsäule:	DB 5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (J & W)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Gase:	Trärgas: H ₂ , Vordruck 50 kPa Detektorgase: H ₂ , 50 kPa ; Luft, 100 kPa
Datenaufnahme:	Chrom Card Version 1.19 (CE Instruments)

Temperaturprogramme

Sclareoltransformation:	80 °C - 10°C min ⁻¹ - 280°C (10 min) Injektor: 250°C Detektor: 280°C
Oxidasescreening:	40°C (5 min) - 4°C min ⁻¹ - 280°C (10 min) Injektor: 220°C Detektor: 280°C
Carotinoidabbauprodukte:	50°C (5 min) - 4°C min ⁻¹ - 250°C (10 min) Injektor: 220°C Detektor: 250 °C

4.4.1.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor

Gaschromatograph:	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor:	Split-Splitless (1:10), Splitöffnung nach 1 min Injektionsvolumen: 1 µL
Trennsäule:	CP - 5 CB; 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Varian)
Detektor:	Mass Spectrometer 5989 A (Hewlett-Packard)
Gase:	Trärgas: Helium, Vordruck 50 kPa
Temperaturen:	Ionenquelle 250°C, Interface 250°C, Quadrupol Massenfilter 100°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich:	Sclareolscreening: m/z 33 –800 Sonst: m/z 33 –300
Datenaufnahme:	MS HP-UX ChemStation, B 06.01 Software
Auswertung:	Spektren-Datenbank: Wiley, NBS54K (Nist), LMC

Temperaturprogramme

s. 4.4.1.1

Bei den Proben zur Sclareoltransformation wurde zusätzlich eine chemische Ionisation mit Methan (Quellendruck: 1,5 Torr) durchgeführt.

4.4.1.3 Berechnung von Kováts-Indices

Die Kováts-Indices wurden nach folgender Formel berechnet (GOTTWALD W., 1995):

$$KI = 100N + 100n \frac{(\log \hat{t}_A - \log \hat{t}_N)}{(\log \hat{t}_{N+n} - \log \hat{t}_N)}$$

mit N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert

n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden
Alkans

A = Analyt

\hat{t} = relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t_0

4.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

4.4.2.1 Analytische HPLC

Pumpe:	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit (Jasco)
Degasser:	3-Kanal Degasser (Jasco)
Detektor:	UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor MD 910, 450 nm
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:	0,5 mL min^{-1}

a) Fließmittelgradient für die Analytik von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein

Fließmittel A: Methanol/H₂O 80:20

Fließmittel B: Ethylacetat

Tab 4-8. HPLC-Gradient für die Analytik von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein, modifiziert nach KIDMOSE et al., 2001

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	80	20
5	77	23
40	50	50
50	0	100
60	80	20

b) Fließmittelgradient für die Analytik von Capsanthin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Lycopin

Fließmittel A: Methanol/Acetonitril/Dichlormethan/n-Hexan 10:85:2,5:2,5

Fließmittel B: Methanol/Acetonitril/Dichlormethan/n-Hexan 10:45:22,5:22,5

Tab 4-9 HPLC-Gradient für die Analytik von Capsanthin, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin und Lycopin, modifiziert nach KHACHIK und BEECHER, 1988

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
10	100	0
45	50	50
50	0	100
60	100	0

Für die Analytik von β -Carotin (Referenzsubstanz der Umsetzungen) wurde je nach vorliegender Probe HPLC-Gradient a) oder HPLC-Gradient b) verwendet.

4.4.2.2 Semipräparative HPLC

Pumpe:	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit binärer Gradienteneinheit (Jasco)
Degasser:	3-Kanal Degasser (Shodex)
Detektor:	UV-Detektor, UV-1570 (Jasco), 450 nm
Datenauswertung:	Borwin Chromatographie Software (Version 1.20)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit 500 μ L Probenschleife
Säule:	Nucleosil 120-5, RP-18, 250 x 16 mm, 5 μ m (Macherey & Nagel)
Flussrate:	5 mL min ⁻¹
Fraktionssammler:	Advantec SF-3120
	wait time: 1 min
	end time: 60 min
	request time: 3 min
	monitor time: 0 min
	base drift: 0
	peak level: 5 %
	delaying time: 10 sec
	signal sampling high

Der Fraktionsammler wurde zur Isolierung von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein eingesetzt. Die Fraktionen der anderen Carotinoide wurden direkt am Detektorausgang manuell aufgefangen.

Fließmittelgradient: siehe 4.4.2.1

4.4.3 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

4.4.3.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Säule: Biorad Glass-Econo-Column[®], 240 mL
Füllmaterial: Superdex 200 HR 10/30, 230 mL
Elution: 35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3,5; Zusatz von FeCl₃, ZnSO₄, MnSO₄, CuSO₄, jeweils 0,3 µmol L⁻¹; 258 min
Flussrate: 1 mL min⁻¹
Fraktionen: 4 mL

4.4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Säule: HIC Phenyl high sub, 20 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: 4 mL min⁻¹
Gradient: 15 min 100 % Fließmittel A, 15 min 100 % Fließmittel B
Fraktionen: 4 mL

4.4.3.3 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Säule:	HiPrep 16/10 DEAE FF, 20 mL Volumen (Pharmacia biotech)
Fließmittel A:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 4,5
Fließmittel B:	7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3,5
Flussrate:	4 mL min ⁻¹
Elution:	25 min 100 % Fließmittel A, 45 min 100 % Fließmittel B
Fraktionen:	4 mL

4.5 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer:	Perkin Elmer Lambda 12 mit temperierbarem Küvettenhalter
Datenaufnahme:	UV WIN Lab (Version 2.0)
Küvetten:	Hellma Quarzküvetten, 2 mL, Schichtdicke 1 cm Hellma Quarzküvetten, 200 µL, Schichtdicke 1 cm

4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

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) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ ,
Tris-HCl –Puffer	1M mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
DTT-SL	1 M
Glycerol-SL:	87 % (v/v) Glycerol

Sammelgel (6 %): 450 μL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 750 μL Tris-HCl-SL (pH 6,8), 15 μL APS-SL, 6 μL TEMED, 1,8 mL Wasser

Trenngel (12,5 %): 3,8 mL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 3 mL Tris-HCl-SL (pH 8,8), 30 μL APS, 15 μL TEMED, 5,2 mL Wasser

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 70 % Ethanol überschichtet, die Lösung für das Sammelgel aufgegeben und der Kamm für die Probenschlitze aufgesetzt. Die Polymerisation erfolgte weitere 30 min (Gelmaße: 8,6 x 7,7 x 0,1 cm).

Größenstandard:

Tab. 4-10 Zusammensetzung des für die SDS-Page verwendeten Größenstandards (roti-Mark-Standard, Roth)

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin (Rind)	200
β -Galactosidase (rekombinant <i>E.coli</i>)	119
Serumalbumin (Rind)	66
Ovalbumin (Huhn)	43
Carboanhydrase	29
Trypsin Inhibitor (Soja)	20
Lysozym (Huhn)	14,3

Probenvorbereitung:

50 μL Probe wurden mit 50 μL Auftragspuffer versetzt (1 mL Tris-HCl-Puffer, 2 mL DTT-SL, 2 mL SDS-SL, 20 mg Bromphenolblau, 2,3 mL Glycerin-SL ad 10 mL Wasser), bei 95 °C 15 min inkubiert und mit 10 μL DTT-SL versetzt.

Elektrophorese:

Elektrophoresesystem:	Biometra Minigel-Twin-System mit Bio-Rad Power Supply
Laufpuffer:	30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS ad 10 L Wasser
Auftragsvolumen:	20 μ L, Standards 2 μ L
Bedingungen:	20 mA, (nach Eintritt der Proben in das Trenngel: 25 mA) 1,5 h

Nachbehandlung:

Fixieren:	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 30 min
Färben:	0,04 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, (in Fixierlösung gelöst), 60 °C, 60 min
Entfärben:	25 % Ethanol, 8 % Essigsäure

4.7 Enzymreinigung

4.7.1 Aktivitätsbestimmung

4.7.1.1 Herstellung einer wässrigen β -Carotinlösung

5 mg β -Carotin und 500 mg Tween 40 wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und mit 20 mL Wasser versetzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer (200 mbar, 40°C Badtemperatur) weitgehend abgezogen und zurückbleibende Reste mit Stickstoff abgeblasen. Die Lösung wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 50 mL aufgefüllt. Alle Schritte wurden unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

4.7.1.2 Enzymtest

1,5 mL der Enzym-haltigen Probelösung wurden in eine Quarzküvette pipettiert und 5 min bei 34 °C im Photometer vortemperiert. Nach Zugabe von 100 μ L β -Carotinlösung wurde die Abnahme der Extinktion bei 450 nm über einen Zeitraum von 10 min aufgenommen. Gegebenenfalls wurde die Probelösung mit Puffer (35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat, pH 3,5) verdünnt, bis eine lineare Abnahme der Extinktion erreicht war.

Die Aktivität A berechnet sich nach:

$$A \left[mU mL^{-1} \right] = \frac{\Delta E \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon} \times 1000$$

mit

ΔE = Extinktionsabnahme pro Minute

V_g = Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

V_p = Probevolumen [mL]

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

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

4.7.2 Enzymreinigung mittels GPC

Die Kultivierung des Stammes erfolgte gemäß 4.2.4.4. Am 10. Kulturtag wurde das Medium vom Mycel durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) getrennt. 100 mL Medium wurden mittels Ultrafiltration in Zentrifugeneinsätzen (Centricon Plus-80, Millipore, Ausschlussgrenze 30 kDa) auf 5 mL konzentriert (3300 g, 5 °C). Jeweils 2 mL der konzentrierten Enzymlösung wurden in die FPLC nach 4.4.3.1 injiziert.

4.7.3 Enzymreinigung mittels HIC und IEC

300 mL zellfreies Medium wurden wie in 4.7.2 beschrieben auf 30 mL konzentriert. Das Retentat der Ultrafiltration wurde gegen den Startpuffer der HIC äquilibriert, indem es dreimal mit 30 mL der HIC-Pufferlösung (siehe 4.4.3.2) versetzt und jeweils auf das ursprüngliche Volumen konzentriert wurde. Je 5 mL der so erhaltenen Probelösung wurden pro Lauf in die FPLC nach 4.4.3.2 injiziert. Die aktiven Fraktionen aus 5 Läufen wurden vereint, auf 10 mL konzentriert und gegen den IEC-Startpuffer äquilibriert, indem sie dreimal mit je 10 mL IEC-Puffer (siehe 4.4.3.3) versetzt und auf das Ausgangsvolumen konzentriert wurden. Je 5 mL dieser Lösung wurden pro Lauf in die FPLC nach 4.4.3.3 injiziert. Die aktiven Fraktionen aus 2 Läufen wurden vereint und für die Umsetzung nach 4.9.2.4 eingesetzt. 50 μL

wurden für die Überprüfung der Reinheit des Enzyms mittels Gelelektrophorese nach 4.6 eingesetzt.

4.8 Isolierung der Carotinoide

4.8.1 Extraktion

4.8.1.1 Spinat

1 kg Spinat wurde in vier Portionen mit jeweils 250 mL einer Mischung aus Aceton und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (4:1) im Mixer (5 min, Stufe 6) extrahiert. Die Blattreste wurden durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) abgetrennt, vereinigt und die Extraktion noch zweimal mit je 250 mL der Aceton/ NaHCO_3 -Mischung bis zur vollständigen Entfärbung des pflanzlichen Materials wiederholt. Alle Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (800 mbar, 40 °C Badtemperatur) entfernt. Die Extraktion des wässrigen Rückstandes erfolgte unter Zugabe von Natriumchlorid (Sättigung) dreimal mit jeweils 100 ml Peroxid-freiem Diethylether. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer (900 mbar, 40°C Badtemperatur) auf 200 mL eingeeengt. 2 mL dieser Lösung wurden zur Quantifizierung der Carotinoide mittels HPLC (siehe 4.4.2.1) entnommen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt und Lösungsmittelreste mit Stickstoff abgeblasen. Der so erhaltene Spinatextrakt wurde unter Stickstoff bei - 18 °C bis zur Verwendung für die semipräparative HPLC nach 4.8.2.1 maximal zwei Wochen gelagert.

4.8.1.2 Paprika

1 kg Paprika wurde vorzerkleinert und in 3 Portionen mit jeweils 200 mL Aceton im Mixer (Stufe 6, 5 min) extrahiert. Die festen Rückstände wurden durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) abgetrennt, vereinigt und gemörsert. Anschließend wurde die Extraktion noch zweimal mit 200 mL Aceton wiederholt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen und der verbleibende wässrige Rückstand mit 200 mL Peroxid-freiem Diethylether extrahiert. Die Verseifung der Carotinoidester erfolgte

durch Zugabe von 20 mL 30 % methanolischer KOH bei Raumtemperatur über Nacht. Nach der Verseifung wurde die etherische Lösung dreimal mit je 100 mL dest. Wasser gewaschen und mit Ether auf 200 mL aufgefüllt. 2 mL dieser Lösung wurden für die Quantifizierung der Carotinoide mittels HPLC (siehe 4.4.2.1) entnommen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsdampfer (900 mbar, 40 °C Badtemperatur) weitgehend entfernt und Lösungsmittelreste mit Stickstoff abgeblasen. Der so erhaltene Paprikaextrakt wurde bis zur Verwendung für die semipräparative HPLC nach 4.8.2.2 unter Stickstoff bei -18 °C bis zu 2 Wochen gelagert.

4.8.1.3 Tomate

1 kg Tomaten wurden vorzerkleinert und mit 200 mL Aceton im Mixer (Stufe 6, 5 min) extrahiert. Die festen Tomatenrückstände wurden durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) vom Lösungsmittel getrennt und mit 200 mL Hexan im Mixer (Stufe 6, 5 min) extrahiert. Nach der Abtrennung der festen Rückstände durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) wurde die Lösung mit Hexan auf 200 mL aufgefüllt und 2 mL für die Quantifizierung der Carotinoide mittels HPLC (s. 4.4.2.1) entnommen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (900 mbar, 40 °C Badtemperatur) weitgehend entfernt und Lösungsmittelreste mit Stickstoff abgeblasen. Der so erhaltene Tomatenextrakt wurde bis zur Verwendung für die semipräparative HPLC nach 4.8.2.3 unter Stickstoff bei -18 °C bis zu 2 Wochen gelagert.

4.8.1.4 Quantifizierung der Carotinoide in den Extrakten

Die Carotinoide wurden mittels HPLC nach 4.4.2.1 quantifiziert. Die Quantifizierung von Violaxanthin und Neoxanthin erfolgte als Einpunktkalibrierung durch die Verwendung der vorhandenen Referenzlösungen als externem Standard. Alle anderen Carotinoide wurden über eine mit β -Carotin erstellte Kalibriergerade quantifiziert.

4.8.2 Isolierung der Carotinoide mittels semipräparativer HPLC

4.8.2.1 Isolierung von Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein

250 mg des nach 4.8.1.1 hergestellten Spinatextraktes wurden in 5 mL Aceton gelöst und zur Abtrennung fester Bestandteile filtriert (Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm). 500 µL dieser Lösung wurden nach 4.4.2.2 in die semipräparative HPLC injiziert. Die Fraktionen der jeweiligen Carotinoide von sechs Läufen wurden vereint, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (200 mbar, 40°C Badtemperatur) abgezogen und der wässrige Rückstand mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Ethylacetat auf 20 mL aufgefüllt und die so erhaltenen Lösungen der isolierten Carotinoide bei –18 °C bis zu 2 Wochen gelagert.

4.8.2.2 Isolierung von Capsanthin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin

30 mg des nach 4.8.1.2 hergestellten Paprikaextraktes wurden in 2 mL Aceton gelöst und zur Abtrennung fester Bestandteile filtriert (Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm). 500 µL dieser Lösung wurden nach 4.4.2.2 in die semipräparative HPLC injiziert. Die aufgefangenen, das jeweilige Carotinoid enthaltenden Fraktionen aus 7 Läufen wurden vereint, mit Acetonitril auf 100 mL aufgefüllt und bei –18°C maximal 2 Wochen gelagert.

4.8.2.3 Isolierung von Lycopin

10 mg des nach 4.7.2.3 hergestellten Tomatenextrakts wurden in 10 mL Dichlormethan gelöst und zur Abtrennung fester Bestandteile filtriert (Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm). 500 µL dieser Lösung wurden nach 4.4.2.2 in die semipräparative HPLC injiziert. Die Lycopin enthaltenden Fraktionen aus 3 Läufen wurden vereint und mit Acetonitril auf 50 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde bei –18 °C bis zu zwei Wochen gelagert.

Die Reinheit der isolierten Carotinoide wurde mittels analytischer HPLC nach 4.4.2.1 überprüft.

4.8.3 Identifizierung und Quantifizierung der isolierten Carotinoide

4.8.3.1 UV/VIS-Spektroskopie

Für die Identifizierung der isolierten Carotinoide wurde je 1 mL von den nach 4.8.2.1-4.8.2.3 hergestellten Lösungen entnommen, das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 1 mL des in der Literatur (BRITTON et al., 1995) für die spektralphotometrische Identifizierung angegebenen Lösungsmittels aufgenommen. Für Lycopin war dieses Lösungsmittel Petrolether, für alle anderen Carotinoide wurde Ethanol verwendet. Von jedem Carotinoid wurde das UV/VIS-Spektrum im Wellenlängenbereich von 350 – 700 nm aufgenommen.

Für die Quantifizierung der isolierten Carotinoide wurde je 1 mL von den nach 4.8.2.1-4.8.2.3 hergestellten Lösungen entnommen, das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 1 mL des in der Literatur für die spektralphotometrische Quantifizierung angegebenen Lösungsmittels aufgenommen (siehe Tab. 4-10). Die Extinktion der Carotinoid-haltigen Probelösungen wurde, gegebenenfalls nach entsprechender Verdünnung, bei der in der Literatur angegebenen Wellenlänge gemessen (siehe Tab. 4-10).

Die Konzentration c berechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$c = \frac{E}{d \cdot \varepsilon}$$

E = gemessene Extinktion

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε = molarer Extinktionskoeffizient des jeweiligen Carotinoids in dem entsprechenden Lösungsmittel

Tab. 4-11 Lösungsmittel, Wellenlängen und molare Extinktionskoeffizienten für die spektral-photometrische Quantifizierung der Carotinoide (BRITTON et al., 1995)

Carotinoid	Lösungsmittel	λ [nm]	ϵ_{mol} [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Neoxanthin	Ethanol	438	148200
Violaxanthin	Ethanol	440	153000
Lutein	Ethanol	445	144800
Capsanthin	Toluol	483	121000
Zeaxanthin	Ethanol	450	140900
Cryptoxanthin	Petrolether	449	131900
Lycopin	Petrolether	470	184900

4.8.3.2 HPLC

Die Quantifizierung der isolierten Carotinoide mittels HPLC nach 4.4.2.1 erfolgte bei Violaxanthin und Neoxanthin als Einpunktkalibrierung durch die Verwendung der vorhandenen Standardlösungen als externem Standard. Alle anderen Carotinoide wurden über eine mit β -Carotin erstellte Kalibriergerade quantifiziert.

4.9 Umsetzungen der Carotinoide

4.9.1 Herstellung der Carotinoidlösungen

Von den nach 4.8.2 hergestellten Lösungen wurde jeweils ein 200 μg Carotinoid entsprechendes Volumen abgenommen (Cryptoxanthin 100 μg). Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitestgehend entfernt und Lösungsmittelreste mit Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde mit 20 mg Tween 40 versetzt und in 5 mL Dichlormethan gelöst. Zur Herstellung der Lösungen von Neoxanthin und Violaxanthin wurde 1 mL Citratpuffer pH 5 (25 mM Citronensäure, 51 mM Dinatriumhydrogenphosphat), zur Herstellung der Lösungen der anderen Carotinoide 1 ml Citratpuffer pH 3,5 (35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat) zugegeben. Nach der nahezu vollständigen Entfernung des Dichlormethans am Rotationsverdampfer und dem Abblasen möglicher Reste mit Stickstoff wurden die

Carotinoid-haltigen Lösungen mit dem entsprechenden Puffer auf 2 mL aufgefüllt und direkt für die Umsetzungen nach 4.9.2 eingesetzt.

4.9.2 Umsetzung der Carotinoide

4.9.2.1 Umsetzung der Carotinoide mit zellfreiem Kulturüberstand von *Lepista irina*

Die Kultivierung des Stammes erfolgte gemäß 4.2.4.4. Am 10. Kulturtag wurde das Medium vom Mycel durch Absaugen über einen Büchnertrichter (Rundfilter Nr. 616, Macherey und Nagel) getrennt. Für die Umsetzungen wurden 10 mL des zellfreien Kulturüberstandes mit 2 mL der jeweiligen nach 4.9.1 hergestellten Carotinoidlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm, 34 °C und unter Ausschluss von Licht über einen Zeitraum von 2 Stunden. Bei jeder Umsetzung wurde ein chemischer Blindwert, bestehend aus 2 mL der entsprechenden Carotinoidlösung und 10 mL SNL-Medium nach 4.2.1 mitgeführt. Die Produktisolierung erfolgte nach 4.9.3.1.

4.9.2.2 Umsetzung der Carotinoide mit mittels GPC (teil-)gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

Für die Umsetzungen wurden die nach 4.7.2 hergestellten Enzymlösungen verwendet, deren Aktivität gemäß 4.7.1 bestimmt wurde. Pro Ansatz wurde eine Enzymmenge eingesetzt, die einer Aktivität von 2 mU entsprach (durchschnittlich ca. 1,5 mL Enzymlösung). Die Enzymlösung wurde in 10 mL Probengläschen mit 1 mL der jeweiligen nach 4.9.1 hergestellten Carotinoidlösung versetzt und mit Puffer auf 5 mL aufgefüllt (Neoxanthin, Violaxanthin: 25 mM Citronensäure, 51 mM Dinatriumhydrogenphosphat; alle anderen Carotinoide: 35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphat). Nach dem Abdecken der Probegläschen mit perforierter Alufolie erfolgte die Inkubation bei 150 rpm, 34 °C und unter Ausschluss von Licht über einen Zeitraum von 2 Stunden. Bei jeder Umsetzung wurde sowohl ein chemischer Blindwert, bestehend aus 1 mL der entsprechenden Carotinoidlösung und 4 mL Pufferlösung als auch ein Kontrollversuch unter Verwendung von 1 mL der nach 4.7.1.1 hergestellten β -Carotinlösung anstelle des zu testenden Carotinoids mitgeführt.

4.9.2.3 Umsetzung von β -Carotin bei Emulgierung mit Tween 40 und mit Triton X 100

Die Herstellung der β -Carotinlösungen erfolgte nach 4.7.1.1 unter Verwendung von Tween 40 bzw. Triton X 100. Die Umsetzung erfolgte analog zu 4.9.2.1 unter Verwendung von 2 mL der jeweiligen β -Carotinlösung. Die Probenaufarbeitung erfolgte nach 4.9.3.1.

4.9.2.4 Umsetzung von β -Carotin mit mittels HIC/IEC gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

Die Umsetzung erfolgte analog zu 4.9.2.2. Es wurden 100 μ L der nach 4.7.1.1 hergestellten β -Carotinlösung und ein der Aktivität von 2 mU entsprechendes Volumen der nach 4.7.3 hergestellten Enzymlösung eingesetzt. Die Probenaufarbeitung erfolgte nach 4.9.3.2.

4.9.3 Produktisolierung

4.9.3.1 Umsetzungen mit zellfreiem Kulturmedium

Die Isolierung der Produkte erfolgte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion. Die nach 4.9.2.1 bzw. 4.9.2.3 inkubierten Lösungen wurden nach der Zugabe von 1,2 mL einer 0,06 mM ethanolischen Lösung des internen Standards α -Terpineol dreimal mit 5 mL eines Pentan/Dichlormethangemisches (1:1) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreuxkolonne bei 44 °C Badtemperatur und Normaldruck auf ein Volumen von 500 μ L eingengt. Die Extrakte wurden mittels HPLC (siehe 4.4.2.1) auf den Abbau der Carotinoide und per GC-FID und GC-MS (siehe 4.4.1) auf flüchtige Abbauprodukte untersucht.

4.9.3.2 Umsetzungen mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Lepista irina*

Die Isolierung der Produkte erfolgte mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion. Die nach 4.9.2.2 bzw. 4.9.2.4 inkubierten Lösungen wurden nach der Zugabe von 400 μ L einer 0,06 mM ethanolischen Lösung des internen Standards α -Terpineol dreimal mit 3 mL eines Pentan/Dichlormethangemisches (1:1) extrahiert. Die organischen Phasen

wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreuxkolonne bei 44 °C Badtemperatur und Normaldruck auf ein Volumen von 150 µL eingengt. Die Extrakte wurden mittels HPLC (siehe 4.4.2.1) auf den Abbau der Carotinoide und mittels GC-FID und GC-MS (siehe 4.4.1) auf flüchtige Abbauprodukte untersucht.

4.10 Entsorgungshinweise

4.10.1 Biologisches Material

Kulturen und Kulturreste wurden vor dem Entsorgen 20 min bei 121°C autoklaviert.

4.10.2 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.: Microbial hydroxylation of sclareol, *Phytochem.*, 36 (6), 1421-1424 (1994)

ADAMS, R.P.: *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation Carol Stream, Illinois USA (1995)

ARANDA G., EL KORTBI M.S., LALLEMAND J.Y.: Microbial transformation of diterpenes: hydroxylation of sclareol, manool and derivatives by *Mucor plumbeus*, *Tetrahedron*, 39, 8339-8350 (1991)

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)

BAILEY J.A., VINCENT G.G., BURDEN R.S.: Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effect on fungal growth, *J. Gen. Microbiol.*, 85, 57-64 (1974)

BAILEY J.A., CARTER G.A., BURDEN R.S., WAIN R.L.: Control of rust diseases by diterpenes from *Nicotiana glutinosa*, *Nature*, 255, 328-329 (1975)

BANTHORPE D.V., BROWN J.T., MORRIS G.S.: Accumulation of the anti-fungal diterpene sclareol by cell cultures of *Salvia Sclarea* and *Nicotiana Glutinosa*, *Phytochem.*, 29 (7), 2145-2148 (1990)

BAST E.: *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (1999)

BAUER K., GARBE D., SURBURG H.: *Common fragrance and flavor materials*, 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1990)

BELITZ H.D., GROSCH W.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer-Verlag Berlin (2001)

BERGER R.G.: *Aroma Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1995)

BERNADINELLI G., VIAL C., STARKEMANN S., NÄF F.: Structure and absolute configuration of (-)-sclareol-8-acetate, *Acta Crystallographica*, 44, 715-717 (1988)

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)

BREITMAIER E.: *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*, Teubner-Verlag, Stuttgart, Leipzig (1999)

BRITTON G.: UV/VIS spectroscopy. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.), *Carotenoids-Volume 1b: spectroscopy*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Kapitel 2, 13-62 (1995)

BOUVIER F., SUIRE C., MUTTERER J., CAMARA B.: Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis, *Plant Cell*, 15, 47-62 (2003)

BOWEN E.R.: Potential by-products from microbial transformation of d-limonene, *Florida State Horticultural Society*, 88 (1975)

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)

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

CARRERAS C.R., RODRIGUEZ J., SILVA H.J., ROSSOMANDO P., GIORDANO O.S., GUERREIRO E.: Hydroxylation of sodic grindelate by *Cunninghamella echinulata*, *Phytochem.*, 41 (2), 473-475 (1996)

CHERNYS J.C., ZEEVAART J.A.D.: Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado, *Plant Physiol.*, 124, 343-353 (2000)

CORBIER B., EHRET C., GIRANDI E., PELERIN G.: *Proceedings of the 10 th Int. Congr. Essent. Oils*, Washington, doc. 28 (1986)

DAVEY P.N., PAYNE L.S., TSE C.L.: Preparation of intermediates for norlabdane oxide, EP 0 822 191 A1 (1998)

DE HOOG G.S., SMITH M.TH.: Key to the species of *Hyphozyma* (yeast-like Hyphomycetes) and description of *H. roseonigra* sp. nov., *Antonie von Leeuwenhoek*, 52, 39-44 (1986)

DHAVALIKAR R.S., BHATTACHARYYA P.K.: Microbial transformations of terpenes: Part VIII - fermentation of limonene by a soil pseudomonad, *Ind. J. Biochem.*, 3, 144-157 (1966)

DIMOGLO A. S., VLAD P. F., SHVETS N. M., COLTSA M. N.: Electronic-topological investigations of the relationship between chemical structure and ambergris odor, *New J. Chem.*, 19, 1217-1226 (1995)

<http://www.dsmz.de> (2003)

DUBOIS, P.A.: *Parfums. Cosmet. Arômes*, 19, 35 (1978)

DUETZ W., FJÄLLMANN A., REN S., JOURDAT C., WITHOLT B.: Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), 2829-2832 (2001)

DUQUE C., OSORIO C., MORALES A.: C₁₃-Norisoprenoids in the aroma of Columbian tropical fruits. In: Winterhalter P., Rouseff R. (Eds.), *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symp.Ser., vol 802, American Chemical Society, Washington DC, Kapitel 14, 194-205 (2002)

DUTTA R.K., ROY M., SINGH H.D.: Metabolic blocks in the degradation of β -sitosterol by a plasmid-cured strain of *Arthrobacter oxydans.*, *J. Basic. Microbiol.*, 32, 167-176 (1992)

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

ENZELL C.: Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds, *Pure Appl. Chem.*, 57 (5), 693-700 (1985)

EUGSTER C.H.: Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.), *Carotenoids-Volume 1a - isolation and analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Kapitel 4, 71-80 (1995)

EUGSTER C.H., MÄRKI-FISCHER E.: The chemistry of rose pigments, *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.*, 30, 654-672 (1991)

FARBOOD M., WILLIS B.: *Process for producing diol and furan and microorganism capable of same*, US 4,798,799 (1989)

FARBOOD M., MORRIS J.; DOWNEY A.: *Process for producing diol and lactone and microorganisms capable of same*, US 4,970,163 (1990)

FARBOOD M.: Microorganisms as a novel source of flavour compounds, *Biochem. Soc. Transactions*, 19 (3), 690-694 (1991)

FAROOQ A., TAHARA S.: Biotransformation of two cytotoxic terpenes, α -santonin and sclareol by *Botrytis cinerea*, *Z. Naturforsch.*, 55c, 713-717 (2000)

FEKIH A.: Le Sclareol et ses derives dont l'Ambrox, *Journal de la société chimique de Tunisie*, 3(12), 923-935 (1996)

FLITSCH S., GROGAN G., ASHCROFT D.: Oxidation reactions. In: Drauz K., Waldmann H. (Eds.), *Enzyme catalysis in organic synthesis*, Vol. III, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Kapitel 16, 1065-1108 (2002)

FRITSCH W., HOFRICHTER M.: Aerobic degradation by microorganisms. In: Rehm H.J., Reed G., Pühler A., Stadler P. (Eds.), *Biotechnology-Environmental Processes*, Vol. 11b, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Kapitel 6, 145-167 (2000)

FUJIMOTO Y., CHEN CH.S., GOPOLAN A.S., SIH C.J.: Microbial degradation of the phytosterol side-chain. II. Incorporation of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ onto C-28-position, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 4720-4722 (1982)

GERNERO J., BUIL P., JOULAIN D., TABACCHI R.: *Congr. Essent. Oils, 7th*, Kyoto, 479 (1977)

GOODWIN T.W.: *Plant Pigments*, Academic Press, London (1988)

GOTTWALD W.: *GC für Anwender*, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1995)

GROSS J.: *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*, van Nostrand Reinhold, New York (1991)

HAKALA S.H., HEINONEN I.M.: Chromatographic purification of natural lycopene, *J. Agric. Food. Chem.*, 42, 1314-1316 (1994)

HANSON J.R., HITCHCOCK P.B., NASIR H., TRUNEH A.: The biotransformation of the diterpenoid sclareol by *Cephalosporium aphidicola*, *Phytochem.*, 36, 903-906 (1994)

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)

HEINZKILL M., MESSNER K.: The ligninolytic system of fungi. In Anke T. (ed.), *Fungal biotechnology*, Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Kapitel 8, 213-228 (1997)

HIEDA T., MIKAMI Y., OBI Y., KISAKI T.: Microbial transformation of sclareol, *Agric. Biol. Chem.*, 46 (10), 2477-2484 (1982)

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

HOMMEL R.K.: Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms, *Biodegradation*, 1, 107-109 (1990)

IUCHI S., KOBAYASHI M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K.: A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea, *Plant physiol.*, 123, 553-562 (2000)

JANSSENS L., DE POOTER H.L., SCHAMP N.M., VANDAMME E.J.: Production of flavours by microorganisms, *Process Biochem.*, 27, 195-215 (1995)

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

KALALA M., COWAN A.K., MOLNAR P., TOTH G.: 9'-Z-epoxycarotenoid cleavage enzyme activity from the *citrus* cell-free system for ABA biosynthesis, *South African Journal of Botany*, 67, 376-377 (2001)

KANTELINEN A., HATAKKA A., VIIKARI L.: Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 234-239 (1989)

KHACHIK F., BEECHER G.R.: Separation of carotenol fatty acid esters by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 449, 119 (1988)

KIDMOSE U., KNUTHSEN P., EDELEBOS M., JUSTENSEN U., HEGELUND E.: Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes after deep frozen storage, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 918-923 (2001)

KIEFER C., HESSEL S., LAMPERT J., VOGT K., LEDERER M.O., BREITHAUPT D.E., VON LINTIG J.: Identification and characterisation of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A, *J. Biol. Chem.*, 276, 17, 14110-14114 (2001)

KIESLICH K.: Microbial side-chain degradation of sterols, *J. Basic Microbiol.*, 25 (7), 461-474 (1985)

KNAPP H., STRAUBINGER M., STINGL C., WINTERHALTER P.: Analysis of norisoprenoid aroma precursors. In: Winterhalter P., Rouseff R.L. (Eds.), *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symp. Ser., vol. 802, American Chemical Society, Washington Dc, Kapitel 2, 20-35 (2002)

KOUZI S.A., MC CHESNEY J.D.: Hydroxylation and glucoside conjugation in the microbial metabolism of the diterpene sclareol, *Xenobiotica*, 21 (10), 1311-1323 (1991)

KOUZI S.A., MC CHESNEY J.D., WALKER L.A.: Identification of four biliary metabolites of the diterpene sclareol in the laboratory rat, *Xenobiotica*, 23 (6), 621-632 (1993)

KRAMMER G., WINTERHALTER P., SCHWAB M., SCHREIER P.: Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca* L.), Peach (*P. persica* L.) Yellow Plum (*P. domestica* L. ssp. *Syriaca*), *J. Agric. Food Chem.*, 39, 778-781 (1991)

KRÄMER J.: *Lebensmittelmikrobiologie*, 2.Auflage, Ulmer Verlag, Stuttgart (1992)

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

LANGHOFF S.: *Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen*, Dissertation Universität Hannover (2002)

LARSEN M., POLL L.: Odour thresholds of some important aroma compounds in raspberries, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 191, 129-131 (1990)

LATZA E.: *Biotechnologie von Aromastoffen: Transformation von α -Pinen mit *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 und Trennverfahren mit Zeolithen*, Dissertation Universität Hannover (1999)

LEONOWICZ A., MATUSZEWSKA A., LUTEREK J., ZIEGENHAGEN D., WOJTAS-WASILEWSKA M., CHO N.-S., HOFRICHTER M., ROGALSKI J.: Biodegradation of lignin by white rot Fungi, *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175-185 (1999)

LIN S., ROSAZZA J.: Microbial transformations of isocupressic acid, *J. Nat. Prod.*, 61, 922-926 (1998)

LINDQUIST A., ANDERSSON S.: Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene-15,15'-monooxygenase, *J. Biol. Chem.*, 277, 26, 23942-23948 (2002)

LINTIG J., VOGT K.: Filling the gap in vitamin A research, molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal, *J. Biol. Chem.*, 275, 16, 11915-11920 (2000)

Luckner M.: *Secondary metabolism in plants and animals*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1990)

LUTZ A., WINTERHALTER P.: Bio-oxidative cleavage of carotenoids: Important Route to physiological active plant constituents, *Tetrahedron Lett.*, 33 (36), 5169-5172 (1992)

MAC TAVISH H., DAVIES N.W., MENARY R.C.: Bound volatiles in brown *Boronia* flowers (*Boronia megastigma*). In: Winterhalter P., Rouseff R.L. (Eds.), *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symp. Ser., vol. 802, American Chemical Society, Washington DC, Kapitel 13, 183-193 (2002)

MADIGAN M.T., MARTINKO J. M., PARKER J.: *Brock, Biology of microorganisms*, 5. Auflage, Prentice-Hall, Inc. (1997)

MAHATO S.B., MAJUMDAR I.: Current trends in microbial steroid biotransformation, *Phytochem.*, 34, (4), 883-898 (1993)

MAHATO S.B., GARAI S.: Advances in microbial steroid biotransformation, *Steroids*, 62, 332-345 (1997)

MATHUR S., BHATIA M.C., MATHUR S.N.: Biotransformation of β -sitosterol into 17-ketosteroids by some strains of *Arthrobacter*, *Role Biotechnol. Agric.*, 99-102 (1992)

MENDOZA L., TAPIA L., WILKENS M., URZUA A.: Antibacterial activity of 13-epi-sclareol, a labdane type diterpene isolated from *Pseudognaphalium heterotrichium* and *P. cheiranthifolium* (Asteraceae), *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 47, 91-98 (2002)

MESTER T., FIELD J.A.: Characterization 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)

MOHAMAD N., HASHIM R., RAHMAN N.A., ZAIN S.M.: An insight to the cleavage of β -carotene to vitamin A: a molecular mechanics study, *J. Mol. Struct.*, 538, 245-252 (2001)

MULLER B.L., DEAN C., WHITEHEAD I.M.: The industrial use of plant enzymes for the production of natural “green note” flavour compounds. In: Etieviant P., Schreier P. (Eds.), *Bioflavour` 95*, INRA, Paris, 339 (1995)

MÜLLER H.: Determination of carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, A 204, 88-94 (1997)

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

NOMA Y., YAMASAKI S., ASAKAWA Y.: Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus Cellulosae*, *Phytochem.*, 31, 8, 2725-2727 (1992)

OHLOFF G.: *Gustation and olfaction*, Academic Press, London (1971)

OHLOFF G.: The fragrance of ambergris. In: Theimer E.T. (Ed.), *Fragrance chemistry - The science of the sense of smell*, Academic Press, New York, Kapitel 15, 535-574 (1982)

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

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

ONKEN J., BERGER R.G.: Effect of *R*-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*, *J. Biotechnol.*, 69, 163-168 (1999)

PFANDER H., SCHNURTENBERGER H.: Biosynthesis of C₂₀ –Carotenoids in *Crocus sativus*, *Phytochem.*, 21, 1039-1042 (1982)

POMMER H., REIF W., PASEDACH H., HOFFMANN W.: BASF, DE-AS 1 286 018 (1967)

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)

POMMER H., REIF W., PASEDACH H., HOFFMANN W.: BASF, DE-AS 1 286 018 (1967)

QIN X., ZEEVAART J.A.D.: The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean, *Plant Biol.*, 96, 26, 15354-15361 (1999)

RAZUNGLES A., BAYONOVE C.L., CORDONNIER R.E., SAPIJ 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., GENTLEMAN 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.*, 276 (9) 6560-6565 (2001)

ROGALSKI J., LUNDELL T., LEONOWICZ A.: Production of laccase, lignin peroxidase and manganese dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions, *Acta Microbiol. Pol.*, 40(3), 221-234 (1991)

ROBERT F., DUMONT B., BELIN J.M.: Biotechnological method of ionone production in non conventional media. In: Etieviant P., Schreier P. (Eds.), *Bioflavour` 95*, INRA, Paris, 275 (1995)

RUIZ-DUENAS F.J., CAMARERO S., PEREZ-BOADA M., MARTINEZ M.J., MARTINEZ A.T.: A new versatile peroxidase from *Pleurotus*, *Biochem. Soc. Transactions*, 29, 2, 116-122 (2001)

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

SANCHEZ-CONTRERAS A., JIMENEZ M., SANCHEZ S.: Bioconversion of lutein to products with aroma, *Appl. Microbiol. Biol.*, 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)

SANDERSON G., GRAHAM H.N.: On the formation of black tea aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 576-584 (1973)

SCHAEFFER T.L., CANTWELL S.G., BROWN J.L., WATT D.S., FALL R.R.: Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 742-746 (1979)

SCHIEDT K., LIAAEN-JENSEN S.: Isolation and analysis. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.) *Carotenoids-Volume 1a - isolation and analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Kapitel 5, 81-116 (1995)

SCHRADER J.; BERGER R.G.: Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm H. J., Reed G.; Pühler A., Stadler P. (Eds.), *Biotechnology, Vol.10, Special Processes*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Kapitel 13, 374-422 (2001)

SCHULTE - ELTE K.H.: Firmenich CH 563951 (1972)

SCHWARTZ S.H., TAN B.C., GAGE D.A., ZEEVAART J.A.D., MC CARTY D.R.: Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP 14 of Maize, *Science*, 276, 1872-1873 (1997)

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

SCHWARTZ S.H., TAN B.C., MCCARTY D.R., WELCH W., ZEEVAART J.A.D.: Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, 1619, 9-14 (2003)

SITTE P., WEILER E.W., KADEREIT J.W., BRESINSKY A., KÖRNER C.: *Strasburger, Lehrbuch der Botanik*, 35. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (2002)

Snowdon A.L.: *A colour Atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*, 1st vol., Wolfe Scientific, London (1990)

TATE R. L.: *Soil microbiology*, 2. Auflage, John Wiley & Sons Inc. , New York (2000)

TENIUS B.S.M., SCHROEDER E.K., SCHENATO R.A.: Ambergris: Perfume e Síntese, *Química Nova*, 23 (2), 225-230 (2000)

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)

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

ULUBELEN A., TOPCU G., ERIS C., SÖNMEZ U., KARTAL M., KURUCU S., BOZOK-JOHANSSON C.: Terpenoids from *Salvia Sclarea*, *Phytochem.*, 36 (4), 971-974 (1994)

VAN HYLCKLAMA Vlieg J.E.T., KINGMA J., KRUIZINGA W., JANSSEN D.B.: Purification of a glutathione S-transferase and a glutathione conjugate dehydrogenase involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus sp.* strain AD45, *J. Bacteriol.*, 181, 2094-2101 (1999)

VAN HYLCKAMA Vlieg J.E.T., JANSSEN D.B.: Bacterial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: REHM H.J., REED G.; PÜHLER A., STADLER P. (Eds.), *Biotechnology, Vol.11b- Environmental Processes*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim Kapitel 8, 193-209 (2000)

WAHLBERG I., ENZELL C.R.: Tobacco isoprenoids, *Nat. Prod. Rep.*, 4, 237-276 (1987)

WAHLBERG I.: Carotenoid-derived aroma compounds in tobacco. In: Winterhalter P., Rouseff R.L. (Eds.), *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symp. Ser., vol. 802, American Chemical Society, Washington DC, Kapitel 10, 131-144 (2002)

WEENEN H., BOOG R.L., APELDOORN W.: Aldehyds from alcohols using alcohol oxidases and dehydrogenases. In: Etieviant P., Schreier P. (Eds), *Bioflavour` 95*, INRA, Paris, 375 (1995)

WEIDENHAMMER J.D., MACIAS F.A., FISCHER N.H., WILLIAMSON G.B.: Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.*, 19, 8, 1799-1807 (1993)

WILLIAMS P.J., SEFTON M. A., FRANCIS I.L.: Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor. In: Teranishi R., Takeoka G.R., Güntert M. (Eds.), *Flavor precursors, thermal and enzymatic conversions*, ACS Symp. Ser, vol. 490, American Chemical Society, Washington DC, Kapitel 7, 74-85 (1992)

WINTERHALTER P., SCHREIER P.: The generation of norisoprenoid volatiles in starfruit (*Averrhoa Carambola* L.): a review, *Food Rev. Int.*, 11, 2, 237-254 (1995)

WINTERHALTER P.: Carotenoid-derived aroma compounds: Biogenetic und biotechnological aspects. In: *ACS Symp. Ser., vol. American Chemical Society: Washington DC*, 295-308 (1996)

WINTERHALTER P., ROUSEFF R.: Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter P., Rouseff R.L. (Eds.), *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symp. Ser., vol. 802, American Chemical Society, Washington DC, Kapitel 1, 1-19 (2002)

WIRTZ G.: *Über die Substratspezifität und Reinigung der β,β -Carotin-15,15`-Dioxygenase (EC 1.13.11.21)*, Dissertation Universität Basel (1998)

WOGGON W.D.: Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15, 15`-Monooxygenase, *Pure Appl. Chem.*, 74, 8, 1397-1408 (2002)

WULFSON N.S., ZARETSKII V.I., SADOVSKAYA V.L.: Mass spectrometry of steroid-systems- IV, *Tetrahedron*, 22, 603-614 (1966)

ZORN H., LANGHOFF S., SCHEIBNER M., NIMTZ M., BERGER R.G.: A peroxidase of *L. irina* cleaves β,β -Carotene to flavour compounds, *Biol. Chem.* 384 (7), 1049-1056 (2003)

ZORN H.; LANGHOFF S., SCHEIBNER M., BERGER R.G.: Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62 (4), 331-336 (2003)

Lebenslauf

Birgit Veddeler

geboren am 16.03.1973 in Nordhorn

Schulbildung

1979-1983	Grundschule Schepsdorf
1983-1985	Orientierungsstufe am Wall, Lingen
1985-1992	Franziskusgymnasium, Lingen
05/1992	Abitur

Akademische Ausbildung

10/1992-11/1997	Studium der Lebensmittelchemie, Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster
11/1997	1. Staatsexamen
05/1998-04/1999	Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker, Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster
06/1999	2. Staatsexamen
01/2000	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover (Prof. Dr. R. G. Berger)