

# Justus-Liebig-Universität Gießen

## Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Nachhaltige biotechnologische Produktion von ungesättigten,  
mittelkettigen Fettaldehyden als potente Aromachemikalien aus  
natürlichen Quellen.

Sustainable biotechnological production of unsaturated, medium-chain  
fatty aldehydes as potent aroma chemicals from natural sources.

### Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

*doctor rerum naturalium*

Dr. rer.nat

vorgelegt von

Philipp Jakob Honold

2024

**Erster Gutachter:** Prof. Dr. Holger Zorn

Leiter des Instituts für Lebensmittelchemie und Biotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. Martin Rühl

Professur für Lebensmittel-Systembiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	16
1.1 Natürliche Quellen der Fettsäuren.....	16
1.2 Fettaldehyde als biologische Aromastoffe.....	17
1.3 Enzymatische Möglichkeiten .....	18
1.4 Kaskadenreaktion.....	22
1.5 Ziel der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Fettsäurescreening.....	25
2.1.1 Pilzkultivierung und Medien.....	25
2.1.2 Ernte .....	27
2.1.3 Trocknung und Feuchtebestimmung.....	27
2.1.4 Fettextraktion .....	27
2.1.5 Methylierung (FAME) .....	28
2.1.6 GC-MS Analyse .....	28
2.2 Enzyme .....	33
2.2.1 HIS-TAG.....	35
2.2.2 Enzymexpression und Zellernte .....	39
2.2.3 Kryokulturen .....	40
2.2.4 Reinigung der Enzyme.....	40
2.2.5 Bestimmung der Qualitätsparameter der Enzyme.....	43
2.3 Umsetzungen .....	47
2.3.1 Umsetzungen Lipide .....	47
2.3.2 Umsetzung von freien Fettsäuren .....	47
2.3.3 Zusatz von Antioxidantien .....	47
2.4 Sensorik .....	48
3. Resultate .....	49

3.1	Pilzkultivierung .....	49
3.2	Fettsäureprofile .....	50
3.2.1	Pilze .....	51
3.2.2	Nussöle .....	78
3.3	Enzyme .....	84
3.3.1	Umklonierung der <i>VhFALDH</i> mit HIS-Tag.....	84
3.3.2	Reinigung der Enzyme .....	86
3.3.3	Aktivität und Kinetik der <i>VhFALDH</i> .....	89
3.4	Optimierung der Umsetzung .....	91
3.5	Zusatz von Antioxidantien .....	94
3.6	Kaskadenreaktion.....	96
3.6.1	Olfaktorischer Gesamteindruck.....	96
3.6.2	Pilzlipidextrakte und Nussöle .....	99
3.6.3	Fettsäuren .....	109
4.	Diskussion .....	111
4.1	Pilzkultivierung und Lipidextraktion .....	111
4.2	Enzyme .....	112
4.3	Optimierung der Biotransformation.....	113
4.4	Biotransformation und Sensorik .....	115
4.5	Industrielle Umsetzung.....	118
	Literaturverzeichnis .....	120
	Veröffentlichte Literatur.....	126
	Danksagung .....	127
	Selbständigkeitserklärung.....	128

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -Dox	$\alpha$ -Dioxygenase
AARV	<i>Agaricus arvensis</i>
AFO	Ahifloweröl
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol
BSO	Borretschsamenöl
CAR	Carbonsäurereduktase
CLIM	<i>Cyathus limbatus</i>
CMI	<i>Coprinellus micaceus</i>
Cs $\alpha$ -Dox	$\alpha$ -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>
DVB/PDMS	Divinylbenzen/Polydimethylsiloxan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENI	<i>Epicoccum nigrum</i>
ETH	<i>Entomophthora thaxteriana</i>
FALDH	Fettaldehyddehydrogenase
GC	Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS-O	Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Olfaktometrie
GOI	Gene of Interest
HSU	<i>Hypholoma sublateritium</i>
IOB	<i>Inonotus obliquus</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JKO	Johannisbeerkernelöl
LB	Lysogeny broth
LNU	<i>Lepista nuda</i>
LOX	Lipoxygenase
LTO	<i>Lactarius torminosus</i>
LYP	<i>Lycoperdon pyriforme</i>
MAG	<i>Mycena galericulata</i>

MAP	<i>Mortierella albina peyronel</i> Öl
ME(A)	Malzextrakt(agar)
MEP(A)	Malzextraktpepton(agar)
MGI	<i>Meripilus giganteus</i>
MHY	<i>Mortierella hyalina</i>
MMN0.5(A)	modified Melin-Norkrans medium 0.5(agar)
MNO	Macadamianussöl
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ODP	olfactory detection port
PCOR	<i>Pleurotus cornucopiae</i>
PME	<i>Polyporus melanopus</i>
PNA	<i>Pholiota nameko</i>
PPU-D	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
PUL	<i>Pythium ultimum</i>
PUM	<i>Polyporus umbellatus</i>
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SKO	Sanddornkernöl
SPME	solid phase microextraction
SVA	<i>Suillus variegatus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	<i>Macrolepiota albuminosa</i>
TSU	<i>Trametes suaveolens</i>
UMA-1	<i>Ustilago maydis</i>
VhFLADH	Fettaldehyddehydrogenase aus <i>Vibrio harveyi</i>
VOI	Vector of Interest
XLO	<i>Xylaria longipes</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Aldehyds. ....	18
Abbildung 2: Sekundärstruktur einer $\alpha$ -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i> (C $\alpha$ -Dox). Rot markiert der HIS-Tag für die Reinigung. ....	21
Abbildung 3: Sekundärstruktur des Monomers der Aldehyddehydrogenase aus <i>Vibrio harveyi</i> (VhFALDH). Rot markiert der HIS-Tag für die Reinigung.....	22
Abbildung 4: Kaskadenreaktion der $\alpha$ -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i> (C $\alpha$ -DOX) und der Aldehyddehydrogenasen aus <i>Vibrio harveyi</i> (VhFALDH). Modifiziert nach (Kanter et al. 2022).....	23
Abbildung 5: Aminosäuresequenz der C $\alpha$ -DOX mit einem C-terminalen HIS-Tag .	33
Abbildung 6: Aminosäuresequenz der VhFALDH mit N-terminalem HIS-Tag. ....	34
Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Umklonierung der VhFALD .....	36
Abbildung 8: Plasmidkarte des Plasmids pET-DUET-VhFALDH-T175Q mit der Ampicillin-Resistenz (AmpR), dem Replikationsursprung (f1 origin), dem VhFALDH-Gen aus <i>Vibrio harveyi</i> , dem lac Repressor (lacI) und dem Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (pBR322 ori). Markiert sind außerdem die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI.....	37
Abbildung 9: Plasmidkarte des Plasmids pET28a-VhFALDH_N-HIS mit der Kanamycin-Resistenz (KanR), dem Replikationsursprung (f1 origin), dem VhFALDH-Gen aus <i>Vibrio harveyi</i> , dem lac Repressor (lacI) und dem Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (pBR322 ori). Markiert sind außerdem der HIS-Tag und die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI.....	37
Abbildung 10: Schema der Reinigung der Enzyme .....	41
Abbildung 11: Lipidgehalte der verschiedenen Pilze in mg Fett pro g Trockenmasse. ....	49
Abbildung 12: Ausbeute an Pilztrockenmasse pro Liter Kulturmedium .....	50
Abbildung 13: Agarosegel nach Restriktion mit den Restriktionsenzymen XhoI und NdeI zur Kontrolle des VhFALDH-HIS Konstrukts. Probe 9 zeigt 2 Banden mit dem VhFALDH-Gen und dem restlichen Plasmid.....	87
Abbildung 14: Gensequenz nach Umklonierung der VhFALDH mit N-terminalem HIS-Tag .....	88
Abbildung 15: SDS-PAGE nach Reinigung und Entsalzen der C $\alpha$ -DOX und VhFALDH .....	89

Abbildung 16: SDS-PAGE des Überstands nach Zellaufschluss ungereinigt und der aufgereinigten Cs $\alpha$ -DOX. ....	90
Abbildung 17: Chromatogramm des Hintergrunds der SPME-Analyse der gereinigten Cs $\alpha$ -DOX (rot) und der Analyse des Zellaufschlusses mit E. coli (schwarz).....	91
Abbildung 18: Enzymaktivität der VhFALDH in U/mg Enzym bei der Verwendung von NADP <sup>+</sup> und NAD <sup>+</sup> als Kofaktor. ....	91
Abbildung 19: Veränderung der Enzymaktivität in U/mg Enzym der VhFALDH während der Lagerung bei 4°C und -20°C über 21 Tage. ....	92
Abbildung 20: MichaelisMenten-Diagramm der Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung von Undec-1-enal bei verschiedenen Konzentrationen. ....	93
Abbildung 21: Biotransformation von Ölsäure mit unterschiedlichen Aktivitätsverhältnissen von 4:1; 8:1; 12:1 und 16:1 der Cs $\alpha$ -DOX und VhFALDH mit einer Inkubationsdauer von 4 h. Angaben in Klammern (U/mL Cs $\alpha$ -DOX:U/mL VhFALDH). ....	94
Abbildung 22: Biotransformation von Ölsäure bei gleichbleibendem Verhältnis von Cs $\alpha$ -DOX zu VhFALDH von 8:1, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationen. Angaben in Klammern (U/mL Cs $\alpha$ -DOX:U/mL VhFALDH) ....	95
Abbildung 23: Biotransformation von Ölsäure bei gleichbleibendem Verhältnis (0,4 U/mL Cs $\alpha$ -DOX und 0,05 U/mL VhFALDH) der Enzyme mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von 4 und 8 Stunden.....	96
Abbildung 24: Absorption von Peroxyblue668 während der Inkubation von Ölsäure und Palmitinsäure mit und ohne Cs $\alpha$ -DOX.....	97
Abbildung 25: GC-MS Analyse der Umsetzung von Ölsäure mit Cs $\alpha$ -DOX und einer Kombination aus Cs $\alpha$ -DOX mit BHT, EDTA und Peroxyblue nach Inkubation für 4 h. ....	98
Abbildung 26: Geruchseindrücke der Umsetzungsbrühen von Ahifloweröl (AFO), Borretschsamenöl (BSO), Entomophthora thaxteriana (ETH), Johannisbeerkernelöl (JKO), Mortierella alpina peyronel Öl (MAP), Mortierella hyalina (MHY), Macadamianussöl (MNO), Sanddornkernelöl (SKO). Skala: 0 = nicht wahrnehmbar; 5 = stark wahrnehmbar. ....	100

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht aller untersuchten Pilze und deren Ordnung mit Wachstumsgeschwindigkeiten bis zu einem Bewuchs von 80% auf Platte, Vorkultur (VK) und Hauptkultur (HK). Verwendete Medien für die Kultivierung, Kürzel der Pilznamen und falls verfügbar die kommerzielle Stammnummer. ....	26
Tabelle 2: Übersicht der Medien zur Kultivierung der Pilze. Für Kultivierung auf Platte wurde das jeweilige Medium mit Agar-Agar supplementiert (A). Für Flüssigkulturen wurde die Rezeptur ohne Agar-Agar verwendet. MMN0.5(A)=modified Melin-Norkrans medium 0.5(agar); ME(A)=Malzextrakt(agar); MEP(A)=Malzextraktpepton(agar)....	27
Tabelle 3:Geräteparameter des GC-MS Systems für die Fettsäureprofilbestimmung der Pilze.....	29
Tabelle 4: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS Analyse zur Identifizierung der Aldehyde an einer VF-WAXms-Säule.....	30
Tabelle 5: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS Analyse zur Identifizierung der Aldehyde mittels DB-5ms-Säule.....	31
Tabelle 6: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS/MS-O-Analyse zur Identifizierung der Aldehyde und deren olfaktorische Bestimmung. ....	32
Tabelle 7: Rezept für 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Puffer) für die Agarosegelelektrophorese.....	39
Tabelle 8: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer. Es wurde in allen Fällen ein Puffer aus $\text{KH}_2\text{PO}_4$ und $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ hergestellt und diese im Verhältnis gemischt bis zu einem pH von 7,5. Nach Zugabe der weiteren Bestandteile wurde der pH nicht mehr auf die ursprünglichen 7,5 eingestellt. ....	42
Tabelle 9: Lagertemperaturen der verwendeten Enzyme und der verwendete cut off während der Konzentrierung des Enzyms nach der Reinigung.....	42
Tabelle 10: Übersicht der Enzymparameter für die photometrische Quantifizierung der C $\alpha$ -DOX und VhFALDH. Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) und das molekulare Masse (MW). ....	43
Tabelle 11: Volumina und Konzentrationen für die Aktivitätsbestimmung der VhFALDH. ....	44
Tabelle 12: Konzentrationen, Substanzen und Volumina für die Sauerstoffmessung. ....	44
Tabelle 13: Rezept für Sammel- und Trenngel der denaturierenden SDS-PAGE ....	45

Tabelle 14: Rezepte für Lower Tris, Upper Tris, APS 40%, Auftragspuffer, Laufpuffer und die Coomassie Färbe- und Entfärbelösung. ....	46
Tabelle 15: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Agaricus arvensis</i> (AARV). .....	51
Tabelle 16: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Cyathus limbatus</i> (CLIM). .....	52
Tabelle 17: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Coprinellus micaceus</i> (CMI).....	53
Tabelle 18: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Epicoccum nigrum</i> (ENI). .....	54
Tabelle 19: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Entomophthora thaxteriana</i> (ETH).....	55
Tabelle 20: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Hypholoma sublateritium</i> (HSU).....	57
Tabelle 21: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Inonotus obliquus</i> (IOB). .....	58
Tabelle 22: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Lepista nuda</i> (LNU). ....	59
Tabelle 23: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Lactarius torminosus</i> (LTO).....	60
Tabelle 24: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Lycoperdon pyriforme</i> (LYP). ....	61
Tabelle 25: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Mycena galericulata</i> (MAG).....	62
Tabelle 26: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Meripilus giganteus</i> (MGI). .....	63
Tabelle 27: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Mortierella hyalina</i> (MHY). Daten bereitgestellt durch Andreas Hammer.....	64
Tabelle 28: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Pleurotus cornucopiae</i> (PCOR).....	66
Tabelle 29: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Polyporus melanopus</i> (PME). ....	67
Tabelle 30: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von <i>Pholiota nameko</i> (PNA). .....	68

Tabelle 31: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Pleurotus pulmonarius (PPU-D).....	69
Tabelle 32: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Pythium ultimum (PUL). .....	70
Tabelle 33: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Polyporus umbellatus (PUM). ....	72
Tabelle 34: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Suillus variegatus (SVA). .....	73
Tabelle 35: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Macrolepiota albuminosa (TAL).....	74
Tabelle 36: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Trametes suaveolens (TSU).....	75
Tabelle 37: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Ustilago maydis (UMA-1). .....	76
Tabelle 38: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Xylaria longipes (XLO). 78	
<i>Tabelle 39: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Ahifloweröl (AFO).....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 40: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Borretschsamenöl (BSO). .....</i>	<i>80</i>
<i>Tabelle 41: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Johannisbeerkernöl (JKO). .....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 42: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Mortiarella alpina peyronel Öl (MAP).....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 43: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Macadamianussöl (MNO). .....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 44: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Sanddornkernöl (SKO).</i>	<i>85</i>
Tabelle 45: Olfaktorischer Gesamteindruck der Umsetzungsbrühen von Ahifloweröl (AFO), Borretschsamenöl (BSO), Entomophthora thaxteriana (ETH), Johannisbeerkernöl (JKO), Mortiarella albina peyronel Öl (MAP), Mortierella hyalina (MHY), Macadamianussöl (MNO), Sanddornkernöl (SKO). Skala: 0= unangenehm; 5= angenehm.....	99
Tabelle 46: Aldehydprofil der Umsetzung von Ahiflower (AFO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert.....	101

Tabelle 47: Aldehydprofil der Umsetzung von Borretschsamenöl (BSO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert.....	102
Tabelle 48: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts aus Entomophthora thaxteriana (ETH) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert, * = nicht hinreichend validiert.....	103
Tabelle 49: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von Inonotus obliquus (IOB) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert, * = nicht hinreichend validiert.....	104
Tabelle 50: Aldehydprofil der Umsetzung von Johannisbeerkernöl (JKO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert.....	105
Tabelle 51: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von Mortiarella alpina peyronel Öl (MAP) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert .....	106
Tabelle 52: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von Mortierella hyalina (MHY) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert, * = nicht hinreichend validiert .....	107
Tabelle 53: Aldehydprofil der Umsetzung von Macadamianussöl (MNO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert.....	108
Tabelle 54: Aldehydprofil der Umsetzung von Sanddornkernöl (SKO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert.....	109
Tabelle 55: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von Suillus variegatus (SVA) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert, * = nicht hinreichend validiert .....	110
Tabelle 56: Aldehydprofil der Umsetzung von Linolsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. ....	111
Tabelle 57: Aldehydprofil der Umsetzung von Margaroleinsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. ....	111
Tabelle 58: Aldehydprofil der Umsetzung von Ölsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert .....	111

Tabelle 59: Aldehydprofil der Umsetzung von Palmitoleinsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. .... 112

## Summary

In this work, natural sources such as fungi and nuts were analyzed with regard to their fatty acid composition in order to generate novel, odor-active aldehydes from them through enzymatic conversions. Aldehydes are a versatile and popular class of aroma compounds. A biotechnological approach to odor-active aldehydes was developed by converting fatty acids with two enzymes of the  $\alpha$ -dioxygenase pathway. The recombinant enzymes  $\alpha$ -dioxygenase ( $\alpha$ -DOX) from *Crocospaera subtropica* and fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) from *Vibrio harveyi* were heterologously expressed in *E. coli*, purified and combined in a cascade reaction. The concept was optimized with regard to reaction cycles and production yield. For this purpose, the two enzymes  $\alpha$ -DOX and FALDH were combined. In the first step, the fatty acids were transformed by  $\alpha$ -DOX into an aldehyde shortened by one C atom, which in turn was oxidized to an acid by FALDH. This resulted in a cyclic reaction in which the fatty acids were transformed into a chain-shortened aldehyde in each cycle. The resulting aldehydes were identified and sensory characterized by headspace - solid phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry - olfactometry (HS-SPME-GC-MS-O).

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden natürliche Quellen wie Pilze und Nüsse hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung analysiert, um aus diesen durch enzymatische Umsetzungen neuartige, geruchsaktive Aldehyde zu generieren. Aldehyde stellen eine vielseitige und beliebte Klasse von Aromastoffen dar. Ein biotechnologischer Zugang zu geruchsaktiven Aldehyden wurde durch die Umwandlung von Fettsäuren mit zwei Enzymen des  $\alpha$ -Dioxygenasewegs entwickelt. Die rekombinanten Enzyme  $\alpha$ -Dioxygenase ( $\alpha$ -DOX) aus *Crocospaera subtropica* und Fettaldehyddehydrogenase (FALDH) aus *Vibrio harveyi* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in einer Kaskadenreaktion kombiniert. Das Konzept wurde im Hinblick auf Reaktionszyklen und Produktionsausbeute optimiert. Hierfür wurden die beiden Enzyme  $\alpha$ -DOX und FALDH kombiniert. Im ersten Schritt wurden die Fettsäuren mittels  $\alpha$ -DOX in ein, um ein C-Atom verkürztes, Aldehyd transformiert, welcher wiederum durch die FALDH zur Säure oxidiert wurde. Dadurch entstand eine zyklische Reaktion bei der die Fettsäuren in jedem Zyklus in einen kettenverkürzten Aldehyd transformiert wurden. Die so entstandenen Aldehyde wurden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion-Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Olfaktometrie (HS-SPME-GC-MS-O) identifiziert und sensorisch charakterisiert.

## 1. Einleitung

Chemische Verbindungen mit olfaktorischen Eigenschaften werden in großem Umfang in verschiedenen Industriezweigen, wie zum Beispiel der Parfum-, Deo- oder Kosmetikindustrie, aber auch in der Lebensmittelindustrie als Aroma und Duftstoffe eingesetzt. Bekannte Vertreter sind Decanal, Undecanal, Dodecanal und Undec-10-enal, die als Kopfnote beliebter Parfums wie Chanel No 5 und Rallet No 1 dienen (Cotton 2012; Surburg and Panten 2006). Für die Belange der Industrie ist eine Kombination aus gesundheitlicher Unbedenklichkeit, kostengünstiger Herstellung, Naturbelassenheit und olfaktorischer Eigenschaften der Produkte entscheidend. In den letzten Jahren hat die Bedeutung der Naturbelassenheit der Produkte stark zugenommen, da dies zu einem der Hauptfaktoren für die Akzeptanz durch die Verbraucher geworden ist. Deswegen sucht die Industrie stetig nach Alternativen natürlichen Ursprungs. Zu diesem Zweck können aromaaktive, also olfaktorisch aktive, Verbindungen direkt aus natürlichen Quellen wie Pflanzen, Pilzen, Früchten und Ähnlichem extrahiert werden. Je nach gewünschtem Produkt ist diese Herangehensweise auch sehr gebräuchlich. Jedoch gehen damit einige Herausforderungen einher, wie die gleichbleibende Qualität von natürlichen Extrakten zu garantieren, oder einzelne Aromastoffe aus komplexen natürlichen Extrakten zu extrahieren und zu identifizieren. Um diese Problematik zu umgehen, können Aromastoffe natürlichen Ursprungs auch durch biotechnologische Methoden gewonnen werden. Diese Ausgangsstoffe natürlichen Ursprungs werden gezielt mit unterschiedlichen Enzymen in die gewünschten Aromen transformiert. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass die Produktion der Aromen gezielter gesteuert werden kann und die so entstandenen Verbindungen trotzdem weiterhin als „natürliche Aromen“ gelten.

### 1.1 Natürliche Quellen der Fettsäuren

Langkettige Fettsäuren sind die wichtigsten Ausgangsstoffe für die Herstellung geruchsaktiver Aldehyde. Sie werden traditionell aus Pflanzen oder Tieren gewonnen. In den letzten Jahren wurden mikrobielle Produktionsansätze eingehend untersucht, wobei sich eine Reihe von Pilzen als reiche Quellen für Lipide erwiesen haben, die unter anderem wertvolle ungesättigte Fettsäuren enthalten (Weete 1974; Shimizu et al. 1988). Hefen, einschließlich *Saccharomyces cerevisiae* und insbesondere ölhaltige

Hefen, wurden im Hinblick auf die Fettsäureproduktion und die Modulation des Fettsäuremusters, z. B. durch Züchtung oder metabolisches Engineering, intensiv untersucht (Gajewski et al. 2017; Runguphan and Keasling 2014; Lamers et al. 2016). Fadenpilze wurden in diesem Zusammenhang weniger gut untersucht. Es wurde jedoch berichtet, dass Vertreter der Gattung *Mortierella* neben den von Natur aus seltenen ungeradzahligen Fettsäuren beträchtliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) wie Arachidonsäure [20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)] und Eicosapentaensäure [20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)] anreichern (Totani and Oba 1987; Shimizu et al. 1988; Shinmen et al. 1989; Shimizu et al. 1991). Es wurden fermentative Ansätze zur Optimierung und Modulation der Fettsäureproduktion unternommen. (Totani and Oba 1987) beobachteten die Bildung von PUFAs während der Kultivierung auf Agar-Platten, während sich spätere Studien auf die industriell günstigere Submerskultivierung konzentrierten, um die Zielverbindungen im Myzel zu akkumulieren. Es hat sich gezeigt, dass eine Änderung der Kultivierungsparameter die Lipidausbeute sowie die Fettsäurezusammensetzung verschiedener *Mortierella*-Stämme drastisch moduliert (Shimizu et al. 1988; Dyal and Narine 2005; Buráňová et al. 1990; Sajbidor et al. 1988; Hansson and Dostlek 1988). Eine Medienergänzung von *Mortierella* und anderen Pilzen wie *Entomophthora* oder *Conidiobolus spp.* führte zu einer erhöhten Ausbeute an ungesättigten Fettsäuren (Shimizu et al. 1991, 1989; Bajpai and Bajpai 1993; Kendrick and Ratledge 1996). Solche einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus Pilzen sind für die Feinchemie von besonderem Interesse, da sie als natürliche Verbindungen für medizinische, ernährungsphysiologische oder kosmetische Anwendungen sowie als Ausgangsstoffe für seltene ungesättigte Fettaldehyde dienen können. Pilze haben darüber hinaus auch einen industriellen Vorteil, da sie in Bioreaktoren jederzeit in den gewünschten Mengen kultivierbar sind und im Gegensatz zu Früchten und Nüssen saisonunabhängig zur Verfügung stehen.

## 1.2 Fettaldehyde als biologische Aromastoffe

Eine Gruppe der Aromastoffe, die sowohl durch Extraktion aus natürlichen Quellen als auch durch biotechnologische Methoden hergestellt werden kann ist die Gruppe der Aldehyde, welche zu der Stoffklasse der Carbonylverbindungen gehören (Abbildung 1). Man unterscheidet nach gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach

ungesättigten Aldehyden, je nach Anzahl der enthaltenen Doppelbindungen zwischen den C-Atomen der Kette.

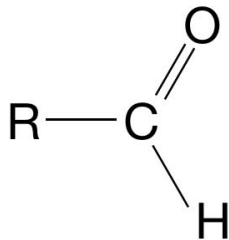


Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Aldehyds.

Vor allem mittel- und langkettige Fettaldehyde stellen eine wichtige Stoffklasse dar, die in großem Umfang für Aroma- und Duftanwendungen eingesetzt wird (Truong et al. 2017; Kim et al. 2022a). So riechen gesättigte und ungesättigte Fettaldehyde mit Kohlenstoffkettenlängen zwischen 11 und 18 meist blumig, seifig, zitrus- und wachstartig (Buttery et al. 1988; Guadagni et al. 1963). Obwohl Fettaldehyde in einer Vielzahl von Organismen vorkommen, wie zum Beispiel als Lock- und Duftstoffe in Pflanzen und Tiere, sind ihre Konzentrationen in der Regel gering, und die Extraktion z. B. aus Zitruschalen ist nicht sehr wirtschaftlich, da die Fraktionierung und Trennung von gesättigten und ungesättigten Fettaldehyden aufgrund ihrer ähnlichen physikochemischen Eigenschaften kostspielige und prozessintensive Techniken erfordert. Abgesehen von der großen Skepsis gegenüber chemisch-synthetischen Inhaltsstoffen für Lebensmittel und Kosmetika erfordern die oben beschriebenen, synthetischen Produktionsmethoden in der Regel nach wie vor große Mengen an Chemikalien, die häufig aus Erdöl und seinen Derivaten stammen (Burger et al. 2019).

### 1.3 Enzymatische Möglichkeiten

Angesichts der steigenden Nachfrage nach natürlichen Lebensmittelzutaten haben sich biotechnologische Verfahren als sehr gut geeignet erwiesen, da die Zielverbindungen in der Natur nur begrenzt vorkommen und energieintensive chemische Synthesen umgangen werden können. Es wurde über verschiedene biokatalytische Ansätze für die Synthese natürlicher ungesättigter und gesättigter Fettaldehyde aus Fettsäuren berichtet. Diese zeigten jedoch meist begrenzte Ausbeuten oder eine eingeschränkte Substratspezifität (Buchhaupt et al. 2012; Kerler et al. 2005). Um diese Nachteile zu umgehen, ist es spannend auf die biologischen

Mechanismen der Fettaldehydsynthese in der Natur zu blicken, denn hier stechen ein paar Synthesewege hervor:

Die Lipoxygenase (LOX) ist ein Enzym, das häufig in pflanzlichem Gewebe vorkommt. Dieses oxidiert mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Hydroperoxiden, welche darauf entweder spontan zerfallen oder mittels Hydroperoxid-Lyasen gespalten werden, wodurch kurz- bis mittelkettige Aldehyde entstehen. Kerler et al. (2005) verwendeten eine aus Soja gewonnene LOX für die Biotransformation von hydrolysierten Triglyceriden oder freien Fettsäuren. Diese wurden zunächst zu Hydroperoxiden oxidiert und danach durch thermische Behandlung unter sauren Bedingungen zu kurzkettigen Aldehyden umgesetzt. In einem anderen Ansatz gewannen (Stolterfoht et al. 2019) Aldehyde aus der Biotransformation von Fettsäuren mittels rekombinanter LOX in Kombination mit einer Hydroperoxid-Lyase.

Ein weiterer Ansatz nutzt die direkte Reduktion von Fettsäuren zu den entsprechenden Aldehyden mittels Carbonsäurereductase (CAR) (Fraatz et al. 2018; Hammer et al. 2021; Horvat and Winkler 2020). Dabei wird die Carboxylgruppe reduziert wodurch das entsprechende Aldehyd mit gleichbleibender Kettenlänge entsteht. CARs benötigen Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und zusätzlich Adenosintriphosphat (ATP). Daher ist die Regeneration der Kofaktoren für großtechnische biotechnologische Anwendungen unerlässlich. Die Reduktion von Fettsäuren durch eine rekombinante CAR aus *Mycobacterium marinum* wurde erfolgreich zur Herstellung von gesättigten C4- bis C18-Aldehyden und ungesättigten C18-Analoga eingesetzt (Akhtar et al. 2013). Das gleiche Enzym wurde später zur Gewinnung von 12-Methyltridecanal aus der entsprechenden Fettsäure eingesetzt. Da *Conidiobolus* spp. als reiche Quelle für methylverzweigte Fettsäuren identifiziert wurde, wurde auch ein hydrolysiertes Lipidextrakt biotransformiert, was zu einem komplexen Aldehydgemisch führte (Fraatz et al. 2018). In ähnlicher Weise dienten mehrere endständig einfach ungesättigte C7-C13-Säuren und ein Pilzlipidextrakt von *Flammulina velutipes* als Substrate für CAR-vermittelte Biotransformationsexperimente (Hammer et al. 2021).

Zusätzlich ist auch die umgekehrte Reaktion von Alkoholen zu Aldehyden, katalysiert durch Alkoholdehydrogenasen, als Methode zur Gewinnung von Aldehyden bekannt

(Berger 1995). Jedoch sind Alkoholdehydrogenasen auf den Kofaktor Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) angewiesen.

Im Gegensatz dazu benötigen  $\alpha$ -Dioxygenasen ( $\alpha$ -Dox) ausschließlich molekularen Sauerstoff für die katalytische  $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren. Die entstehende 2-Hydroperoxyfettsäure reagiert entweder zu einer 2-Hydroxyfettsäure oder decarboxyliert spontan und bildet einen C<sub>n-1</sub>-Aldehyd (Kim et al. 2022a; Shine and Stumpf 1974; Galliard and Matthew 1976; Hamberg et al. 1999). Mehrere  $\alpha$ -Dioxygenasen wurden beschrieben und für die Produktion aliphatischer Aldehyde eingesetzt, z. B. aus Gurke (Galliard and Matthew 1976), Tabak (Kawasaki et al. 1998; Hamberg et al. 1999), Reis (Koeduka et al. 2002; Kaehne et al. 2011), *Arabidopsis thaliana* (Hamberg et al. 1999; Liu et al. 2006) und Algen (Akakabe et al. 1999; Kajiwara et al. 1989). In jüngerer Zeit wurden  $\alpha$ -Dioxygenasen in den Cyanobakterien *Crocospaera subtropica* (Hammer et al. 2020), *Calothrix parietina* und *Leptolyngbya* sp. (Kim et al. 2022b) identifiziert. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde eine  $\alpha$ -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica* (*Csa*-Dox) verwendet (Abbildung 2).

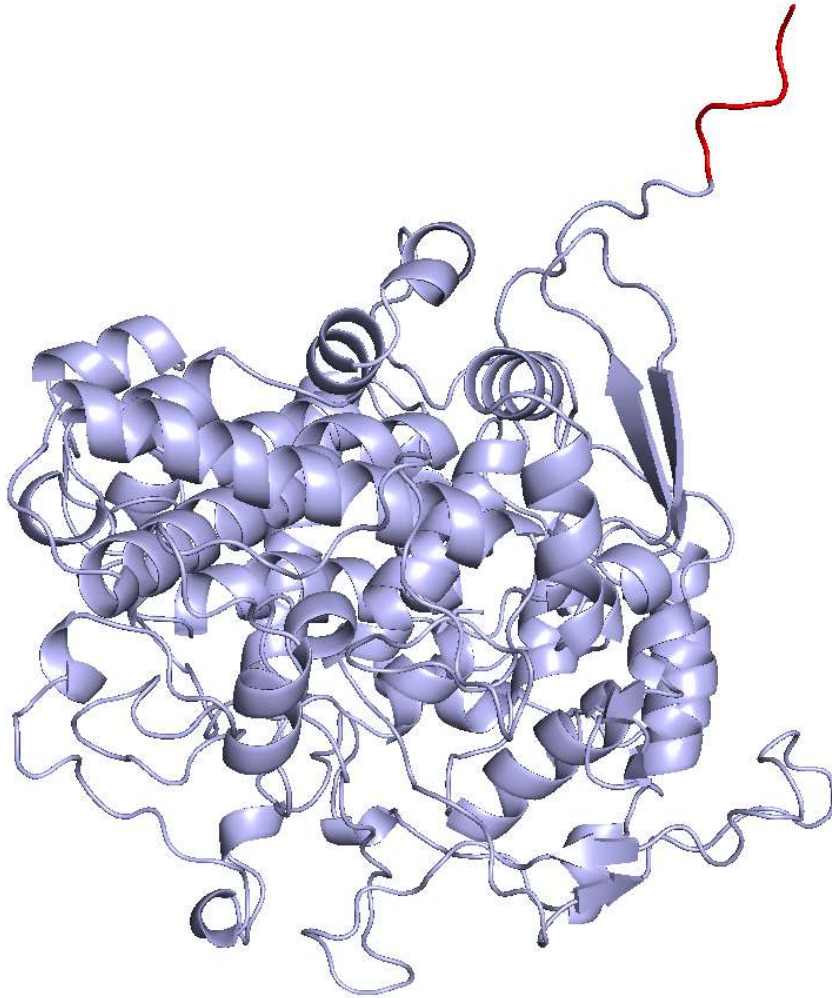


Abbildung 2: Sekundärstruktur einer  $\alpha$ -Dioxygenase aus *Crocosphaera subtropica* (Csa-Dox). Rot markiert der HIS-Tag für die Reinigung.

Fettaldehyddehydrogenasen (FALDH) oxidieren Aldehyde zu Carbonsäuren. Obwohl diese umgekehrte Reaktion von Aldehyden hin zu Säuren im ersten Moment abträglich erscheint, so eröffnet dieses Enzym doch die Möglichkeit in Kombination mit einer  $\alpha$ -Dioxygenase eine Reihe verschiedener Aldehyde zu produzieren. Die Aldehyddehydrogenase (Abbildung 3), isoliert aus *Vibrio harveyi* (VhFALDH) (Buchhaupt et al. 2013), die als Dimer vorliegt und wie andere Aldehyddehydrogenasen auch auf den Kofaktor NAD(P)<sup>+</sup> angewiesen ist um die Oxidationsreaktion auszuführen, wurde in den weiteren Untersuchungen dieser Arbeit verwendet.

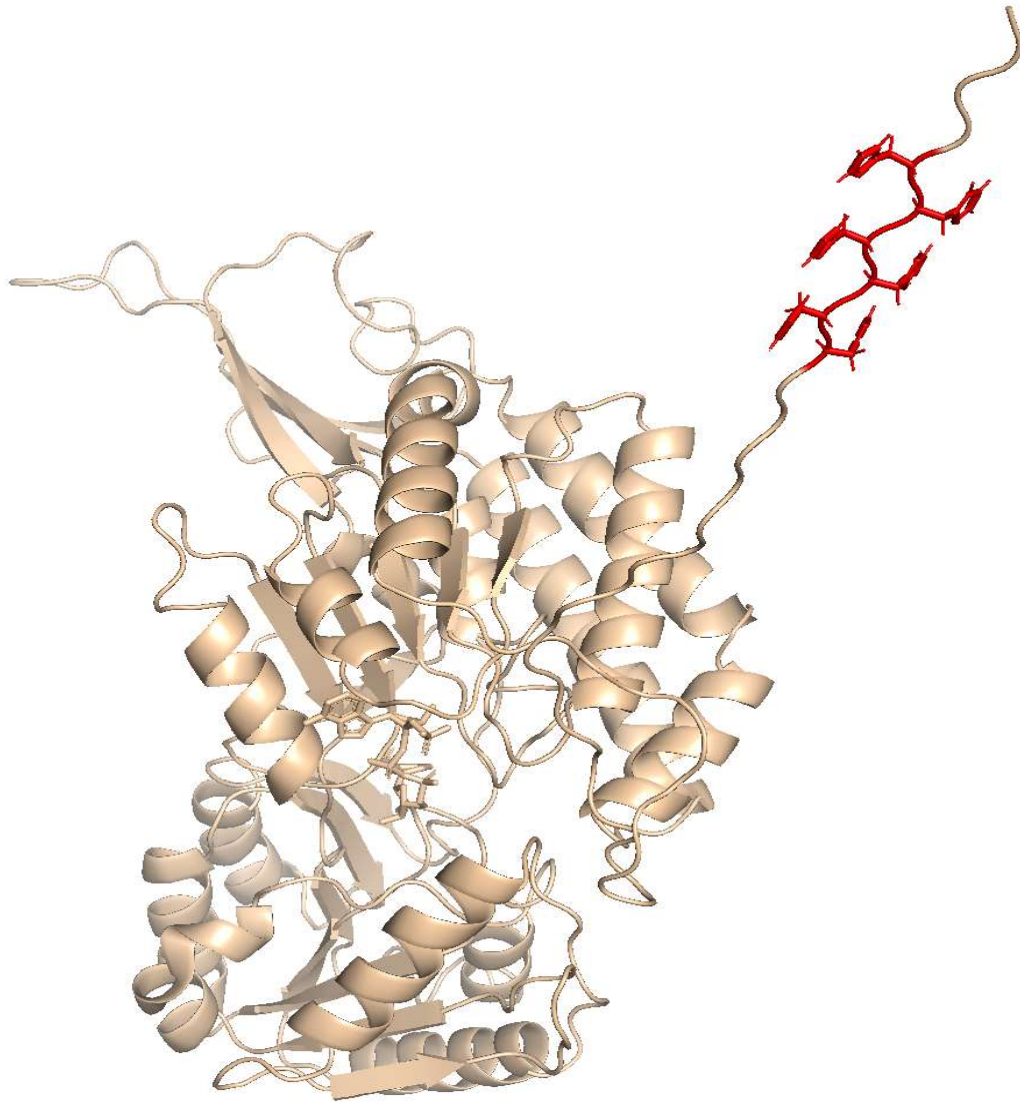


Abbildung 3: Sekundärstruktur des Monomers der Aldehyddehydrogenase aus *Vibrio harveyi* (VhFALDH). Rot markiert der HIS-Tag für die Reinigung.

#### 1.4 Kaskadenreaktion

Die Kombination aus  $\alpha$ -Dioxygenase und Aldehyddehydrogenase ermöglicht eine Kaskadenreaktion, bei der die Kettenlänge der entstehenden Aldehyde bei jedem Zyklus um ein C-Atom verkürzt wird (Abbildung 4). Diese kombinierte Reaktion wurde bereits in Pflanzen vermutet (Shine and Stumpf 1974) und ist als Abwehrmechanismus gegen Umweltstress und Pathogeninfektionen bekannt (Hamberg et al. 2002).

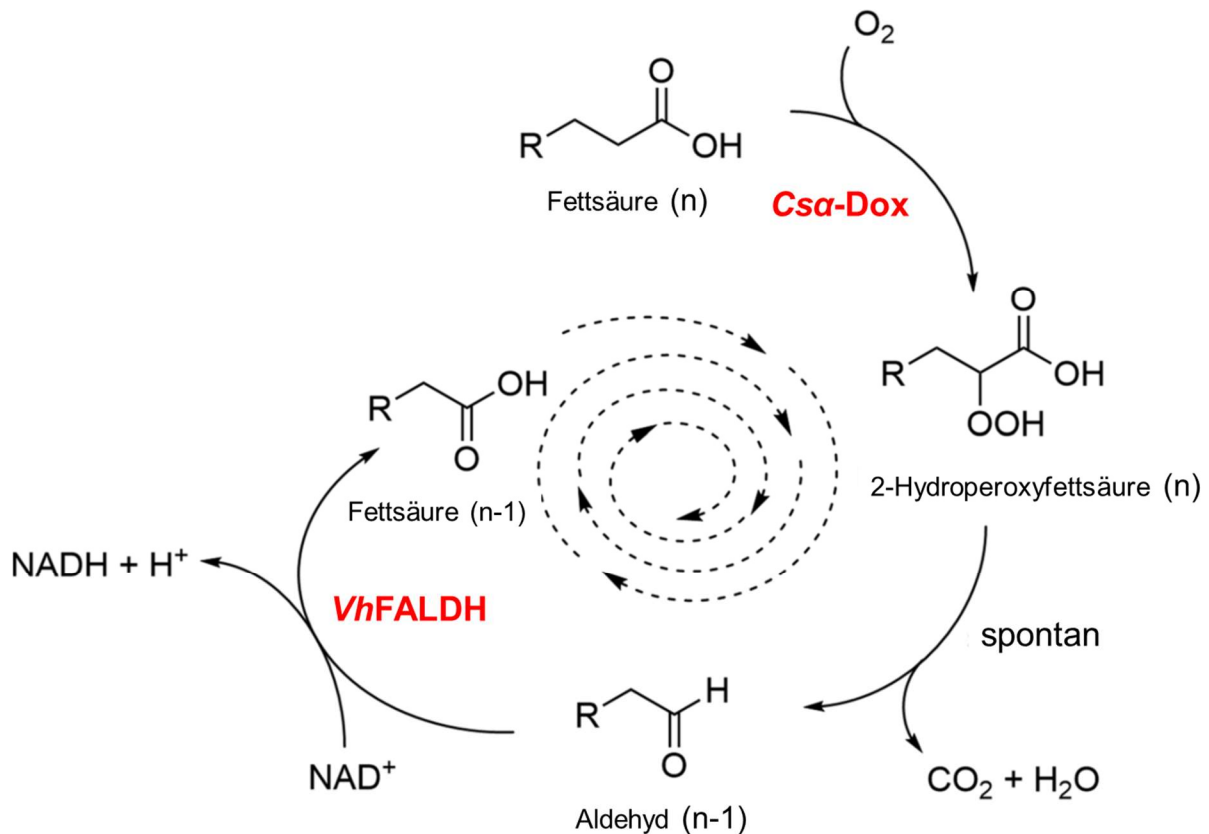


Abbildung 4: Kaskadenreaktion der  $\alpha$ -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica* (Csa-DOX) und der Aldehyddehydrogenasen aus *Vibrio harveyi* (VhFALDH). Modifiziert nach (Kanter et al. 2022)

## 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, unterschiedliche natürliche Quellen wie Pilze und Nüsse hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung zu untersuchen, um ein geeignetes Ausgangsmaterial für die biotechnologische Umsetzung der Fettsäuren in geruchsaktive Aldehyde zu erhalten. Durch die Kombination der beiden Enzyme Csa-Dox und VhFALDH war es möglich, verschiedene Aldehyde mit um ein C-Atom verkürzten Kohlenstoffketten pro Reaktionszyklus herzustellen. Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Enzymkaskade wurde optimiert, um größere Mengen an geruchsaktiven Fettaldehyden zu erhalten. Durch die Verwendung von Lipidextrakten aus unterschiedlichen natürlichen Quellen war es möglich, eine Reihe interessanter Aldehyde zu produzieren, die potentielle Kandidaten für eine industrielle Produktion sein könnten. Die durch die enzymatische Umsetzung gewonnenen Extrakte und Aldehyde wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Olfaktometrie (GC-MS-O) analysiert und olfaktorisch klassifiziert. Um die wichtigsten so entstandenen gebildeten Aldehyde eindeutig zu identifizieren, wurden analytische Standards der vorherrschenden Fettsäuren ebenfalls umgesetzt. Hierdurch konnten

die chemische Struktur und die olfaktorischen Eigenschaften der produzierten Aldehyde genauer bestimmt werden. Damit wurde angestrebt, sowohl eine industriell einsetzbare Methodik für die biotechnologische Transformation von Fettsäuren in geruchsaktive Aldehyde zu etablieren, als auch neue Geruchseindrücke und Aldehyde zu identifizieren und zu beschreiben, die potentielle Kandidaten für eine industrielle Produktion darstellen könnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Fettsäurescreening

Zur Bestimmung der Fettsäureprofile verschiedener Pilze wurden diese anhand der möglichen daraus entstehenden geruchsaktiven Aldehyde und der Unbedenklichkeit für den Menschen ausgewählt. Diese Pilze wurden kultiviert und anschließend das Fett extrahiert um schließlich das Fettsäureprofil mittels GC-MS zu bestimmen. Der Fettsäureextrakt und das Fettsäureprofil von *Mortierella hyalina* (MHY) wurden von Andreas Hammer zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden die Öle Borretschsamenöl (BSO), Ahifloweröl (AFO), Macadamianussöl (MNO), Sanddornkernöl (SKO), Johannisbeerkernöl (JKO) und *Mortierella albina peyronel* Öl (MAP) von Symrise AG (Holzminden, Deutschland) zur Verfügung gestellt und deren Fettsäureprofile ebenfalls mittels GC-MS analysiert.

#### 2.1.1 Pilzkultivierung und Medien

Zur Bestimmung der Fettsäureprofile der Pilze wurden die jeweiligen Pilze (Tabelle 1) auf einem Agarmedium (Tabelle 2) auf Agarplatten bis zu einem Bewuchs von ca. 80% gezüchtet. Daraufhin wurde ein 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> Stück junges Myzel auf eine zweite Platte übertragen, die ebenfalls bis zu einem Bewuchs von ca. 80% kultiviert wurde. Zwei je 1 x 1 cm<sup>2</sup> große Stücke der zweiten Platte wurden in zwei Vorkulturen mit 200 mL Medium (in 500 mL Erlenmeyerkolben) überführt und mit einem Dispergiergerät (ULTRA-TURRAX) homogenisiert. Nach Bewachsen der Vorkulturen wurden diese homogenisiert und jeweils 40 mL des homogenisierten Myzels in drei Hauptkulturen á 400 mL (in 1000 mL Erlenmeyerkolben) überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C.

Tabelle 1: Übersicht aller untersuchten Pilze und deren Ordnung mit Wachstumsgeschwindigkeiten bis zu einem Bewuchs von 80% auf Platte, Vorkultur (VK) und Hauptkultur (HK). Verwendete Medien für die Kultivierung, Kürzel der Pilznamen und falls verfügbar die kommerzielle Stammnummer.

Name	Ordnung	Kommerzielle Stammnummer	Medium	Kürzel	Wachstum in Tagen			
					1. Platte	2. Platte	VK	HK
<i>Agaricus arvensis</i>	Basidiomycota	CBS 583.76	ME(A)	AARV	17	16	8	4
<i>Coprinellus micaceus</i>	Basidiomycota	N/A	ME(A)	CMI	6	4	4	3
<i>Cyathus limbatus</i>	Basidiomycota	CBS 335.81	ME(A)	CLIM	6	7	3	4
<i>Entomophthora thaxteriana</i>	Zygomycota	CBS 181.60	MEP(A)	ETH	11	8	17	4
<i>Epicoccum nigrum</i>	Ascomycota	N/A	ME(A)	ENI	7	10	3	3
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Basidiomycota	N/A	ME(A)	HSU	16	16	7	2
<i>Inonotus obliquus</i>	Basidiomycota	CBS 314.39	MEP(A)	IOB	11	18	7	5
<i>Lactarius torminosus</i>	Basidiomycota	CBS 197.72	MMN0.5(A) )	LTO	44	54	87	37
<i>Lepista nuda</i>	Basidiomycota	DSMZ 3347	MEA(A)	LNU	17	15	3	1
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	Basidiomycota	DSMZ 8676	ME(A)	LYP	20	15	14	7
<i>Macrolepiota albuminosa</i>	Basidiomycota	DSMZ 1625	ME(A)	TAL	6	4	5	2
<i>Meripilus giganteus</i>	Basidiomycota	DSMZ 8693	ME(A)	MGI	9	7	6	3
<i>Mycena galericulata</i>	Basidiomycota	CBS 499.79	ME(A)	MAG	11	15	9	6
<i>Pholiota nameko</i>	Basidiomycota	DSMZ 6908	ME(A)	PNA	8	8	6	2
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Basidiomycota	N/A	ME(A)	PCOR	9	7	6	2
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Basidiomycota	DSMZ 9558	ME(A)	PPU-D	11	15	4	4
<i>Polyporus melanopus</i>	Basidiomycota	DSMZ 5109	ME(A)	PME	6	4	4	1
<i>Polyporus umbellatus</i>	Basidiomycota	CBS 483.72	ME(A)	PUM	8	7	5	2
<i>Pythium ultimum</i>	Oomycota	CBS 249.28	ME(A)	PUL	2	2	3	3
<i>Suillus variegatus</i>	Basidiomycota	DSMZ 1752	ME(A)	SVA	27	27	18	5
<i>Trametes suaveolens</i>	Basidiomycota	DSMZ 5237	ME(A)	TSU	8	6	6	2
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomycota	N/A	MEP(A)	UMA-1	6	8	4	2
<i>Xylaria longipes</i>	Ascomycota	DSMZ 107022	MEP(A)	XLO	17	15	4	1

Tabelle 2: Übersicht der Medien zur Kultivierung der Pilze. Für Kultivierung auf Platte wurde das jeweilige Medium mit Agar-Agar supplementiert (A). Für Flüssigkulturen wurde die Rezeptur ohne Agar-Agar verwendet. MMN0.5(A)=modified Melin-Norkrans medium 0.5(agar); ME(A)=Malzextrakt(agar); MEP(A)=Malzextraktpepton(agar)

	MMN0.5(A)	ME(A)	MEP(A)
Malzextrakt	3 g/L	20 g/L	30 g/L
Sojapepton			3 g/L
Agar-Agar	15 g/L	15 g/L	15 g/L
Glucose	10 g/L		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g/L		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/L		
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,067 g/L		
FeCl <sub>3</sub> (1% Lösung)	1,2 mL/L		
NaCl	0,025 g/L		
Thiamin HCl	0,1 mg/L		

### 2.1.2 Ernte

Nach Kultivierung der Pilze in Hauptkultur wurde das Pilzmyzel mit Hilfe eines Büchnertrichters mit einem Filterpapier (LLG Labware, Meckenheim, Deutschland) unter Vakuum filtriert und bei -20°C eingefroren.

### 2.1.3 Trocknung und Feuchtebestimmung

Durch Gefriertrocknung des Pilzmyzels in einer Alpha 1-4 LSCbasic Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode am Harz, Deutschland) wurde dem Myzel Wasser entzogen und der Restfeuchtegehalt nach Trocknung mittels eines MA35 Feuchteanalysator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Das Pilzmyzel wurde bis zur weiteren Verwendung luftdicht bei -20°C gelagert.

### 2.1.4 Fettextraktion

Zur Extraktion des Fettes aus dem Pilzmyzel wurde eine SOX THERM-Einheit (Gerhard, Königswinter, Deutschland) verwendet. Als Extraktionslösungsmittel diente n-Hexan. Die SOX THERM-Becher wurden sowohl vor als auch nach der Extraktion im Trockenschrank bei 100°C getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator konstant gewogen. Das extrahierte Fett wurde in 3 mL Isooctan aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.1.5 Methylierung (FAME)

Ein Milliliter des Lipidextraktes oder Öls wurde mit 1 mL Isooctan und 0,1 mL methanolischer KOH (13,1 g KOH/100 mL Methanol) vermengt und geschüttelt. Nach 2 min wurden 2 mL gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben und ein weiteres Mal geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und über Natriumsulfat getrocknet. Die methylierten Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.1.6 GC-MS Analyse

Die Analyse mittels GC-MS wurde für die Bestimmung der Fettsäureprofile und zur Identifizierung der Kaskadenprodukte nach den enzymatischen Umsetzungen eingesetzt. Zur Extraktion der gewünschten Komponenten wurde entweder eine flüssig/flüssig Extraktion verwendet und der flüssige Extrakt für die GC-MS Analyse verwendet. Alternativ dazu erfolgte eine Extraktion im Kopfraum der Umsetzungsgefäße mittels einer SPME-Faser (*solid phase microextraction*). Mittels Kopfraum-SPME konnten auch die geruchsaktiven Substanzen detektiert werden, indem die Proben während des GC-Laufs an einem ODP (*olfactory detection port*) abgerochen wurden.

#### 2.1.6.1 Fettsäureprofilbestimmung (flüssig)

Die Extrakte wurden nach der Methylierung (siehe 2.1.5) je nach Lipidkonzentration mit unterschiedlichen split-Verhältnissen injiziert und die jeweiligen Fettsäuren anhand des Vergleichs mit den Referenzspektren der NIST-Datenbank (Version 2.0) identifiziert. Dabei wurden die jeweiligen Substanzen anhand der Datenbankvorschläge und über die Zuordnung der RI-Werte identifiziert. Zur Absicherung wurden alle Proben an zwei Säulen unterschiedlicher Polarität analysiert. Als identifiziert gelten Substanzen, die auf beiden Säulen einen R-Match über 850 hatten und deren RI-Wert zu der identifizierten Substanz passend war. Die Technischen Daten der Analysen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3:Geräteparameter des GC-MS Systems für die Fettsäureprofilbestimmung der Pilze.

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890A GC System	
<b>stationäre Phase</b>	VF-WAXms 30 m x 250 µm x 0,25 µm	Select FAME 100 m x 250 µm x 0,25 µm
<b>Trägergas</b>	Helium, 1,2 mL/min	Helium, 1,0 mL/min
<b>Autosampler</b>	GERSTEL MPS 2XL	
<b>Injektor</b>	split/splitless-Inlet, 250°C	
<b>Probenaufgabe</b>	1 µL Injektionsvolumen	
<b>Temperaturprogramm</b>	40°C (3min), 3°C/min, 240°C(12min)	80°C (1 min), 20°C/min, 145°C (30 min), 1°C/min, 198°C (0 min), 5°C/min, 250°C (15 min)
<b>Temperatur Transferlinie</b>	250°C	
<b>Detektor</b>	Agilent 5975C VL MSD	
<b>Temperaturen Detektor</b>	Ionenquelle: 230°C, Quadrupol: 150°C	
<b>Modus</b>	Totalionenscan, Massenbereich $m/z$ 33-425	
<b>Solvent Delay</b>	1 min	10 min

### 2.1.6.2 GC-MS (SPME)

Zur Extraktion mittels SPME wurde eine SPME-Faser mit einer DVB/PDMS (Divinylbenzen/Polydimethylsiloxan) Beschichtung eingesetzt. Die Technischen Daten der Analyse sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS Analyse zur Identifizierung der Aldehyde an einer VF-WAXms-Säule.

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890A GC System	
<b>Stationäre Phase</b>	VF-WAXms 30 m x 250 µm x 0,25 µm	
<b>Trägergas</b>	Helium, 1,2 mL/min	
<b>Autosampler</b>	GERSTEL MPS 2XL	
<b>Probenaufgabe</b>	Desorptionszeit 60 s (250 °C), Split/Splitless	
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), 3 °C/min, 240 °C (12 min)	
<b>Temperatur Transferline</b>	250 °C	
<b>Detektor</b>	Agilent 5975C VL MSD	
<b>Temperaturen Detektor</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C	
<b>Modus Detektor</b>	Totalionenscan, Massenbereich: <i>m/z</i> 33–425	
<b>SPME</b>	Faser-Beschichtung Inkubationszeit Extraktionstemperatur Extraktionszeit <i>bakeout</i> -Temperatur: <i>bakeout</i> -Zeit  Rührgeschwindigkeit Rührer angeschaltet Rührer ausgeschaltet	PDMS/DVB (1 cm x 65 µm) 10 min 60 °C 30 min 270 °C vor der Injektion: 1 min nach der Injektion: 1 min 250 U/min 30 s 3 s

Tabelle 5: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS Analyse zur Identifizierung der Aldehyde mittels DB-5ms-Säule.

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890B GC System	
<b>Stationäre Phase</b>	DB-5ms 30 m x 250 µm x 0,25 µm	
<b>Trägergas</b>	Helium, 1,2 mL/min	
<b>Autosampler</b>	GERSTEL MPS	
<b>Probenaufgabe</b>	Desorptionszeit 60 s (250 °C), Split/Splitless	
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), 5 °C/min, 320 °C (12 min)	
<b>Temperatur Transferline</b>	250 °C	
<b>Detektor</b>	Agilent 5977B MSD	
<b>Temperaturen Detektor</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C	
<b>Modus Detektor</b>	Totalionenscan, Massenbereich: $m/z$ 33–300	
<b>SPME</b>	Faser-Beschichtung Inkubationszeit Extraktionstemperatur Extraktionszeit <i>bakeout</i> -Temperatur: <i>bakeout</i> -Zeit  Rührgeschwindigkeit Rührer angeschaltet Rührer ausgeschaltet	PDMS/DVB (1 cm x 65 µm) 10 min 60 °C 30 min 270 °C vor der Injektion: 1 min nach der Injektion: 1 min 250 U/min 30 s 3 s

### 2.1.6.3 GC-MS/MS-O (SPME)

Um die Aldehyde nach der Umsetzung auch olfaktorisch zu bestimmen, wurde ein HS-SPME-GC-MS/MS-O-System verwendet. Zur Extraktion wurde eine SPME-Faser mit DVB/PDMS-Beschichtung verwendet. Die technischen Details der Analyse sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Geräteparameter der HS-SPME-GC-MS/MS-O-Analyse zur Identifizierung der Aldehyde und deren olfaktorische Bestimmung.

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890A GC System	
<b>Stationäre Phase</b>	VF-WAXms 30 m x 250 µm x 0,25 µm	
<b>Trärgas</b>	Helium, 1,2 mL/min	
<b>Autosampler</b>	GERSTEL MPS 2XL	
<b>Probenaufgabe</b>	Desorptionszeit 90 s (250 °C), Splitless	
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)	
<b>Temperatur Transferline</b>	250 °C	
<b>Detektor</b>	Agilent 7000	
<b>Temperaturen Detektor</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C	
<b>Modus Detektor</b>	Totalionenscan, Massenbereich: $m/z$ 33–425	
<b>ODP</b>	GERSTEL OlfactoryDetectionPort	
<b>SPME</b>	Faser-Beschichtung Inkubationszeit Extraktionstemperatur Extraktionszeit <i>bakeout</i> -Temperatur: <i>bakeout</i> -Zeit  Rührgeschwindigkeit Rührer angeschaltet Rührer ausgeschaltet	PDMS/DVB (1 cm x 65 µm) 10 min 60 °C 30 min 250 °C vor der Injektion: 5 min nach der Injektion: 10 min 250 U/min 30 s 3 s

## 2.2 Enzyme

In diesem Projekt wurden vier verschiedene Enzyme verwendet. Eine Lipase aus *Candida rugosa* (Sigma, Darmstadt, Deutschland), im weiteren CrLipase genannt, mit einer Aktivität von 2,9 U/mg. Die verwendete Aldehyddehydrogenase (*VhFALDH*) stammt ursprünglich aus dem marinen Bakterium *Vibrio harveyi* und das für die Expression nötige Plasmid wurde von der Symrise AG (Holzminden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dieses Enzym wurde für die Verwendung in diesem Projekt mit einem HIS-Tag versehen. Die  $\alpha$ -Dioxygenase (*Csa-DOX*) stammt aus dem Organismus *Crocospheae subtropica*, der in der Literatur noch unter dem älteren Namen *Cyanothece sp.* (ATCC 51142) zu finden ist (Hammer et al. 2020). Die Aminosäuresequenzen der selbst exprimierten Enzyme sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 zu finden.

```
MGIFDKFDSIFTQVEQLWHRLPTPLALIKLLTFRNELREKNLHDTSQLPDKHLLPQ
PTPDPQGHHLTARTADGSFNDLEHPMGTRFGRNIPLTAIQPETPQQLMTP
NPRVVSRTLMTREDFKPATILNLLAAAWIQFENHDWFSHGDNKPEDKLEIPLEAN
DPWPEEYRPLEVGKTLPDTSRPEGAKPPTFINTVTHWWDGSQIYGSNPETVDQL
RSHEDGKLIIGENGLLPVDPETGVDITGFNDNWWIGLGMMLHTLFTREHNLICDHL
KQEYSQWSDDDLFDHARLINAALMAKIHTVDWTPAILPLPATDIALNVNWNWNGFLG
EDIKQVLGTVGEGEADLLTGIIGSDKNHHTAPYYLTEEFVSVYRMHPLIPDELEFR
SLEGDKFLQEVNFFEMSGKRTRALLESISLPDLFYSFGITHPGAITLHNYPRFLQQ
LVRDNGEVFDLAAVDILRDRERGVPRYNRFREIMGRGRVKCFEEISSNKQWVEE
MRRVYNDNIDQVDLMVGLFAEDTPEGFGFSDTAFRVFILMASRRLKSDRFFTTD
YRAEIYTQFGLDWIANNMVSVLQRHFPQLSPVLYGVDNAFKPWRRVPSLEHHH
HHH
```

Abbildung 1: Aminosäuresequenz der Csa-DOX mit einem C-terminalen HIS-Tag

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMNPQTDNVFYATNAFTGEALPLAFPVHTEVEV  
NQAATAAAKVARDFRRLNNSKRASLLRTIASELEARSDDIARAHLETALPEVRLT  
GEIARTANQLRLFADVNSGSYHQAILDTPNPTRAPLPKPDIRRQQIALGPVAVF  
GASNFLAFSAAGGDTASALAAGCPVIVKGHQAHPGTSQIVAECIEQALKQEQL  
PQAIFTLLQGNQRALGQALVSHPEIKAVGFTGSVGGGRALFNLAHERPEPIPFY  
GELGAINPTFIFPSAMRAKADLADQFVASMTMGCGQFCTKPGVVFALNTPETQA  
FIETAQSLIRQQSPSTLLTPGIRDSYQSQVVSRRGSDDGIDVTFSQAESPCVASAL  
FVTSSENWRKHPAWEEEEIFGPQSLIVCENVADM LSLSEMLAGSLTATIHATEE  
DYPQVSQ LIPRLEEIAGRLVFNGWPTGVEVGYAMVHGGPYPASTHSASTSVGA  
EAIHRWLRPVAYQALPESLLPDSLKAENPLEIARA VDGKAAHS

*Abbildung 2: Aminosäuresequenz der VhFALDH mit N-terminalem HIS-Tag.*

### 2.2.1 Hinzufügen HIS-TAG

Um die *VhFALDH* besser reinigen zu können, wurde das ursprüngliche Konstrukt umklont und mit einem N-terminalen HIS-Tag versehen (Abbildung 7). Das ursprüngliche Konstrukt war das *VhFALDH*-Gen in einem pET-Duet-Vector mit einem T175Q Basenaustausch (pET-DUET-*VhFALDH*-T175Q) (Abbildung 8). Dieses Konstrukt wurde in einem *E. Coli* W3110(DE3) von der Symrise AG (Holzminden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt beinhaltet nach der Klonierung das *VhFALDH* Gen mit einem N-terminalen HIS-Tag und einer Kanamycinresistenz (Abbildung 9). Dieses Konstrukt wurde in einen *E. coli* W3110(DE3) transformiert (zur Verfügung gestellt durch Symrise AG, Holzminden, Deutschland).

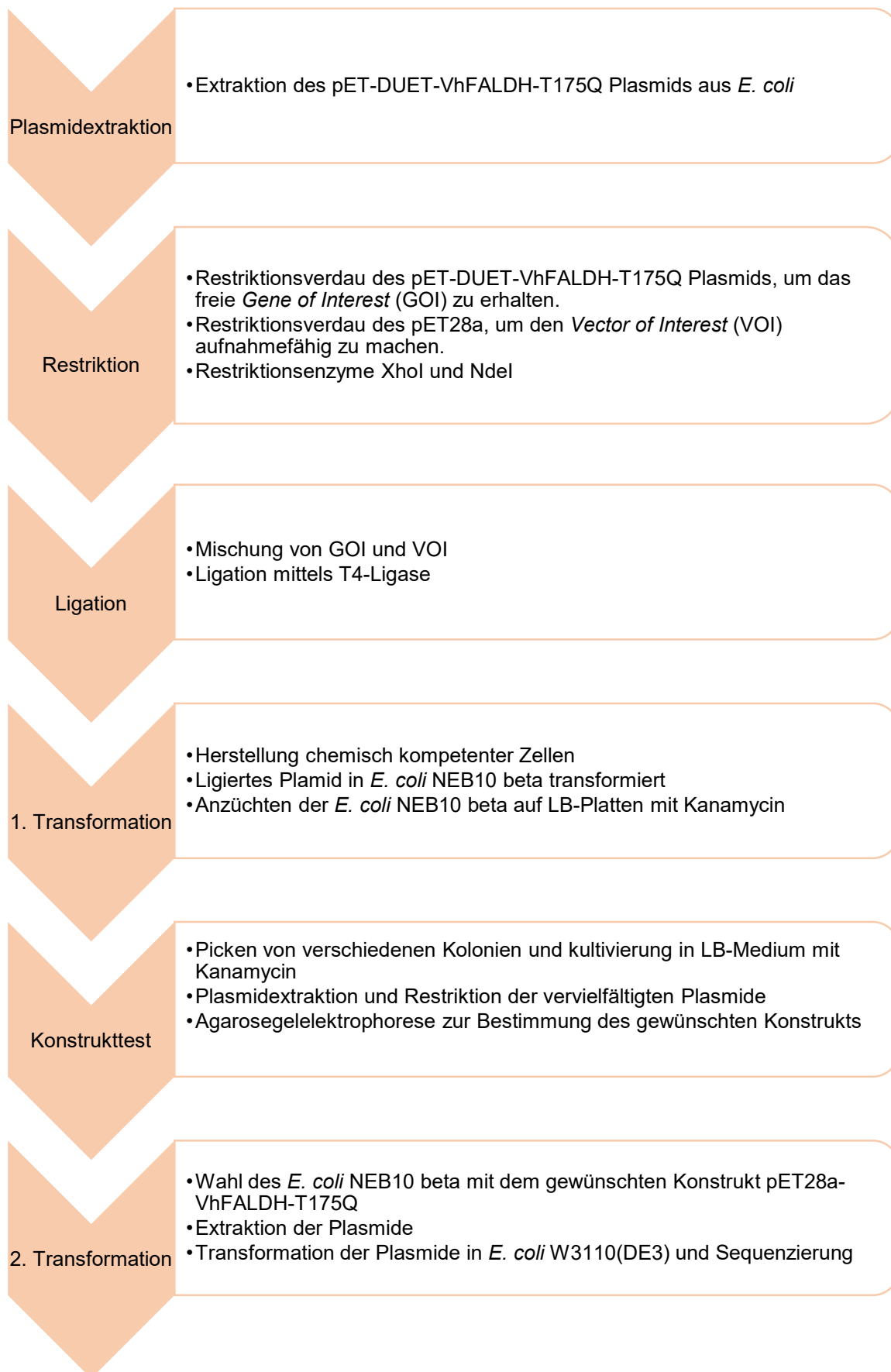


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Umklonierung der VhFALDH

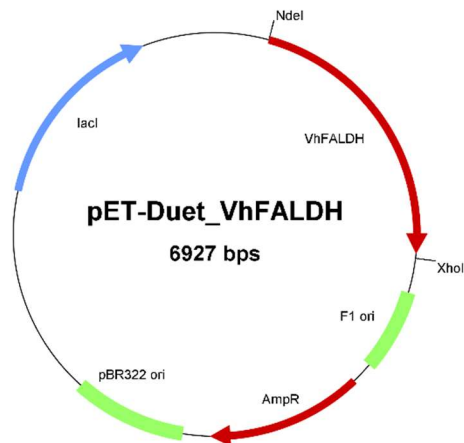


Abbildung 8: Plasmidkarte des Plasmids pET-DUET-VhFALDH-T175Q mit der Ampicillin-Resistenz (AmpR), dem Replikationsursprung (f1 origin), dem VhFALDH-Gen aus *Vibrio harveyi*, dem lac Repressor (lacI) und dem Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (pBR322 ori). Markiert sind außerdem die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI.

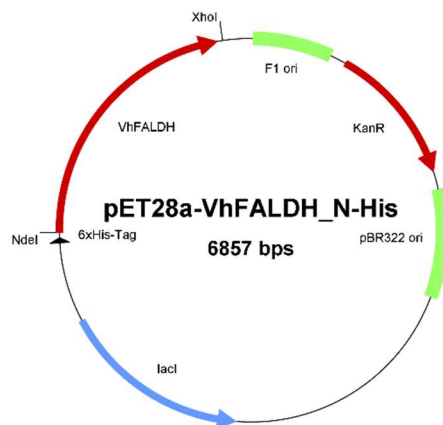


Abbildung 9: Plasmidkarte des Plasmids pET28a-VhFALDH\_N-HIS mit der Kanamycin-Resistenz (KanR), dem Replikationsursprung (f1 origin), dem VhFALDH-Gen aus *Vibrio harveyi*, dem lac Repressor (lacI) und dem Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (pBR322 ori). Markiert sind außerdem der HIS-Tag und die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI.

### 2.2.1.1 Plasmidextraktion

Zur Extraktion der Plasmide aus den *E. coli*-Zellen wurde das FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics, Düren, Deutschland) verwendet. Nach der Extraktion wurde die dsDNA-Konzentration mittels eines Implen NanoPhotometer® P300 bestimmt und die Plasmidextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.2 Restriktion

Für die Restriktion der Plasmide aus 5 mL Übernachtskultur wurden 1 µL NdeI, 1 µL XhoI, 5 µL FDPuffer und 1000 ng dsDNA verwendet und mit Reinstwasser auf ein Volumen von 50 µL aufgefüllt. Die Restriktion erfolgte für 30 min bei 37°C mit Puffer und Restriktionsenzymen der FastDigest Linie (ThermoScientific, Waltham, USA). Danach wurden die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.2.1.3 Ligation

Der GOI-Vektor und der VOI-Vektor wurden in verschiedenen Verhältnissen (1:5, 1:7, 1:10) miteinander vermengt. Zugesezt wurden 4 µL 5x T4-Ligase-Puffer und 1 µL 5x T4-DNA-Ligase. Mit ddH<sub>2</sub>O wurde auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gelagert.

### 2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Vorkultur eines Stammes aus 5 mL LB-Medium wurde in 200 mL LB-Medium in einem 500 mL Schikanekolben gegeben, sodass eine OD von 0,1 vorlag. Der Kolben wurde bei 37 °C und 180 U/min inkubiert, bis die OD 0,6 betrug. Anschließend wurde bei 4000 rcf 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 mL eiskalter 50 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert und anschließend für 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit einer Mischung aus 50 mM Calciumchlorid-Lösung (85%) und Glycerin (15%) resuspendiert. Die OD<sub>600</sub> wurde auf 200 eingestellt. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis gelagert. Je 100 µL wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.5 Transformation

Fünf Mikroliter Ligationlösung wurde in 50 µL chemisch kompetente Zellen transformiert. Die Mischung wurde 30 min auf Eis gelagert; anschließend wurde die Probe bei 42 °C für 30 s mit einem Hitzeschock versetzt, wonach sie für weitere 5 min

auf Eis gelagert wurde. 250 µL des LBSOC-Mediums wurden zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Auf LB-Agarplatten, welche eine Konzentration von 50 µg/mL Kanamycin hatten, wurden je 100 µL der Zellen ausgestrichen. Die Kolonien wuchsen über Nacht bei 37 °C. Zur Vervielfältigung der Plasmide wurde der *E. coli* Stamm NEB10 beta verwendet und für die Transformation in die enzymproduzierenden *E. coli*-Zellen der Stamm W3110(DE3).

### 2.2.1.6 Konstrukt-Test mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der klonierten Konstrukte wurden nach der Transformation mehrere Kolonien in separate Übernachtskulturen gebracht und anschließend die Plasmide isoliert und verdaut.

Die verdauten dsDNA Proben wurden auf ein 1%iges TAE-Agarosegel mit dem Fluoreszenzpuffer Midori Green Direct (Nippon Genetics, Düren, Deutschland) voneinander getrennt. Die Spannung wurde auf 100 V gesetzt und als Marker wurde FastGene 1 kb DNA Ladder plus (Nippon Genetics) eingesetzt. Als Laufpuffer und Puffer für das Agarosegel wurde ein 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Rezept für 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE Puffer) für die Agarosegelelektrophorese.

TrisHCl	242 g
Essigsäure (100%)	57,2 mL
0,5M EDTA pH 8	100 mL
VE-Wasser	ad 1000 mL

Die berechnete Größe der gewünschten Restriktionsprodukte betrug 2285 bp für das *VhFALDH-HIS* Gen und 4572 bp für das übrige Plasmid. Zur vollständigen Validierung wurde das Plasmid zur Sequenzierung an eurofins genomics gesandt.

### 2.2.2 Enzymexpression und Zellernte

Die *E. coli*-Zellen aus den Kryokulturen wurden in 5 mL LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin über Nacht bei 37 °C und 180 U/min in Vorkultur inkubiert. Am nächsten Tag wurden je fünf 1 L Erlenmeyerkolben mit 200 mL LB-Medium und 30 µg/mL Kanamycin inokuliert so dass anfangs eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 vorlag. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,4-1,6 inkubiert. Danach

wurde die Enzymexpression mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) (0,5  $\mu$ M im Kolben) induziert und die Temperatur auf 21 °C (*Cs $\alpha$ -DOX*) beziehungsweise 16°C (*VhFALDH*) reduziert und bei 160 U/min weitere 16-18 Stunden inkubiert.

Die Zellernte erfolgte nach erfolgter Enzymexpression in 50 mL Falcons und Zentrifugation für 10 min bei 2851 rcf und 4 °C in einer Beckman Coulter Allegra X-15R Zentrifuge mit einem SX4750A Rotor.

### 2.2.3 Kryokulturen

Zur Herstellung der Kryokulturen wurden 5 mL Übernachtskultur für 10 min bei Raumtemperatur und 2851 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 mL frischem LB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde je 1 mL in ein Kryoröhrchen gegeben und mit 500  $\mu$ L Glycerol (80%ig steril) versetzt, gemixt und ca. 1 h in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Kryokulturen wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4 Reinigung der Enzyme

Die Reinigung der Enzyme *Cs $\alpha$ -DOX* und *VhFALDH* erfolgte nach demselben Prinzip (Abbildung 10). Es gab allerdings Unterschiede in der Zusammensetzung der Puffer für den Reinigungsvorgang (Tabelle 8), der Porengröße der Zentrifugalfilter und der Lagertemperatur (Tabelle 9).

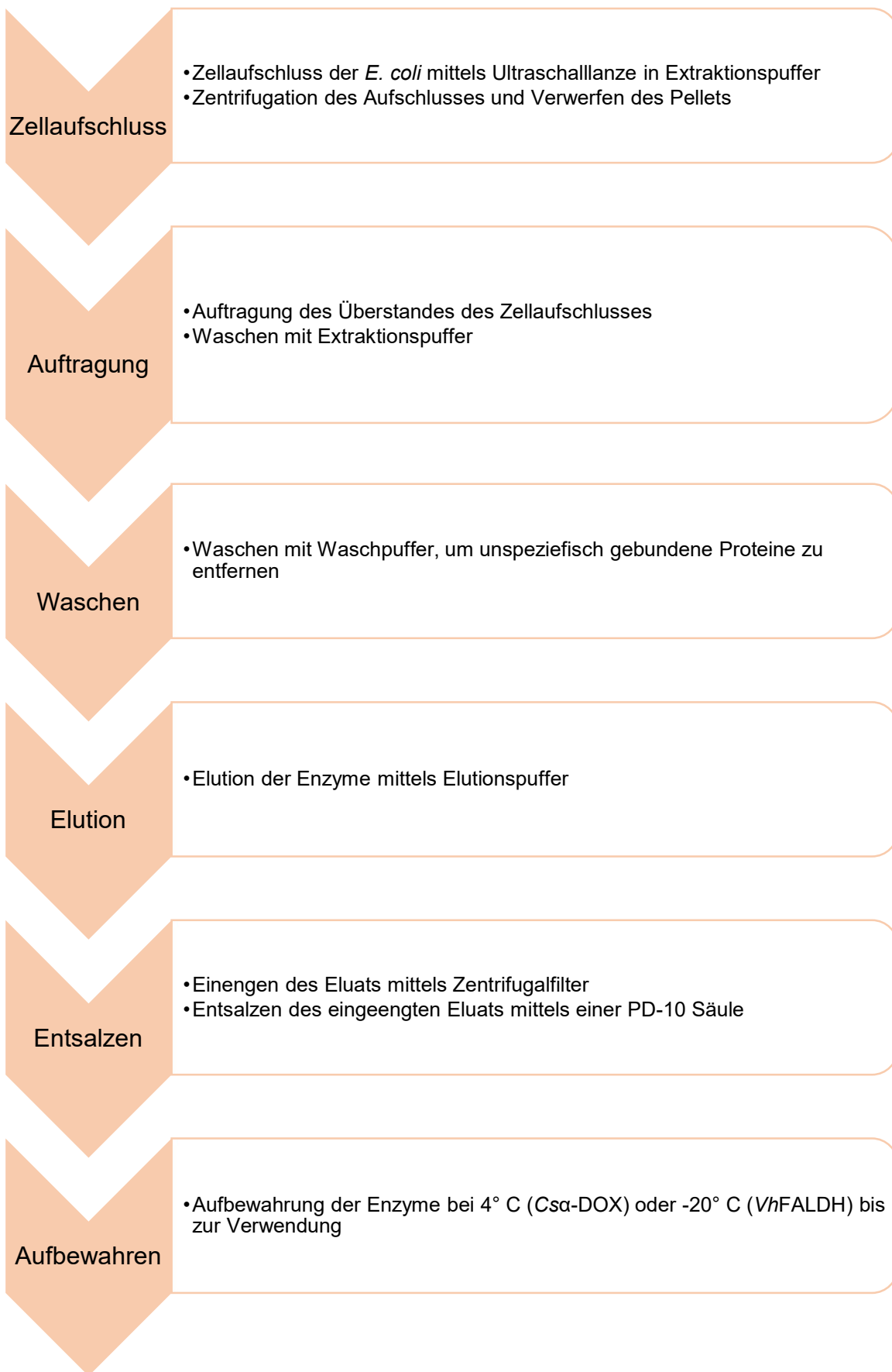


Abbildung 10: Schema der Reinigung der Enzyme

Tabelle 8: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer. Es wurde in allen Fällen ein Puffer aus  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt und diese im Verhältnis gemischt bis zu einem pH von 7,5. Nach Zugabe der weiteren Bestandteile wurde der pH nicht mehr auf die ursprünglichen 7,5 eingestellt.

	Aufschlusspuffer Cs $\alpha$ -DOX	Aufschlusspuffer VhFALDH	Waschpuffer	Elutionspuffer	Umsetzungspuffer
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	50 mM pH 7,5	50 mM pH 7,5	50 mM pH 7,5	50 mM pH 7,5	50 mM pH 7,5
Triton X-100	1%				
Imidazol	20 mM	20 mM	40 mM	250 mM	

Tabelle 9: Lagertemperaturen der verwendeten Enzyme und der verwendete cut off während der Konzentrierung des Enzyms nach der Reinigung.

	Cs $\alpha$ -DOX	VhFALDH
Lagertemperatur	4 °C	-20°C
Centricon cut off	50 kDa	30 kDa

#### 2.2.4.1 Zellaufschluss

Die geernteten Zellen wurden mit Aufschlusspuffer zu einer ca. 25%igen Zellsuspension gemischt und anschließend mit einer Ultraschalllanze aufgeschlossen. Die Ultraschalllanze (Bandelin Sonoplus HD 2070, Berlin, Deutschland) wurde mit einer MS 72 Lanze betrieben und die Zellen wurden 3x je 30 s bei 10% Power und Puls 3 aufgeschlossen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Nach Aufschluss der Zellen wurde die Zellsuspension für 10 min bei 4 °C und 2851 rcf zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und auf Eis aufbewahrt. Der Zellaufschluss wurde wie oben beschrieben noch 2 weitere Male nach diesem Schema durchgeführt, so dass insgesamt 3 Überstände vereint wurden.

#### 2.2.4.2 Reinigung mittels IMAC

Die Reinigung erfolgte mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Der gesammelte Überstand aus dem Zellaufschluss wurde auf eine Ni-NTA Säule gegeben. Die Säule bestand aus 3 mL Protino Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in einer 10 mL Pierce Zentrifugationssäule (Thermoscientific, Rockford, USA). Die Reinigung erfolgte durch Spülen mit 3 Säulenvolumina Aufschlusspuffer, um mögliche Membranrückstände zu entfernen, 3 Säulenvolumina Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu waschen und schließlich Elution mit 5 mL Elutionspuffer.

### 2.2.4.3 Entsalzen

Das Eluat wurde vor dem Entsalzen mittels eines Zentricons bei 4 °C und 2851 rcf für mehrere Minuten bis zu einem Volumen von 2,5 mL eingeeengt. Die 2,5 mL wurden auf eine PD-10 Säule (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) gegeben und der Durchlauf verworfen. Mit Zugabe von 3,5 mL Umsetzungspuffer wurde das entsalzte Enzym wieder aus der Säule gewaschen und aufgefangen. Je nach Enzym wurde das gereinigte und entsalzte Enzym bei -20 °C oder 4 °C gelagert.

### 2.2.5 Bestimmung der Qualitätsparameter der Enzyme

Zur Sicherstellung der Qualität der verwendeten Enzyme wurde nach der Reinigung und vor dem Einsatz in den Umsetzungen die wichtigsten Qualitätsparameter geprüft. Es wurde die Konzentration an Enzym bestimmt, die Reinheit des Enzyms und mögliche Verunreinigungen mittels SDS-PAGE geprüft und die Enzymaktivität gemessen.

#### 2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung

Die Enzymkonzentration nach der Reinigung wurde spektrophotometrisch mittels eines Implen NanoPhotometer® P300 mit 5 µL Probenvolumen bestimmt. Die spezifischen Werte der einzelnen Enzyme, die für die Programmierung des Photometers verwendet wurden, sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Werte wurden anhand der Aminosäuresequenz (Abbildung 5 und Abbildung 6) mit Hilfe des ProtParam-Rechners des Schweizer Instituts für Bioinformatik berechnet.

Tabelle 10: Übersicht der Enzymparameter für die photometrische Quantifizierung der C $\alpha$ -DOX und VhFALDH. Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) und das molekulare Masse (MW).

	C $\alpha$ -DOX	VhFALDH
$\epsilon$ [L/(mol*cm)]	96433	34295
MW [Da]	69894,92	56649,95

### 2.2.5.2 NADH Assay (VhFALDH)

Da die Reaktion der VhFALDH NAD<sup>+</sup>-abhängig ist, wurde die Aktivität indirekt über die Konzentrationszunahme an NADH gemessen. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten bei 340 nm und 25 °C. Es wurden jeweils Triplikate vermessen. Als Extinktionskoeffizient wurde 3328 L/(mol\*cm) verwendet. Das NAD<sup>+</sup> wurde direkt vor der Messung hinzugegeben und die Aktivität mit Hilfe untenstehender Formel berechnet. Zur Berechnung der Aktivität in U/mL Enzymlösung wurden die Messpunkte bei t = 0 s und t = 60 s verwendet und die Enzymkonzentration wurde verwendet, um die Aktivität in U/mg Enzym zu berechnen.

Tabelle 11: Volumina und Konzentrationen für die Aktivitätsbestimmung der VhFALDH.

	Volumen	Konzentration der Ausgangslösung
NAD <sup>+</sup>	10 µL	1 mM
Umsetzungspuffer	160 µL	
Enzymlösung	20 µL	10 µg/mL
Undec-10-enal in DMSO	10 µL	1 mM

### 2.2.5.3 O<sub>2</sub> Assay (Cα-DOX)

Zur Bestimmung der Cα-DOX-Aktivität wurde der Verbrauch an Sauerstoff im Reaktionsgemisch mittels einer optischen Sauerstoffsonde gemessen. Es kam ein Microx TX3 von PreSens (Regensburg, Deutschland) zum Einsatz. Die Sonde wurde mit gesättigter Natriumdithionitlösung als 0-Wert und als Positivwert mit ddH<sub>2</sub>O, das mindestens für 5 min mit Druckluft angereichert wurde, kalibriert. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten bei 25 °C und 250 U/min Rührgeschwindigkeit. Nach Zugabe der Enzymlösung wurde alle 10 s gemessen und die Werte von 20-120 s für die Berechnung herangezogen. Es wurden 5-fach Bestimmungen durchgeführt und die Sauerstoffkonzentration in µmol/L gemessen. Die genauen Konzentrationen und Volumina sind in Tabelle 12 ersichtlich.

Tabelle 12: Konzentrationen, Substanzen und Volumina für die Sauerstoffmessung.

	µL
Umsetzungspuffer pH 7,5	285,0
Enzymlösung 400 µg/mL	7,5
Dodecansäure in DMSO 200 µM	7,5

Die Enzymaktivität wurde mittels untenstehender Formel in U/mg berechnet. Anhand der Enzymkonzentration konnte die Aktivität ebenfalls in U/mL Enzym umgerechnet werden.

$$\text{Aktivität in U/mg} = \frac{\mu\text{mol/min}/3\mu\text{g}}{3} * 1000$$

#### 2.2.5.4 SDS-PAGE

Um die Reinheit des gereinigten Enzyms zu validieren, wurde nach der Reinigung der Enzyme eine denaturierende SDS-PAGE durchgeführt. Die Herstellung des Gels erfolgte anhand der Rezeptur in Tabelle 13. Die Gele wurden bei 40 mA entwickelt und danach mittels Coomassie R250 gefärbt; anschließend wurde die überschüssige Farbe durch eine Entfärbelösung aus dem Gel gewaschen. Die Rezepturen für alle verwendeten Lösungen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 13: Rezept für Sammel- und Trenngel der denaturierenden SDS-PAGE

SDS-Gel		
	Sammelgel	Trenngel
Reinstwasser	1,8 mL	2,7 mL
Rotiphoresegel 40	450 µL	1,8 mL
Upper Tris (pH 6,8)	750 µL	
Lower Tris (pH 8,8)		1,5 mL
TMED	4 µL	7,5 µL
APS 40%	10 µL	15 µL

Tabelle 14: Rezepte für Lower Tris, Upper Tris, APS 40%, Auftragspuffer, Laufpuffer und die Coomassie Färbe- und Entfärbelösung.

<b>Lower Tris (pH 8,8)</b>	
Tris	187 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4 g
Reinstwasser	ad 1 L
Einstellen auf pH 8,8 mit 1 M HCl	
<b>Upper Tris (pH 6,8)</b>	
Tris	60,55 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4,00 g
Reinstwasser	ad 1 L
Einstellen auf pH 6,8 mit 1M HCl	
<b>APS 40%</b>	
APS	4,00 g
Reinstwasser	ad 10 mL
<b>Auftragspuffer</b>	
1M Tris-HCl, pH 6,8	1 mL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	400 mg
Bromphenolblau	20 mg
Glycerol	2,3 mL
VE-Wasser	ad 8 mL
<b>10x Laufpuffer</b>	
Tris	30 g
Glycin	144 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 g
VE-Wasser	ad 1 L
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
Ethanol	400 mL
Eisessig	100 mL
Coomassie Brilliant Blue R250	1 g
VE-Wasser	ad 1 L
<b>Entfärbelösung</b>	
Ethanol	300 mL
Eisessig	100 mL
VE-Wasser	ad 1 L

## 2.3 Umsetzungen

### 2.3.1 Umsetzungen Lipide

Der Lipidextrakt bzw. das Öl wurde in 20-mL-Headspace-Fläschchen zusammen mit 2 g Glasperlen ( $\varnothing$  3 mm) gegeben, um die Oberfläche und die Turbulenzen zu vergrößern. Im Falle der Lipidextrakte in Lösung wurde das Lösungsmittel anschließend unter Stickstoff abgeblasen und die Menge an Lipidextrakt so gewählt, dass nach dem Abblasen des Lösungsmittels 5 mg Lipid übrigblieb. Nach Hinzufügen von 2 mL Umsetzungspuffer (Tabelle 8) wurden die Lipide für 5 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Berlin, Deutschland) dispergiert. Die in Lösung gebrachte *Cr*Lipase wurde hinzugefügt (1,1 mg/mL Umsatzvolumen) und bis zu einem Gesamtvolumen von 4 mL aufgefüllt und für 4 h in einem Rotationsschüttler (40 rpm, Stuart Rotator SB3, Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 24 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme *Cs* $\alpha$ -DOX und *Vh*FALDH mit der gewünschten Aktivität (angegeben als U/mL) und der Kofaktor NAD<sup>+</sup> (5 mM im Umsatzvolumen) hinzugegeben und das Volumen mit Umsetzungspuffer auf 4 mL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 4 h wie oben beschrieben inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die Reaktion mit 200  $\mu$ L einer 4 M HCl-Lösung gestoppt. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Umsetzung von freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren Palmitoleinsäure [C16:1(9Z)], Margaroleinsäure [C17:1(9Z)], Ölsäure [C18:1(9Z)] und Linolsäure [C18:2(9Z,12Z)] wurden wie in 2.3.1 beschrieben umgesetzt. Abweichend von 2.3.1 wurde keine *Cr*Lipase zugesetzt.

### 2.3.3 Zusatz von Antioxidantien

Die Umsetzungen unter Zusatz von Antioxidantien wurden in Anlehnung an 2.3.1 durchgeführt. Dabei dienten Ölsäure und Palmitinsäure als Substrat und nur *Cs* $\alpha$ -DOX wurde in einer Konzentration von 0,1 U/mL verwendet. Als Antioxidantien wurden EDTA, BHT, Ascorbinsäure und Peroxyblue668 eingesetzt. Die Proben mit Peroxyblue668 wurden alle 30 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 668 nm mittels eines Implen NanoPhotometer<sup>®</sup> analysiert. Zur grafischen Vergleichbarkeit wurden bei den photometrischen Messungen alle Werte bei t = 0 min auf 0 gesetzt. Die Analyse mittels GC-MS erfolgte wie in 2.1.6.2 beschrieben.

## 2.4 Sensorik

Für die Evaluation des Gesamteindrucks einer umgesetzten Mischung wurde die Umsetzung 1:50 verdünnt und den Probanden in nummerierten Schnappdeckelgläsern zur Verfügung gestellt. Als Attribute wurden gewählt: fleischig, metallisch, fruchtig, zitrus, wachsig, fettig, seifig, laubig, Gurke, Koriander, harzig, blumig, modrig. Es wurde eine Skala von 0 (kein Geruch) bis 5 (starker Geruch) verwendet. Auch die generelle Präferenz der einzelnen Mischungen wurde abgefragt auf einer Skala von 0 (unangenehm) bis 5 (angenehm). Es wurde eine Skala von 0 (kein Geruch) bis 5 (starker Geruch) verwendet. Insgesamt haben 16 Teilnehmer (10 weiblich, 6 männlich im Alter von 19 - 38 Jahren) an der Sensorik partizipiert.

### 3. Resultate

#### 3.1 Pilzkultivierung

In dieser Arbeit wurden 23 Pilze kultiviert und deren Lipide extrahiert. Für das anfängliche Screening der Pilze wurden die Kultivierung und die Bestimmung der Trockenmassen und Lipidausbeuten in Einzelbestimmungen durchgeführt. Die meisten Pilze verhielten sich bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit in Emerskultur mit einer Wachstumsdauer von ca. 1-2 Wochen bis zu einem Bewuchs von ca. 80 % ähnlich (Tabelle 1). Der Pilz mit der schnellsten Wachstumsgeschwindigkeit in dieser Arbeit war *Pythium ultimum* (PUL) mit nur 2 Tagen auf Platte und 3 Tagen in Flüssigkultur. PUL war in dieser Auswahl an Pilzen der einzige Vertreter, der zur Ordnung der *Oomycota* zählt und somit genetisch den Algen näher als den echten Pilzen steht. Unter den gewählten Kulturbedingungen langsam wachsende Pilze waren *Suillus variegatus* (SVA), *Lycoperdon pyriforme* (LYP) und *Lactarius torminosus* (LTO) mit Wachstumsdauern von 27 (SVA), 20 (LYP) und 44 (LTO) Tagen auf Platte und im Falle von LTO 87 Tagen in Vorkultur und 37 Tagen in Hauptkultur.

Nach der Ernte der Pilze wurde das Myzel gefriergetrocknet und dessen Restfeuchte bestimmt. Nach der Extraktion des Fettes wurde die Menge an extrahiertem Fett auf die Trockenmasse bezogen, um den Fettgehalt der unterschiedlichen Pilze vergleichen zu können. In einem ersten Schritt wurde der Fettgehalt bezogen auf die Trockenmasse der 23 verschiedenen Pilzarten berechnet (Abbildung 11).

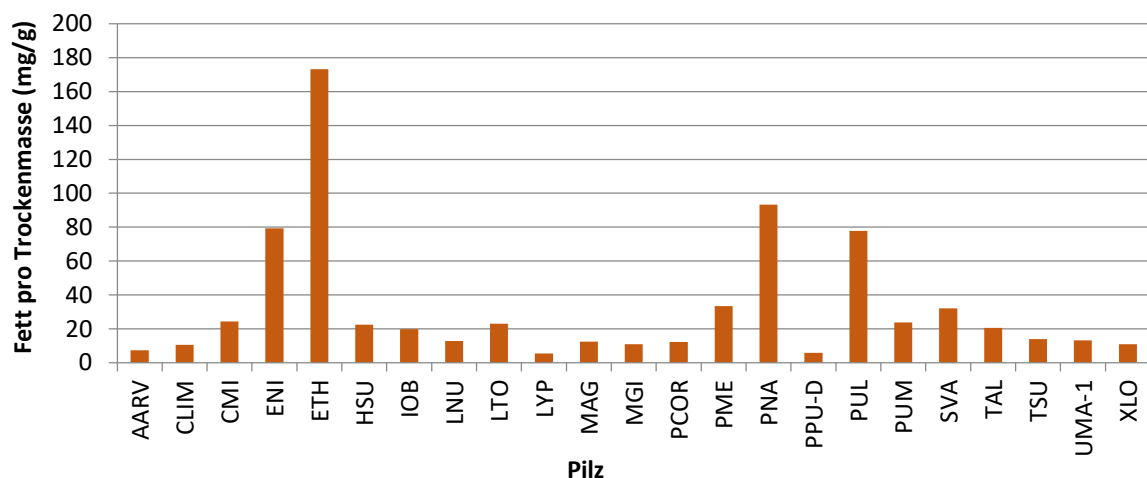


Abbildung 11: Lipidgehalte der verschiedenen Pilze in mg Fett pro g Trockenmasse.

Die Trockenmasse pro L Kulturmedium (Abbildung 12) betrug im Durchschnitt ca. 1-3 g/L mit Ausnahme der Pilze *Epicoccum nigrum* (ENI) und *Ustilago maydis* (UMA-1) die mit über 6 g/L deutlich mehr Biomasse entwickelten. Im Falle von ENI war auch der Wert von 79,34 mg Fett pro g Trockenmasse überdurchschnittlich hoch. Der Fettgehalt betrug bei den meisten Pilzen 5 bis 35 mg/g. Die Pilze *Pholiota nameko* (PNA) mit 93,22 mg/g und *Pythium ultimum* (PUL) mit 77,83 mg/g bildeten höhere Fettanteile. Der Pilz mit der am Abstand höchsten Menge an Fett war *Entomophthora thaxteriana* (ETH) mit 173,24 mg/g, der als einziger Pilz in dieser Versuchsreihe der Ordnung der *Zygomycota* zugeordnet werden kann.

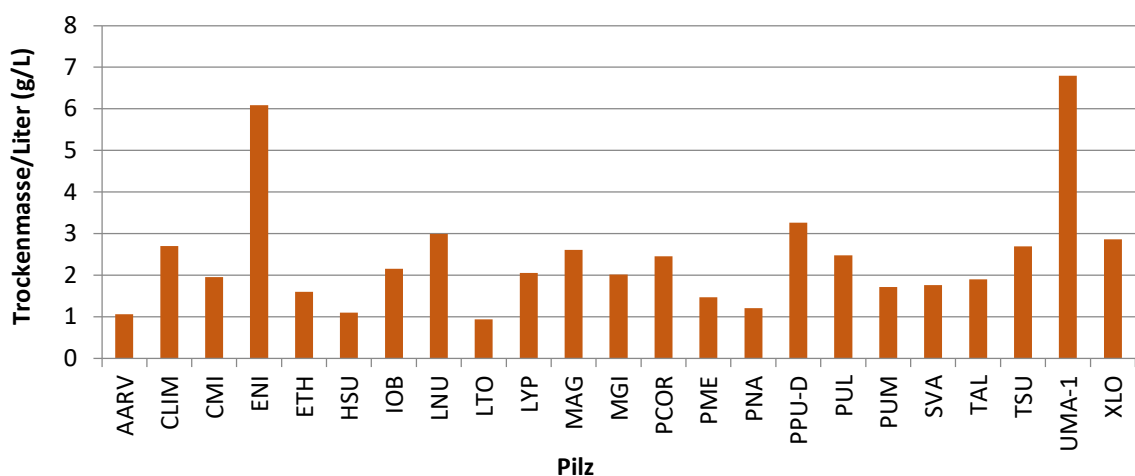


Abbildung 12: Ausbeute an Pilztrockenmasse pro Liter Kulturmedium

### 3.2 Fettsäureprofile

Alle Lipidextrakte wurden mittels GC-MS auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität analysiert (siehe Kapitel 2.1.6.1). Die VF-WAXms-Säule wurde verwendet, um die Fettsäuren zu analysieren und den relativen Anteil der Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren zu berechnen. Diese Bestimmung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei nur eine für die Berechnung der Ausbeute verwendet wurde. Die Select FAME-Säule wurde zur Validierung der Zuordnung verwendet und wurde in Einfachbestimmung durchgeführt. Die Fettsäureprofile der Pilzextrakte sind in Kapitel 3.2.1 in den Tabelle 15 bis Tabelle 38 zu finden, die Fettsäureprofile der Nussöle in Kapitel 3.2.2 in den Tabelle 39 bis Tabelle 42. Für die Kultivierung der Pilze in Flüssigmedium wurde die relative Fettsäureausbeute (mg/L Medium) zusätzlich berechnet.

### 3.2.1 Pilze

Tabelle 15: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Agaricus arvensis* (AARV).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0 <sup>‡</sup>	0,14	0,01
2	15:0	0,67	0,05
3	16:0	14,55	1,15
4	16:1(9Z)	0,93	0,07
5	17:0	2,63	0,21
6	17:1(9Z) <sup>+</sup>	0,09	0,01
7	17:2(9Z,12Z)	0,77	0,06
8	18:0	4,27	0,34
9	18:1 <sup>‡</sup>	1,24	0,10
10	18:2(9Z,12Z)	68,93	5,43
11	20:0 <sup>‡</sup>	2,49	0,20
12	21:0 <sup>‡</sup>	0,97	0,08
13	22:0	2,20	0,17
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 16: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Cyathus limbatus* (CLIM).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	16:0	21,19	5,99
2	16:1(9Z) <sup>‡</sup>	1,28	0,36
3	18:0 <sup>+</sup>	2,01	0,57
4	18:1(9Z) <sup>+</sup>	2,46	0,70
5	18:2(9Z,12Z)	73,06	20,66
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 17: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Coprinellus micaceus* (CMI).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,24	0,11
2	15:0	0,69	0,33
3	16:0	15,66	7,45
4	16:1(6Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,03
5	16:1(7Z)	0,57	0,27
6	16:1(9Z)	0,14	0,17
7	16:2(7Z,9Z) <sup>‡</sup>	0,03	0,01
8	16:2(9Z,12Z)	0,25	0,12
9	17:0	0,25	0,12
10	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,04	0,02
11	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	0,17	0,08
12	18:0	1,68	0,80
13	18:1(9Z)	2,58	1,23
14	18:2(9Z,12Z)	76,46	36,38
15	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	0,76	0,36
16	20:0 <sup>‡</sup>	0,02	0,01
17	20:1(9/13Z) <sup>‡</sup>	0,02	0,01
18	20:2(11Z,14Z)	0,12	0,06
19	21:0 <sup>‡</sup>	0,02	0,01
20	22:0 <sup>‡</sup>	0,09	0,04
Summe Unbekannte		0,15	0,07

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 18: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Epicoccum nigrum* (ENI).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,2	1,1
2	15:0 <sup>+</sup>	< 0,1	0,2
3	16:0	21,0	101,1
5	16:1(9Z)	8,0	38,5
6	17:0 <sup>+</sup>	< 0,1	0,3
8	17:1(9Z) <sup>+</sup>	0,1	0,5
10	18:0	5,6	26,8
11	18:1(9Z) <sup>†</sup>	57,1	275,0
12	18:1(11Z) <sup>†</sup>	1,8	8,6
13	18:2(9Z,12Z)	6,0	28,7
16	20:0 <sup>+</sup>	0,2	1,0
Summe Unbekannte		0,0	0,0

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>†</sup> die quantitativen Angaben zu dieser Substanz sind fehlerbehaftet, da es sich bei dem entsprechenden Peak um einen Doppelpeak handelte, der sich nicht basisliniengetrennt auflösen ließ

Tabelle 19: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Entomophthora thaxteriana* (ETH).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	10:0	0,08	0,22
2	12:0	9,28	25,71
3	12:1 <sup>+</sup>	0,02	0,05
4	13:0	0,26	0,73
5	14:0	16,60	44,51
6	14:1(9Z)	0,54	1,50
7	15:0	0,24	0,67
8	16:0	16,67	46,22
9	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,01	0,04
10	16:1(9Z) <sup>‡</sup>	5,62	15,59
11	16:1(11Z)	1,12	3,09
12	16:2(7Z,10Z) <sup>+</sup>	0,17	0,47
13	16:2(9Z,12Z)	0,01	0,04
14	17:0	0,06	0,17
15	17:1(9Z)	0,16	0,45
16	17:1(10Z) <sup>‡</sup>	0,02	0,05
17	17:2(10Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,03	0,07
18	18:0	1,24	3,44
19	18:1(9Z)	19,58	54,27
20	18:1(11Z)	17,61	48,83
21	18:1(13Z) <sup>+</sup>	0,13	0,37
22	18:2(6Z,9Z/7Z,10Z) <sup>+</sup>	0,93	2,57
23	18:2(9Z,12Z)	0,28	0,78
24	18:2(8Z,11Z/11Z,14Z) <sup>+</sup>	0,53	1,46
25	18:2(12Z;15Z) <sup>‡</sup>	0,11	0,31

26	18:3(6Z,9Z,12Z)	0,34	0,94
27	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	0,21	0,05
28	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) <sup>‡</sup>	0,06	0,17
29	19:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,04	0,12
30	18:2 <sup>‡</sup>	0,08	0,23
31	20:0	0,12	0,32
32	20:1(9/13Z) <sup>+</sup>	0,62	1,72
33	20:2(11Z,14Z)	0,53	1,48
34	20:3(5Z,8Z,11Z)	0,21	0,59
35	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,32	0,88
36	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	5,98	16,59
37	22:0	0,30	0,83
38	22:1(13Z)	0,39	1,07
39	24:0 <sup>‡</sup>	0,22	0,62
Summe Unbekannte		0,00	0,00

# die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

+ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

‡ Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 20: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Hypholoma sublateritium* (HSU).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	15:0 <sup>‡</sup>	0,45	0,11
2	16:0	20,93	5,15
3	18:0 <sup>+</sup>	0,96	0,24
4	18:1(9Z) <sup>+</sup>	1,68	0,41
5	18:2(9Z,12Z)	75,97	18,71
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 21: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Inonotus obliquus* (IOB).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,15	0,06
2	15:0	0,44	0,16
3	16:0	17,12	7,31
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,05	0,02
5	16:1(9Z)	0,44	0,19
6	17:0	0,36	0,15
7	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,04	0,02
8	17:2(5Z,9Z) <sup>‡</sup>	0,03	0,01
9	18:0	6,31	2,69
10	18:1(9Z)	8,45	3,61
11	18:1(11Z)	2,35	1,00
12	18:2(9Z,12Z)	63,55	27,12
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 22: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Lepista nuda* (LNU).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,32	0,12
2	15:0	0,22	0,09
3	16:0	15,77	6,01
4	16:1(7Z) <sup>+</sup>	0,15	0,06
5	16:1(9Z)	1,48	0,56
6	17:0	0,20	0,08
7	17:1(8Z) <sup>+</sup>	0,32	0,12
8	17:1(9Z)	0,26	0,10
9	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	0,08	0,03
10	18:0	2,54	0,97
11	18:1(9Z)	35,72	13,62
12	18:1(11Z)	2,06	0,79
13	18:2(9Z,12Z)	33,67	12,84
14	18:2 <sup>‡</sup>	0,84	0,32
15	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	4,45	1,70
16	20:0 <sup>‡</sup>	0,12	0,04
17	20:1(11Z)	0,46	0,17
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 23: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Lactarius torminosus* (LTO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	10:0	10,0	2,2
2	12:0	3,0	0,7
3	14:0	2,1	0,5
4	15:0 <sup>+</sup>	1,4	0,3
5	16:0	16,8	3,6
6	17:0 <sup>+</sup>	0,2	< 0,1
7	18:0	2,2	0,5
8	18:1(9Z)	17,4	3,8
9	18:2(9Z,12Z)	46,14	10,0
Summe Unbekannte		0,8	0,2

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

Tabelle 24: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Lycoperdon pyriforme* (LYP).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0 <sup>‡</sup>	0,28	0,03
2	15:0	1,21	0,14
3	16:0	12,24	1,39
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,06	0,01
5	16:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,01
6	17:0	0,72	0,08
7	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	0,88	0,10
8	18:0	2,36	0,27
9	18:1(9Z)	1,46	0,17
10	18:2(9Z,12Z)	80,58	9,18
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 25: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Mycena galericulata* (MAG).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,57	0,18
2	15:0	1,28	0,42
3	16:0	17,44	5,68
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,32	0,10
5	16:1(9Z)	0,24	0,08
6	16:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,11	0,03
7	17:0	0,80	0,26
8	17:1(9Z)	0,13	0,04
9	17:1(10Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,02
10	17:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,11	0,04
11	18:0	5,15	1,68
12	18:1(9Z)	7,91	2,58
13	18:1(11Z)	3,06	1,00
14	18:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	54,83	17,86
15	18:2 <sup>‡</sup>	0,47	0,15
16	20:1(9/13Z) <sup>‡</sup>	0,17	0,06
17	20:2(11Z,14Z) <sup>‡</sup>	0,15	0,05
18	22:0	0,49	0,16
19	23:0 <sup>‡</sup>	0,18	0,06
20	24:0	2,30	0,75
Summe Unbekannte		0,11	0,04

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 26: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Meripilus giganteus* (MGI).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,70	0,15
2	15:0	0,12	0,03
3	16:0	18,77	4,10
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,32	0,07
5	16:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,05	0,01
6	17:0 <sup>‡</sup>	0,12	0,03
7	18:0	2,21	0,48
8	18:1(9Z)	10,14	2,22
9	18:1(11Z)	2,07	0,45
10	18:2(6Z,9Z/7Z,10Z) <sup>‡</sup>	0,09	0,02
11	18:2(9Z,12Z)	63,93	13,98
12	20:1(9/13Z) <sup>‡</sup>	0,15	0,03
13	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	0,58	0,13
14	24:0 <sup>‡</sup>	0,48	0,10
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 27: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Mortierella hyalina* (MHY). Daten bereitgestellt durch Andreas Hammer.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	12:0	< 0,1	< 1,0
2	13:0	< 0,1	< 1,0
3	14:0	2,0	20,6
4	15:0	2,3	23,3
5	16:0 <sup>†</sup>	27,2	277,9
6	16:1(7Z) <sup>†</sup>	< 0,1	< 1,0
7	16:1(9Z)	0,6	5,7
8	17:0	4,3	43,6
9	17:1(9Z)	2,1	21,7
10	17:2 <sup>‡</sup>	< 0,1	< 1,0
11	17:2 <sup>‡</sup>	< 0,1	< 1,0
12	18:0	4,6	46,9
13	18:1(9Z) <sup>†</sup>	42,2	430,9
14	18:1(11Z) <sup>†</sup>	0,7	7,0
15	18:2(9Z,12Z)	4,4	45,2
16	18:3(6Z,9Z,12Z)	1,4	14,5
17	19:0	< 0,1	< 1,0
18	19:1 <sup>‡</sup>	< 0,1	< 1,0
19	19:1 <sup>‡</sup>	1,2	12,7
20	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 1,0
21	20:0	< 0,1	< 1,0
22	20:1(11Z)	0,5	5,6
23	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 1,0
24	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,8	7,8

25	21:0	< 0,1	< 1,0
26	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	3,9	39,9
27	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 1,0
28	22:0	0,1	1,0
29	22:1(13Z)	< 0,1	< 1,0
30	22:2(13Z,16Z)	0,1	1,4
31	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)	< 0,1	< 1,0
32	24:0	0,5	4,9
33	24:1(15Z)	0,4	4,3
34	25:0	< 0,1	< 1,0
35	26:0	< 0,1	< 1,0
Summe Unbekannte		0,00	0,00

# die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

‡ Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

† die quantitativen Angaben zu dieser Substanz sind fehlerbehaftet, da es sich bei dem entsprechenden Peak um einen Doppelpeak handelte, der sich nicht basisliniengetreunt auflösen ließ

Tabelle 28: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Pleurotus cornucopiae* (PCOR).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,32	0,09
2	15:0	1,95	0,59
3	16:0	19,60	5,89
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,02
5	16:1(9Z)	0,13	0,04
6	16:2(7Z,10Z) <sup>‡</sup>	0,08	0,03
7	17:0	0,36	0,11
8	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,02	0,01
9	18:0	0,88	0,26
10	18:1(9Z)	4,06	1,22
11	18:2(9Z,12Z)	71,90	21,61
12	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	0,17	0,05
13	18:2 <sup>‡</sup>	0,26	0,08
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 29: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Polyporus melanopus* (PME).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	12:0 <sup>‡</sup>	0,13	0,06
2	14:0	0,50	0,25
3	15:0	0,29	0,14
4	16:0	18,93	9,29
5	16:1(7Z)	0,12	0,06
6	16:1(9Z)	0,20	0,10
7	17:0	0,27	0,13
8	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,06	0,03
9	17:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,08	0,04
10	18:0	2,93	1,44
11	18:1(9Z)	16,46	8,07
12	18:2(9Z,12Z)	58,67	28,78
13	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	0,34	0,17
14	20:1(9/13Z) <sup>‡</sup>	0,12	0,06
15	20:2(11Z,14Z) <sup>‡</sup>	0,05	0,02
16	22:0 <sup>‡</sup>	0,19	0,09
17	24:0 <sup>‡</sup>	0,34	0,17
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 30: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Pholiota nameko* (PNA).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0 <sup>‡</sup>	0,29	0,33
2	16:0	15,75	17,77
3	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,16	0,18
4	17:0 <sup>‡</sup>	0,26	0,30
5	18:0	3,75	4,22
6	18:1(9Z)	5,79	6,50
7	18:2(9Z,12Z)	73,84	83,29
Summe Unbekannte		0,16	0,18

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 31: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Pleurotus pulmonarius* (PPU-D).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0 <sup>‡</sup>	0,23	0,04
2	15:0	1,20	0,23
3	16:0	12,89	2,49
4	16:1(9Z)	2,10	0,41
5	16:2(9Z,12Z)	0,07	0,01
6	17:0	0,53	0,10
7	17:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,01
8	18:0	3,50	0,67
9	18:1(9Z)	10,31	1,99
10	18:2(9Z,12Z)	67,59	13,04
11	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	0,92	0,18
12	24:0	0,55	0,11
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 32: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Pythium ultimum* (PUL).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	12:0	0,27	0,53
2	13:0	0,03	0,06
3	14:0	10,11	19,52
4	14:1(9Z)	0,76	1,46
5	14:1(13Z) <sup>‡</sup>	0,01	0,01
6	15:0	0,20	0,38
7	16:0	17,94	34,62
8	16:1(7Z)	0,44	0,85
9	16:1(9Z)	7,39	14,27
10	16:2(7Z,10Z)	0,09	0,17
11	16:1(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,58	1,11
12	16:4(6Z,9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	0,03	0,06
13	17:0	0,12	0,23
14	17:1(9Z)	0,30	0,58
15	17:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,19	0,37
16	18:0	2,42	4,67
17	18:1(9Z)	23,76	45,86
18	18:1(11Z)	1,19	2,30
19	18:1(13Z) <sup>‡</sup>	0,11	0,21
20	18:2(9Z,12Z)	14,17	27,35
21	18:3(6Z,9Z,12Z)	0,70	1,35
22	19:1(7Z) <sup>‡</sup>	0,05	0,11
23	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,14	0,28
24	20:0	1,07	2,06
25	20:1(9/13Z) <sup>‡</sup>	0,58	1,11

26	20:1(11Z)	2,61	5,04
27	20:2(11Z,14Z)	0,61	1,19
28	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,46	0,89
29	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	5,07	9,79
30	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	7,23	13,95
31	22:0	0,91	1,75
32	22:1(13Z) <sup>‡</sup>	0,23	0,45
Summe Unbekannte		0,00	0,00

# die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

‡ Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 33: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Polyporus umbellatus* (PUM).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,43	0,17
2	15:0	1,79	0,73
3	16:0	14,29	5,83
4	16:1(9Z)	0,35	0,14
5	17:0	1,54	0,63
6	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,45	0,18
7	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	0,43	0,18
8	18:0	1,78	0,73
9	18:1(9Z)	13,00	5,31
10	18:2(9Z,12Z)	62,54	25,53
11	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	3,32	1,35
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 34: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Suillus variegatus* (SVA).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0 <sup>‡</sup>	0,25	0,14
2	15:0	0,59	0,33
3	16:0	13,84	7,82
4	16:1(11Z)	0,14	0,08
5	17:1(9Z) <sup>‡</sup>	0,24	0,14
6	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	1,67	0,94
7	18:0 <sup>‡</sup>	0,90	0,51
8	18:1(9Z)	2,15	1,22
9	18:2(9Z,12Z)	78,98	44,65
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 35: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Macrolepiota albuminosa* (TAL).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,24	0,09
2	15:0	2,05	0,80
3	16:0	24,81	9,71
4	16:1(7Z) <sup>‡</sup>	< 0,01	< 0,01
5	16:1(9Z)	0,69	0,27
6	16:2(7Z,10Z) <sup>‡</sup>	0,08	0,03
7	17:0	0,06	0,24
8	17:1(9Z)	0,28	0,11
9	17:2(9Z,12Z)	0,97	0,38
10	18:0	0,60	0,23
11	18:1(9Z)	3,15	1,23
12	18:2(9Z,12Z)	65,06	25,45
13	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	1,35	0,53
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 36: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Trametes suaveolens* (TSU).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	12:0 <sup>‡</sup>	0,04	0,01
2	14:0	0,28	0,11
3	15:0	0,88	0,33
4	16:0	15,74	5,91
5	16:1(7Z)	0,14	0,05
6	16:1(9Z)	0,59	0,22
7	16:2(7Z,10Z) <sup>‡</sup>	0,10	0,04
8	16:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,02	0,01
9	17:0	0,34	0,13
10	17:1(9Z)	0,12	0,04
11	17:1(10Z) <sup>‡</sup>	0,09	0,03
12	18:0	1,91	0,72
13	18:1(9Z)	16,85	6,33
14	18:2(9Z,12Z)	58,42	21,94
15	18:3(9Z,12Z,15Z) <sup>+</sup>	3,47	1,30
16	20:1(9/13Z) <sup>+</sup>	0,33	0,12
17	20:2(11Z,14Z)	0,24	0,09
18	24:0 <sup>‡</sup>	0,25	0,09
Summe Unbekannte		0,08	0,03

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 37: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Ustilago maydis* (UMA-1).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,36	0,33
2	15:0	0,52	0,47
3	16:0	13,77	12,44
4	16:1(9Z)	3,26	2,95
5	16:2(9Z,12Z)	0,09	0,08
6	17:0	0,59	0,53
7	17:1(9Z)	0,53	0,48
8	17:1(10Z) <sup>‡</sup>	< 0,10	< 0,09
9	17:2(5Z,9Z) <sup>‡</sup>	< 0,01	< 0,01
10	17:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,07	0,06
11	18:0	9,06	8,18
12	18:1(9Z)	31,88	28,79
13	18:1(11Z)	0,87	0,79
14	18:2(9E,12E)	29,54	26,67
15	18:3(9Z,12Z,15Z)	5,53	4,99
16	20:0	0,63	0,57
17	20:1(9/13Z) <sup>+</sup>	0,06	0,06
18	20:2(11Z,14Z)	0,08	0,07
19	21:0 <sup>‡</sup>	0,02	0,02
20	23:3(11Z,14Z,17Z) <sup>‡</sup>	0,08	0,07
21	22:0	0,48	0,44
22	23:0	0,37	0,33
23	24:0	1,69	1,52
24	25:0	0,35	0,32
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 38: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Xylaria longipes* (XLO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] <sup>#</sup>
1	14:0	0,24	0,08
2	15:0	0,35	0,11
3	16:0	14,48	4,52
4	16:1(7Z)	0,97	0,30
5	16:2(9Z,12Z) <sup>‡</sup>	0,08	0,03
6	17:0	0,24	0,07
7	17:1(9Z)	0,21	0,06
8	17:1(10Z)	0,38	0,12
9	17:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	0,43	0,13
10	18:0	1,40	0,44
11	18:1(9Z)	22,63	7,07
12	18:2(9Z,12Z)	58,26	18,20
13	22:0 <sup>‡</sup>	0,30	0,09
Summe Unbekannte		0,00	0,00

<sup>#</sup> die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkultur-Nährmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet; Fettbegleitstoffe und das Glycerol der Triacylglyceride bleiben bei dieser Abschätzung unberücksichtigt

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

### 3.2.2 Nussöle

Tabelle 39: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Ahifloweröl (AFO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	14:0	< 0,10
2	16:0	7,16
3	16:1(9Z)	0,13
4	17:0 <sup>+</sup>	< 0,10
5	17:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
6	18:0	2,80
7	18:1(9Z)	11,65
8	18:1(11Z)	0,87
9	18:2(9Z,12Z)	12,08
10	18:3(6Z,9Z,12Z)	6,20
11	18:3(9Z,12Z,15Z)	35,76
12	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	20,16
13	20:0 <sup>+</sup>	< 0,10
14	20:1(11Z)	1,44
15	20:3(11Z,14Z,17Z)	0,10
16	22:1(11Z) <sup>‡</sup>	0,26
Summe Unbekannte		1,19

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 40: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Borretschsamenöl (BSO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	14:0	< 0,10
2	16:0	11,70
3	16:1(7Z)	0,16
4	16:1(9Z)	0,25
5	17:0	< 0,10
6	17:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
7	18:0	7,33
8	18:1(9Z)	19,46
9	18:1(11Z)	0,79
10	18:2(6Z,9Z) <sup>+</sup>	0,16
11	18:2(9Z,12Z)	31,42
12	18:3(6Z,9Z,12Z)	19,88
13	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,51
14	20:0	0,36
15	20:1(11Z)	3,73
16	20:2(11Z,14Z)	0,15
17	22:0	0,24
18	22:1(13Z)	2,29
19	24:0 <sup>+</sup>	< 0,10
20	24:1(15Z)	1,33
Summe Unbekannte		0,00

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 41: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Johannisbeerkernöl (JKO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	14:0 <sup>+</sup>	< 0,10
2	15:0 <sup>+</sup>	< 0,10
3	15:1(7Z) <sup>+</sup>	< 0,10
4	16:0	8,23
5	16:1(7Z) <sup>+</sup>	< 0,10
6	16:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
7	17:0 <sup>+</sup>	< 0,10
8	17:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
9	18:0	2,48
10	18:1(9Z)	15,47
11	18:1(11Z)	0,98
12	18:2(9Z,12Z)	38,00
13	18:3(6Z,9Z,12Z)	13,58
14	18:3(9Z,12Z,15Z)	14,88
15	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z) <sup>‡</sup>	3,55
16	20:0 <sup>+</sup>	0,16
17	20:1(9Z)	0,15
18	20:1(11Z)	1,72
19	20:2(11Z,14Z)	0,29
20	20:4(8Z,11Z,14Z,17Z) <sup>+</sup>	< 0,10
21	22:0 <sup>+</sup>	< 0,10
22	22:1(11Z) <sup>+</sup>	0,11
Summe Unbekannte		0,00

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 42: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von *Mortierella alpina peyroni* Öl (MAP).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	14:0	0,59
2	15:0	0,14
3	16:0	10,09
4	16:1(7Z) <sup>+</sup>	< 0,10
5	16:1(9Z)	0,19
6	17:0	0,28
7	17:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
8	18:0	7,50
9	18:1(9Z)	9,14
10	18:2(6Z,9Z) <sup>‡</sup>	< 0,10
11	18:2(9Z,12Z)	10,85
12	18:3(6Z,9Z,12Z)	2,90
13	20:0	0,93
14	20:1(11Z)	0,49
15	20:2(11Z,14Z)	0,51
16	20:3(5Z,11Z,14Z) <sup>+</sup>	0,22
17	20:3(8Z,11Z,14Z)	5,08
18	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	36,15
19	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) <sup>‡</sup>	< 0,10
20	22:0	3,46
21	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) <sup>+</sup>	0,35
22	24:0	8,91
23	24:1(15Z) <sup>+</sup>	0,64
24	26:0 <sup>+</sup>	0,90
Summe Unbekannte		0,47

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 43: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Macadamianussöl (MNO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	12:0	0,15
2	14:0	1,35
3	16:0	10,67
4	16:1(9Z)	22,39
5	16:1(11Z)	0,52
6	16:2(9Z,12Z) <sup>+</sup>	< 0,10
7	17:0 <sup>+</sup>	< 0,10
8	17:1(9Z)	0,11
9	18:0	4,14
10	18:1(9Z)	43,18
11	18:1(11Z)	4,28
12	18:2(9Z,12Z)	2,95
13	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,19
14	20:0	3,66
15	20:1(11Z)	3,56
16	20:1(13Z)	0,28
17	22:0	1,29
18	22:1(11Z) <sup>‡</sup>	0,44
19	22:1(13Z) <sup>+</sup>	< 0,10
20	24:0	0,71
Summe Unbekannte		0,00

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

Tabelle 44: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von Sanddornkernöl (SKO).

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]
1	12:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
2	14:0	0,25
3	14:1(9Z) <sup>+</sup>	< 0,10
4	14:1(11Z) <sup>+</sup>	< 0,10
5	15:0	< 0,10
6	16:0	32,31
7	16:1(9Z)	25,88
8	16:1(11Z)	0,31
9	16:2(9Z,12Z)	< 0,10
10	17:0	< 0,10
11	17:1(9Z)	0,13
12	18:0	1,24
13	18:1(9Z)	25,00
14	18:1(11Z)	9,85
15	18:2(9Z,12Z)	3,15
16	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,02
17	20:0	0,29
18	20:1(11Z)	0,20
19	22:0 <sup>+</sup>	< 0,10
Summe Unbekannte		0,00

<sup>+</sup> Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

<sup>‡</sup> Substanzvorschläge auf Grundlage der NIST-Datenbank ohne Absicherung über authentische Referenzsubstanzen

### 3.3 Enzyme

Für die Biotransformation wurden die Enzyme gereinigt und deren Aktivität bestimmt. Das *Csα*-DOX-Gen wurde mit einem HIS-Tag zur Verfügung gestellt und das Enzym konnte über eine Nickelagarosesäule gereinigt werden. Das *VhFALDH*-Gen wurde ohne HIS-Tag zur Verfügung gestellt, weshalb eine Umklonierung und ein Hinzufügen eines HIS-Tags für eine erfolgreiche Reinigung des Enzyms erforderlich wurde (Kapitel 3.3.1). Die Reinigung der Enzyme wurde optimiert (Kapitel 3.3.2) und die Qualitätsparameter bestimmt (Kapitel 3.3.3).

#### 3.3.1 Umklonierung der *VhFALDH* mit HIS-Tag

Um die Reinigung der *VhFALDH* zu erleichtern, wurde ein HIS-Tag zu der Gensequenz hinzugefügt. Durch Modellierung des Enzyms mit Hilfe des Grafikprogramms PyMOL wurden die Enden der Aminosäurekette lokalisiert um eine möglichst hohe Zugänglichkeit des HIS-Tags zu erreichen (Abbildung 3). Es wurde entschieden, den HIS-Tag N-terminal zu platzieren. Das ursprüngliche Gen wurde in einem pET-Duet-Vektor (Abbildung 8) zur Verfügung gestellt und einen pET28a-Vektor transferiert (Abbildung 9), wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Das Agarosegel mit den verdauten Plasmiden ist in Abbildung 13 gezeigt, wobei bei Probe 9 zwei Banden zu erkennen sind. Das *VhFALDH*-Gen mit einer berechneten Größe von 2285 bp ist knapp oberhalb des 2000 pb Markers zu sehen und das restliche Plasmid mit der berechneten Größe von 4572 bp etwas höher bei ca. 5000 bp.

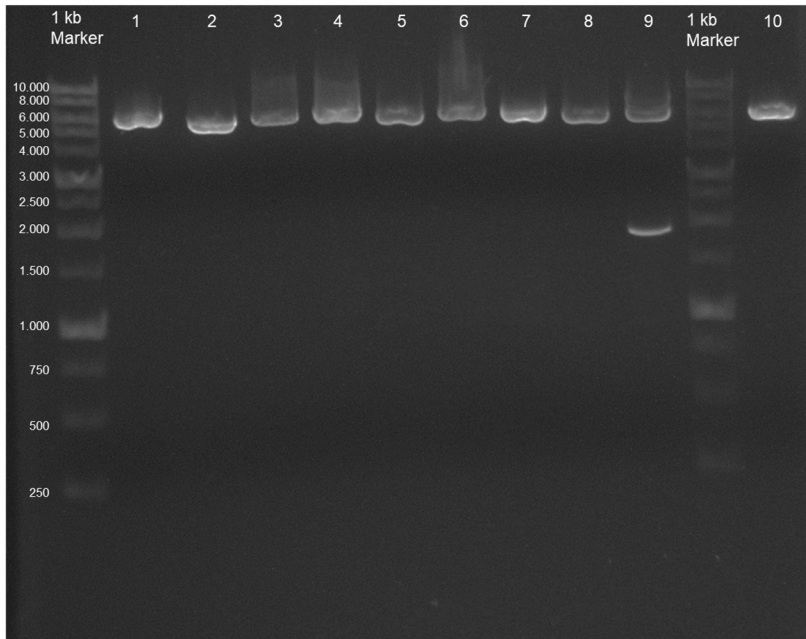


Abbildung 13: Agarosegel nach Restriktion mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NdeI* zur Kontrolle des *VhFALDH-HIS* Konstrukts. Probe 9 zeigt 2 Banden mit dem *VhFALDH*-Gen und dem restlichen Plasmid.

Nach den Ergebnissen der Agarosegelelektrophorese war die Umklonierung in der Probe Nummer 9 erfolgreich. Um dies durch Sequenzierung zu bestätigen, wurden die Plasmide dieser Probe extrahiert und sequenziert. Die Sequenzierungsdaten zeigten deutlich, dass die Transfektion mit den Plasmiden in Probe Nummer 9 erfolgreich war (Abbildung 14).

```

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT
GAATCCGCAGACCGATAATGTTTTTATGCCACCAATGCCTTTACCGGTGAAGCACTGCCGCT
GGCATTTCGGTTCATACCGAAGTTGAAGTTAATCAGGCAGCAACCGCAGCAGCAAAAGTTGC
ACGTGATTTTCGTCTGAATAATAGCAAACGTGCAAGCCTGCTGCGTACCATTGCAAGCGA
ACTGGAAGCACGTAGTGATGATATTATTGCACGTGCACATCTGAAACCGCACTGCCGGAAGT
TCGTCTGACCGGTGAAATTGCACGTACCGCAAATCAGCTGCGTCTGTTTGCAGATGTTGTTAAT
AGCGGTAGCTATCATCAGGCAATTCTGGATACCCCGAATCCGACCCGTGCACCGCTGCCGAAA
CCGGATATTCGTCTCAGCAGATTGCACTGGGTCCGGTTGCAGTTTTTGGTGCAAGCAATTTT
CCGCTGGCCTTTAGCGCAGCCGGTGGTGATACCGCAAGCGCACTGGCTGCAGGTTGTCCGGT
TATTGTTAAAGGTCATCAGGCACATCCGGGTACAAGCCAGATTGTTGCAGAATGTATTGAACAG
GCCCTGAAACAAGAACAGCTGCCGCAGGCAATTTTTACTGCTGCAGGGTAATCAGCGTGCC
CTGGGTCAGGCACTGGTTAGCCATCCGGAAATTAAGCAGTTGGTTTTACCGGTAGCGTTGGT
GGTGGTCGTGCACTGTTTAATCTGGCACATGAACGTCCGGAACCGATTCCGTTTTATGGTGAA
CTGGGTGCAATTAATCCGACCTTTATTTTTCCGAGCGCAATGCGTGCAAAAGCAGACCTGGCA
GATCAGTTTGTGCAAGCATGACAATGGGTTGTGGTCAGTTTTGTACCAAACCGGGTGTGTTT
TTGCACTGAATACACCGGAAACCCAGGCATTTATTGAAACCGCACAGAGCCTGATTCGTCAGC
AGAGCCCGAGCACCTGCTGACTCCGGGTATTTCGTGATTCATATCAGAGCCAGGTTGTTAGCC
GTGGTAGTGATGATGGTATTGATGTTACCTTTAGCCAGGCAGAAAGCCCGTGTGTTGCCAGCG
CACTGTTTGTACCAGCAGCGAAAATTGGCGTAAACATCCGGCATGGGAAGAAGAAATTTTTG
GTCCGCAGAGTCTGATTGTTGTTGTGAAAATGTTGCCGATATGCTGAGCCTGAGCGAAATGC
TGGCAGGTAGCCTGACCGCAACCATTTCATGCAACCGAAGAAGATTATCCGCAGGTTAGCCAGC
TGATTCCGCGTCTGGAAGAATTCAGGTCGTCTGGTTTTAATGGTTGGCCGACCGGTGTTG
AAGTTGGTTATGCAATGGTTCATGGTGGTCCGTATCCGGCAAGCACCCATAGCGCAAGCACCA
GCGTTGGTGCAGAAGCAATTCATCGTTGGCTGCGTCTGTTGCATATCAGGCCCTGCCGAAA
GCCTGCTGCCGGATAGCCTGAAAGCAGAAAATCCGCTGGAAATTGCCCGTGCAGTTGATGGTA
AAGCAGCACATAGCTAA

```

Abbildung 14: Gensequenz nach Umklonierung der VhFALDH mit N-terminalem HIS-Tag

### 3.3.2 Reinigung der Enzyme

Nach der erfolgreichen Transfektion wurden die Enzyme gereinigt. Wie erwartet ist die VhFALDH mit einer molekularen Masse von 113,3 kDa, die in ihrer physiologischen Form als Homodimer vorliegt, durch das denaturierende Verfahren in die einzelnen Monomere zerfallen und somit bei ca. 55 kDa sichtbar (Abbildung 15). Die C $\alpha$ -DOX hingegen ist bei ihrer berechneten Molekülmasse von 69,9 kDa zu erkennen. Diese Resultate zeigen, dass die Reinigung bei beiden Enzymen erfolgreich war und keine nennenswerten Verunreinigungen festgestellt wurden.

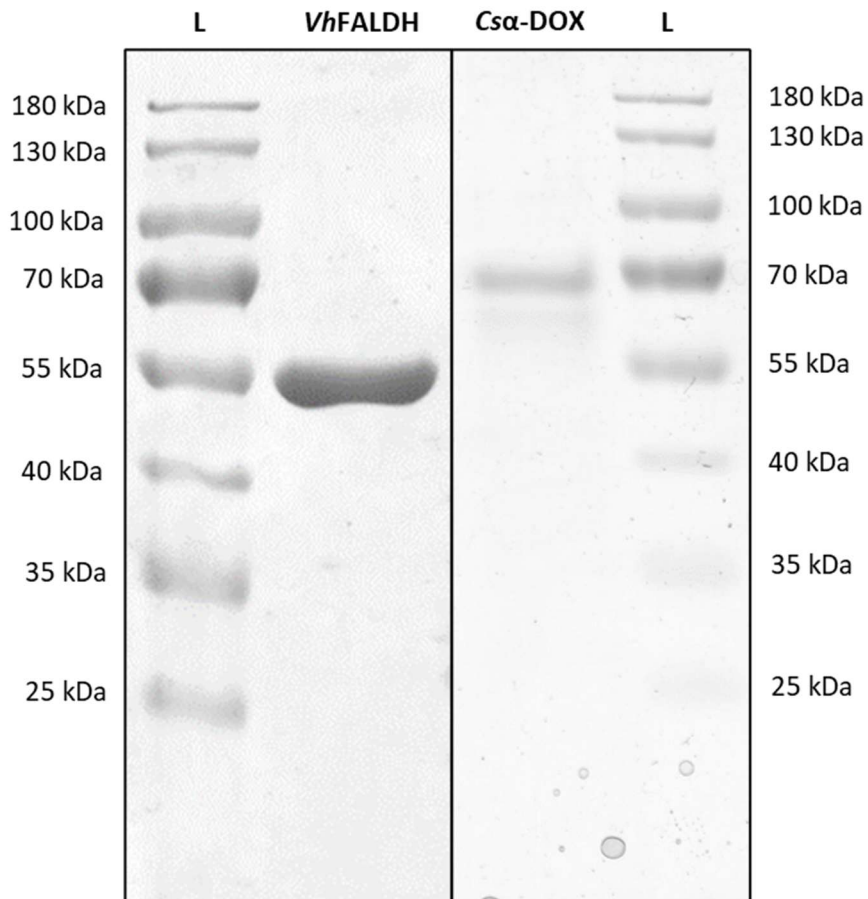


Abbildung 15: SDS-PAGE nach Reinigung und Entsalzen der C $\alpha$ -DOX und VhFALDH

Die Reinigung der Enzyme war, nicht nur für die genauere Bestimmung der Aktivität und um dadurch eine standardisierte experimentelle Durchführung zu garantieren, sondern auch um Störsignale in den späteren gaschromatographischen Analysen zu vermeiden, erforderlich. Der Unterschied zwischen einem gereinigten Extrakt und dem Rohextrakt der C $\alpha$ -DOX ist in der SDS-PAGE in Abbildung 16 zu sehen. Durch die Reinigung wurde der Großteil an ungewünschten Proteinen entfernt.

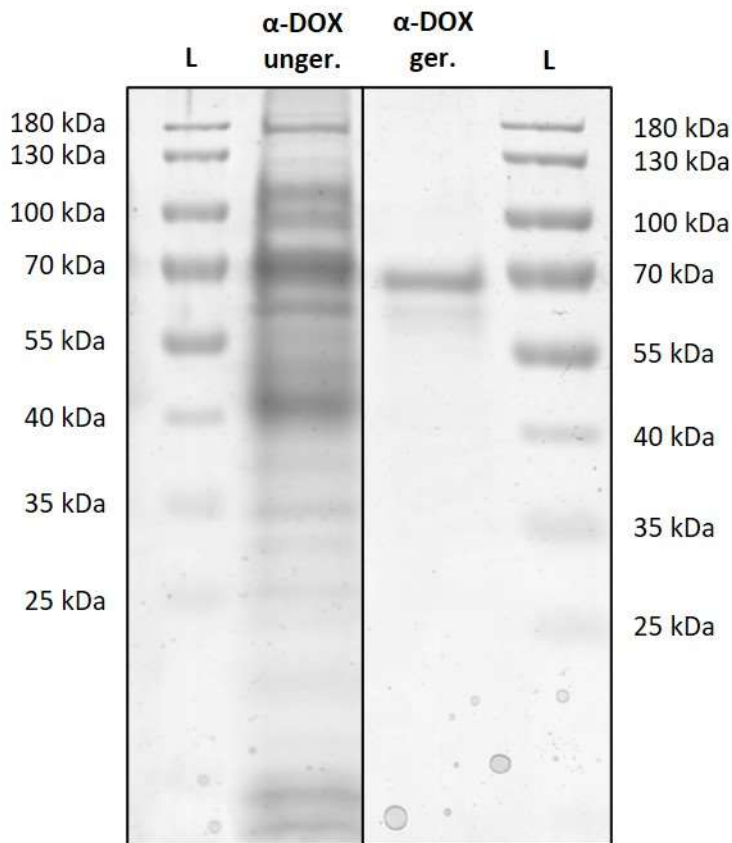


Abbildung 16: SDS-PAGE des Überstands nach Zellaufschluss unger. und der aufgereinigten Csa-DOX.

Durch die Reinigung der Enzyme wurden nicht nur störende Proteine entfernt, sondern auch andere Substanzen, die im Zellaufschluss vorzufinden sind wie zum Beispiel Lipide, freie Fettsäuren und Aldehyde. Diese Substanzen können je nach Flüchtigkeit unerwünschte Hintergrundsignale während der gaschromatographischen Analyse zur Folge haben. Um dies zu verifizieren, wurden der Zellaufschluss und die gereinigte Csa-DOX daher gaschromatographisch analysiert. Dabei wurde eine starke Reduktion des Hintergrundsignals durch die Verwendung der gereinigten Enzyme festgestellt (Abbildung 17).

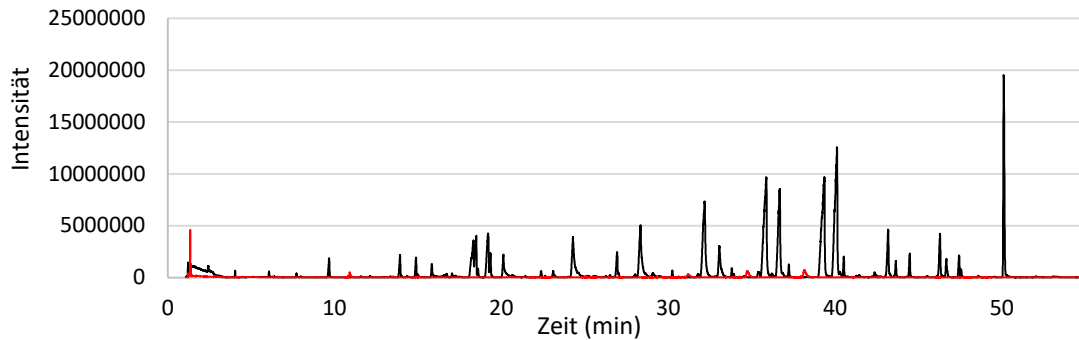


Abbildung 17: Chromatogramm des Hintergrunds der SPME-Analyse der gereinigten Csa-DOX (rot) und der Analyse des Zellaufschlusses mit *E. coli* (schwarz).

### 3.3.3 Aktivität und Kinetik der *VhFALDH*

Da die *VhFALDH* den Kofaktor  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  benötigt, wurde getestet, welcher der beiden Kofaktoren von der *VhFALDH* bevorzugt wird. Die Messungen in Abbildung 18 zeigen deutlich, dass die *VhFALDH*  $\text{NAD}^+$  bevorzugt, da die Zugabe von  $\text{NAD}^+$  zu einer 4-fachen Aktivität gegenüber dem Kofaktor  $\text{NADP}^+$  führt. Daher wurde für alle weiteren Experimente  $\text{NAD}^+$  als Kofaktor verwendet.

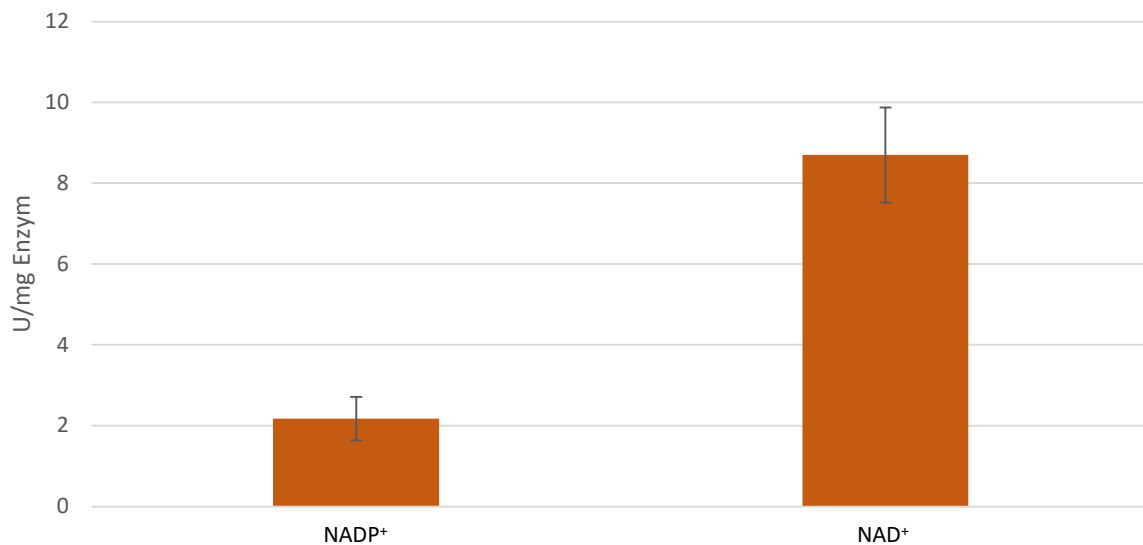


Abbildung 18: Enzymaktivität der *VhFALDH* in U/mg Enzym bei der Verwendung von  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NAD}^+$  als Kofaktor.

Um die Lagerfähigkeit zu überprüfen, wurde die *VhFALDH* nach der Reinigung für 21 Tage bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und die Aktivität regelmäßig gemessen. Die Resultate in Abbildung 19 zeigen eine leicht höhere Aktivität bei längerer Lagerung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Dennoch nimmt die Aktivität unabhängig von der Lagertemperatur schnell ab.

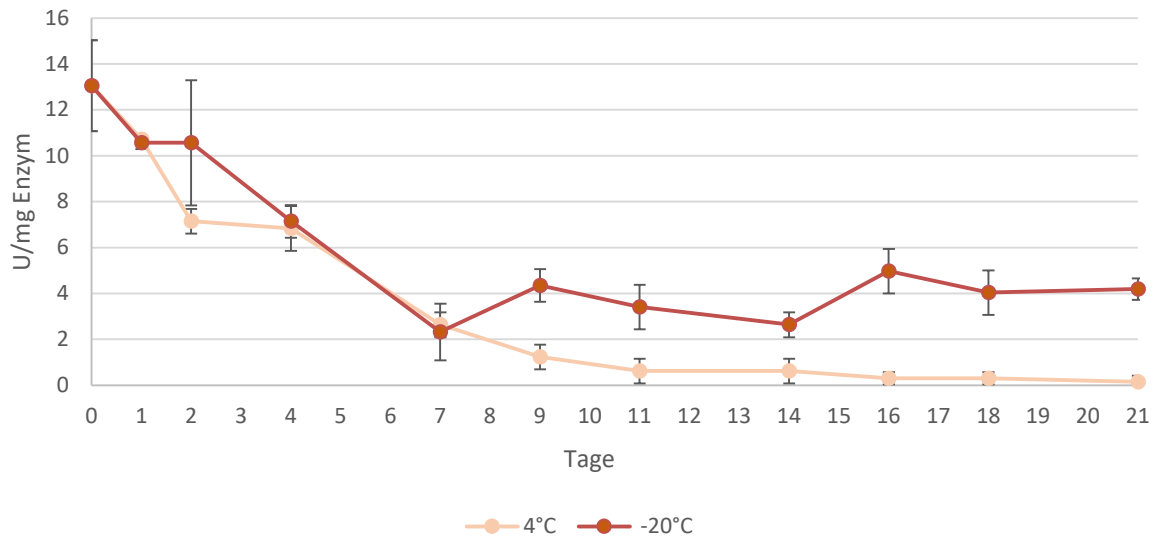


Abbildung 19: Veränderung der Enzymaktivität in U/mg Enzym der VhFALDH während der Lagerung bei 4°C und -20°C über 21 Tage.

Die Aldehyddehydrogenase wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Undec-10-enal mittels des NADH-Assays gemessen und die Werte in einem Michaelis Menten Diagramm aufgetragen (Abbildung 20). Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Mittels der erhaltenen Werte wurden die Enzymparameter  $V_{\max}=0,98 \mu\text{mol}/\text{min}$  und  $K_m=9,11 \mu\text{mol}/\text{L}$  mit OriginPro berechnet.

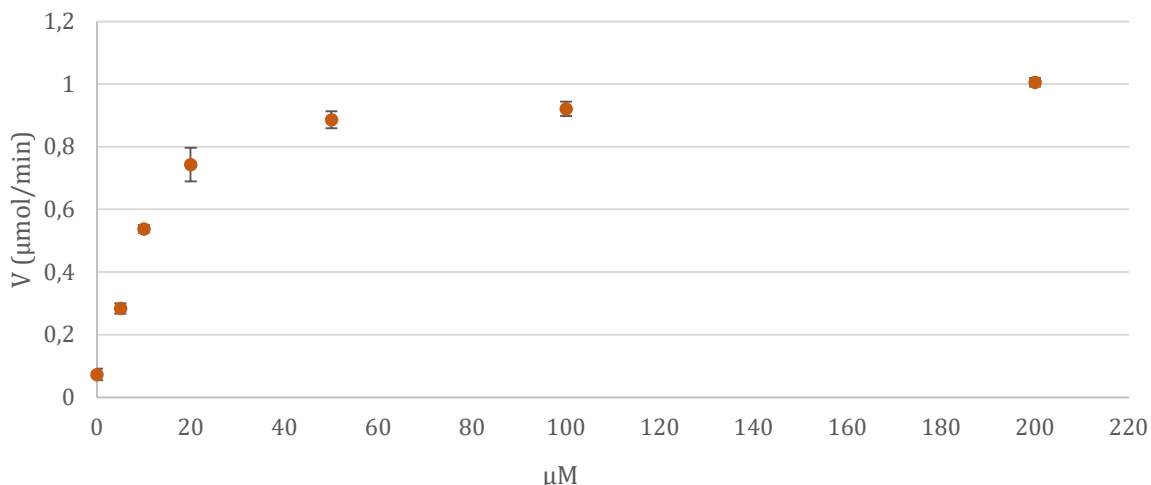


Abbildung 20: MichaelisMenten-Diagramm der Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung von Undec-1-enal bei verschiedenen Konzentrationen.

### 3.4 Optimierung der Umsetzung

Um die Kaskadenreaktion ablaufen zu lassen, wurden die beiden Enzyme C $\alpha$ -Dox und VhFALDH gleichzeitig verwendet und deren Konzentrationsverhältnis zueinander, die Menge an Enzym und die Inkubationszeit optimiert. Darüber hinaus wurden enzymunabhängige Reaktionen und deren Einfluss getestet. Als Modellfettsäure wurde Ölsäure verwendet.

Da der Fokus auf der Produktion von Aldehyden lag, wurde die C $\alpha$ -DOX in höheren Konzentrationen eingesetzt als die VhFALDH. Um verschiedene Verhältnisse der beiden Enzyme zu einander zu testen, wurde in jeder Umsetzung eine VhFALDH Aktivität von 0,5 U/mL Umsetzungsmedium eingesetzt und die C $\alpha$ -DOX Aktivität auf jeweils das 4, 8, 12 und 16-fache der VhFALDH Aktivität eingestellt. Abbildung 21 zeigt die entstandenen Aldehyde unterschiedlicher Kettenlänge der verschiedenen Reaktionszyklen. Während bei den ersten beiden Zyklen der Unterschied der Konzentrationsverhältnisses nicht ersichtlich war, waren ab dem 3. Zyklus höhere Ausbeuten beim 8:1-Verhältnis zu beobachten. Dieses Konzentrationsverhältnis zeigte auch beim 4. und 5. Zyklus höhere Ausbeuten und ließ Spuren von einem 6. und 7. Zyklus erkennen.

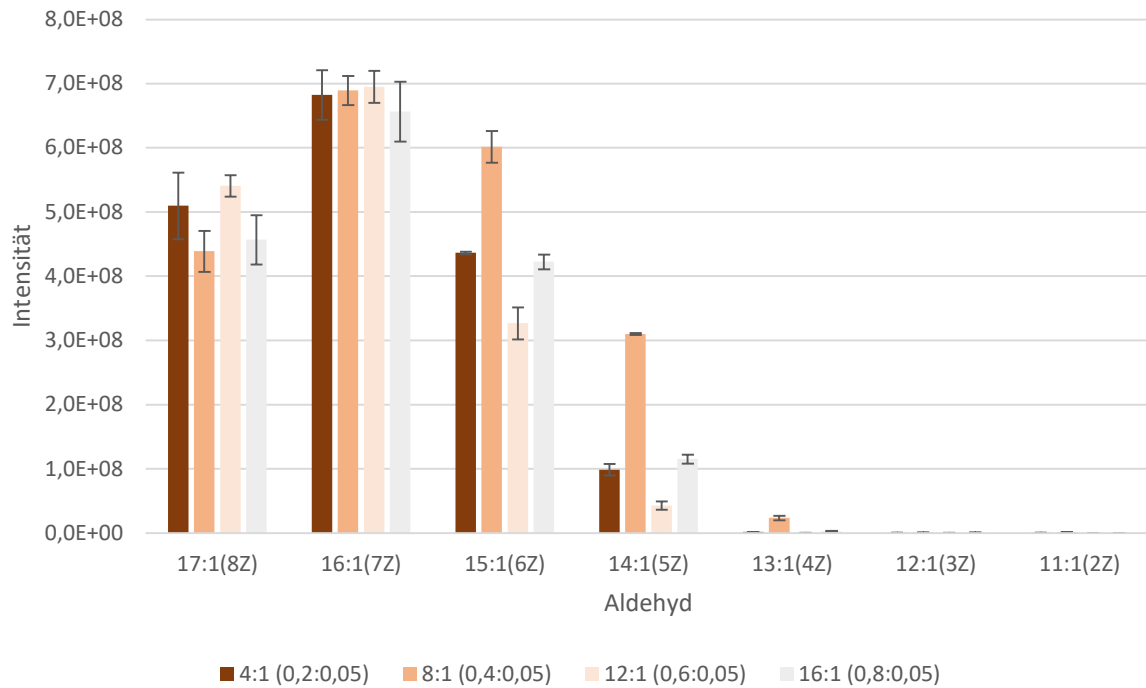


Abbildung 21: Biotransformation von Ölsäure mit unterschiedlichen Aktivitätsverhältnissen von 4:1; 8:1; 12:1 und 16:1 der Csa-DOX und VhFALDH mit einer Inkubationsdauer von 4 h. Angaben in Klammern (U/mL Csa-DOX:U/mL VhFALDH).

Da sich das Csa-DOX zu VhFALDH -Verhältnis von 8:1 als vielversprechend herausgestellt hat, wurde dieses Verhältnis in einem zweiten Schritt beibehalten und dabei die Konzentration beider Enzyme variiert (Abbildung 22). Eine Steigerung der Konzentration beider Enzyme hatte eine Erhöhung der Zyklenzahl zur Folge. Die beiden niedrigsten Konzentrationen von 0,2 U/mL Csa-DOX / 0,025 U/mL VhFALDH und 0,4 U/mL Csa-DOX / 0,05 U/mL VhFALDH ermöglichten lediglich 2 bis 3 Zyklen. Durch Erhöhung der Konzentrationen wurden bei 0,8 U/mL Csa-DOX / 0,1 U/mL VhFALDH 5 Zyklen beobachtet.

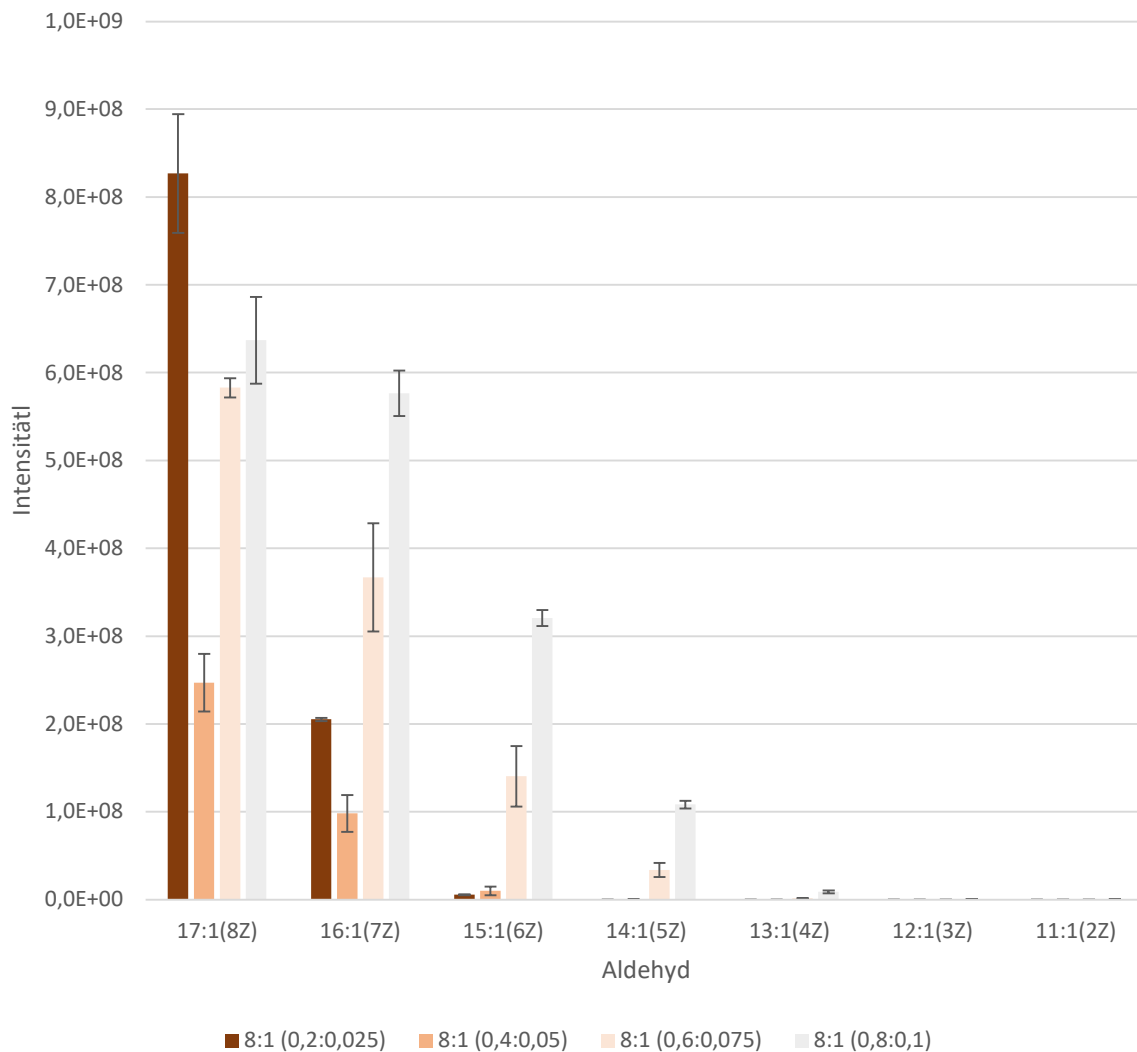


Abbildung 22: Biotransformation von Ölsäure bei gleichbleibendem Verhältnis von Csa-DOX zu VhFALDH von 8:1, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationen. Angaben in Klammern (U/mL Csa-DOX:U/mL VhFALDH)

In einem weiteren Schritt wurde die Inkubationszeit variiert. Die Enzyme wurden mit 0,4 U/mL Csa-DOX und 0,05 U/mL VhFALDH für 4 und 8 Stunden inkubiert. Hierbei zeigte sich eine höhere Ausbeute und Anzahl von Zyklen bei einer Inkubationsdauer von 4 Stunden (Abbildung 23).

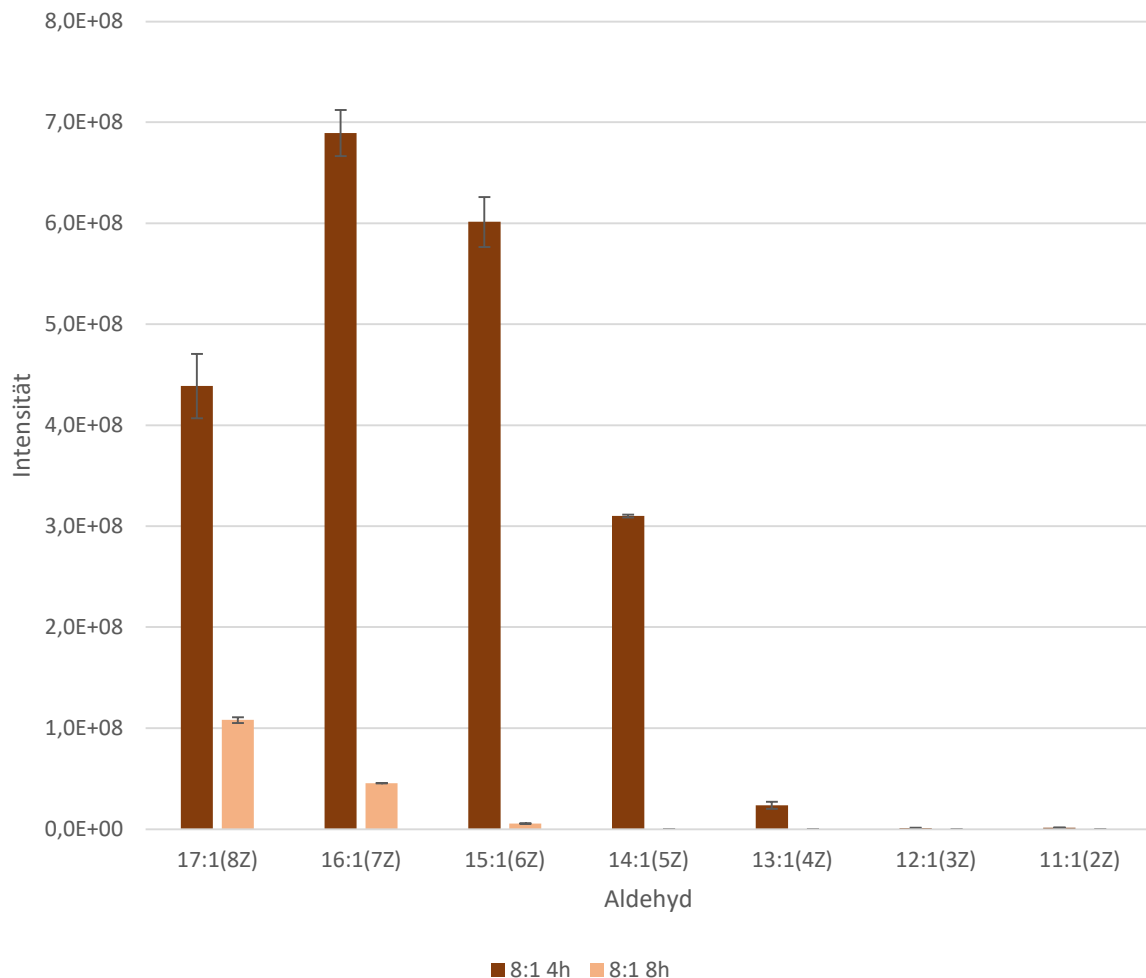


Abbildung 23: Biotransformation von Ölsäure bei gleichbleibendem Verhältnis (0,4 U/mL C $\alpha$ -DOX und 0,05 U/mL VhFALDH) der Enzyme mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von 4 und 8 Stunden.

### 3.5 Zusatz von Antioxidantien

Die Reaktion von Aldehyd zur Säure kann enzymunabhängig durch Oxidation mit Umgebungssauerstoff geschehen. Diese spontane Oxidation kann von Radikalen unterschiedlichster Herkunft gefördert werden. Ungesättigte Fettsäuren und die enzymatischen Reaktionen können Quellen von Radikalen darstellen, die die Kaskadenreaktionen beeinflussen. Um zu evaluieren wie eine nicht-enzymatische, radikalische Oxidation Einfluss auf die Lipidumsetzungen ausübt, wurde die einfach ungesättigte Ölsäure und die gesättigte Palmitinsäure jeweils mit und ohne C $\alpha$ -DOX für 4 Stunden inkubiert und die Radikalbildung mit Hilfe von Peroxyblue668 photometrisch verfolgt. In Abbildung 24 ist ein deutlicher Anstieg des Signals bei der Kombination von Ölsäure und C $\alpha$ -DOX zu sehen, wobei die Ölsäure allein ebenfalls einen deutlichen Anstieg zeigt. Bei Einsatz der gesättigten Palmitinsäure zeigte sich

hingegen keine Veränderung und lediglich in Kombination mit der Cs $\alpha$ -DOX stieg die Radikalbildung leicht an.

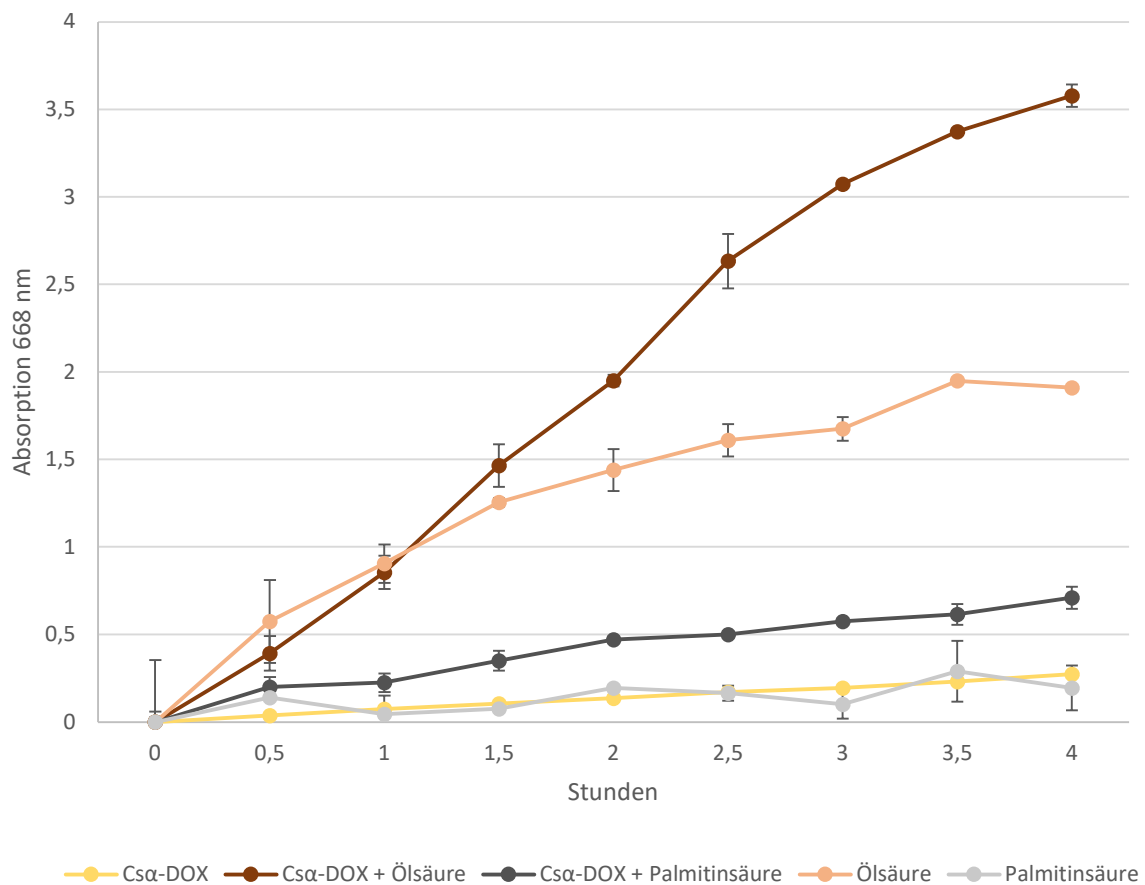


Abbildung 24: Absorption von Peroxyblue668 während der Inkubation von Ölsäure und Palmitinsäure mit und ohne Cs $\alpha$ -DOX.

Da die Kaskadenreaktion durch nicht-enzymatische, radikalische Oxidationen beeinflusst werden kann, wurde in einem weiteren Schritt versucht, die Radikale, die durch die Enzymreaktion und die Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren entstehen, durch unterschiedliche Antioxidantien abzufangen. Hierfür wurden BHT und Peroxyblue668 zum Abfangen der Radikale und der Metallchelator EDTA verwendet, um Metallionen zu binden, die die Oxidation katalysieren können (Abbildung 25). Das eher lipophile Antioxidans BHT zeigte keine nennenswerte Auswirkung, wohingegen der Komplexbildner EDTA und das eher hydrophile Peroxyblue668 eine deutliche Reduktion des 2. Zyklus und eine komplette Inhibierung des 3. Zyklus zeigten.

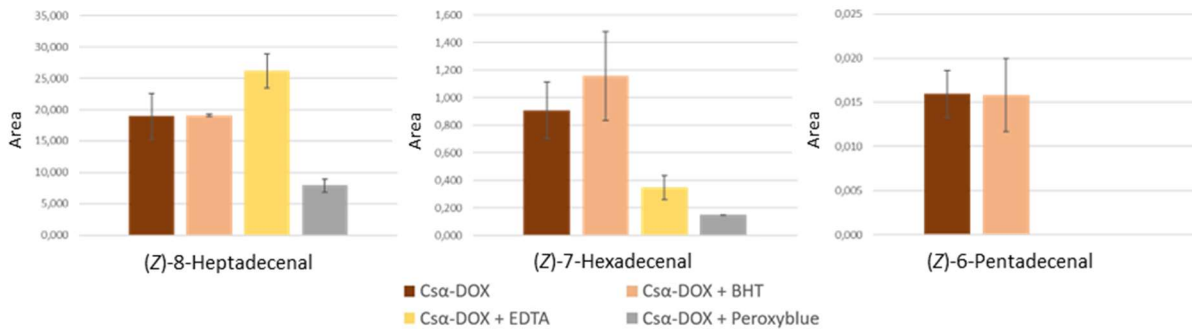


Abbildung 25: GC-MS Analyse der Umsetzung von Ölsäure mit C $\alpha$ -DOX und einer Kombination aus C $\alpha$ -DOX mit BHT, EDTA und Peroxyblue nach Inkubation für 4 h.

### 3.6 Kaskadenreaktion

Ausgewählte Lipidextrakte aus Pilzen und Nüssen wurden verwendet, um diese mit Hilfe der Kaskadenreaktion umzusetzen. Nach der Umsetzung wurden durch mehrere Probanden sowohl der Gesamteindruck ermittelt (Kapitel 3.6.1) als auch die einzelnen Aldehyde olfaktorisch mittels GC-MS-O detektiert (Kapitel 3.6.2). Bei Aldehyden mit interessanten olfaktorischen Eigenschaften wurde die Ausgangsfettsäure ermittelt und diese ebenfalls umgesetzt, um eine eindeutige Identifizierung der entstandenen Aldehyde zu ermöglichen (Kapitel 3.6.3).

#### 3.6.1 Olfaktorischer Gesamteindruck

Zur Beschreibung des olfaktorischen Gesamteindrucks wurden einige interessante Proben ausgewählt und die Reaktionsansätze durch Probanden abgerochen. Insbesondere der Geruch der Reaktionsansätze mit Ahifloweröl (Tabelle 45) wurde durch das Panel überwiegend positiv bewertet.

Tabelle 45: Olfaktorischer Gesamteindruck der Umsetzungsbrühen von Ahifloweröl (AFO), Borretschsamenöl (BSO), *Entomophthora thaxteriana* (ETH), Johannisbeerkernelöl (JKO), *Mortierella albina peyronel* Öl (MAP), *Mortierella hyalina* (MHY), Macadamianussöl (MNO), Sanddornkernelöl (SKO). Skala: 0= unangenehm; 5= angenehm

Probe	Gesamteindruck
AFO	3,5
BSO	2,2
ETH	1,9
JKO	2,1
MAP	1,6
MHY	2,4
MNO	2
SKO	1,9

Die einzelnen Umsetzungsbrühen wurden hinsichtlich bestimmter geruchlicher Attribute evaluiert. Hierbei wurden Geruchseindrücke wie fruchtig, blumig, laubartig, gurkenartig, zitrusartig, modrig, harzig, fleischig, metallisch, wachsig, fettig, seifig und korianderartig bestimmt (Abbildung 26). Die geruchliche Ausprägung der einzelnen Attribute war in allen Proben gering bis mittel. Dennoch zeigten einige Proben eine Tendenz zu einem bestimmten geruchlichen Attribut. So war der gurkenartige Geruch im AFO, der fleischige Geruch im MAP und die seifige Note im MHY und MNO etwas deutlicher ausgeprägt.

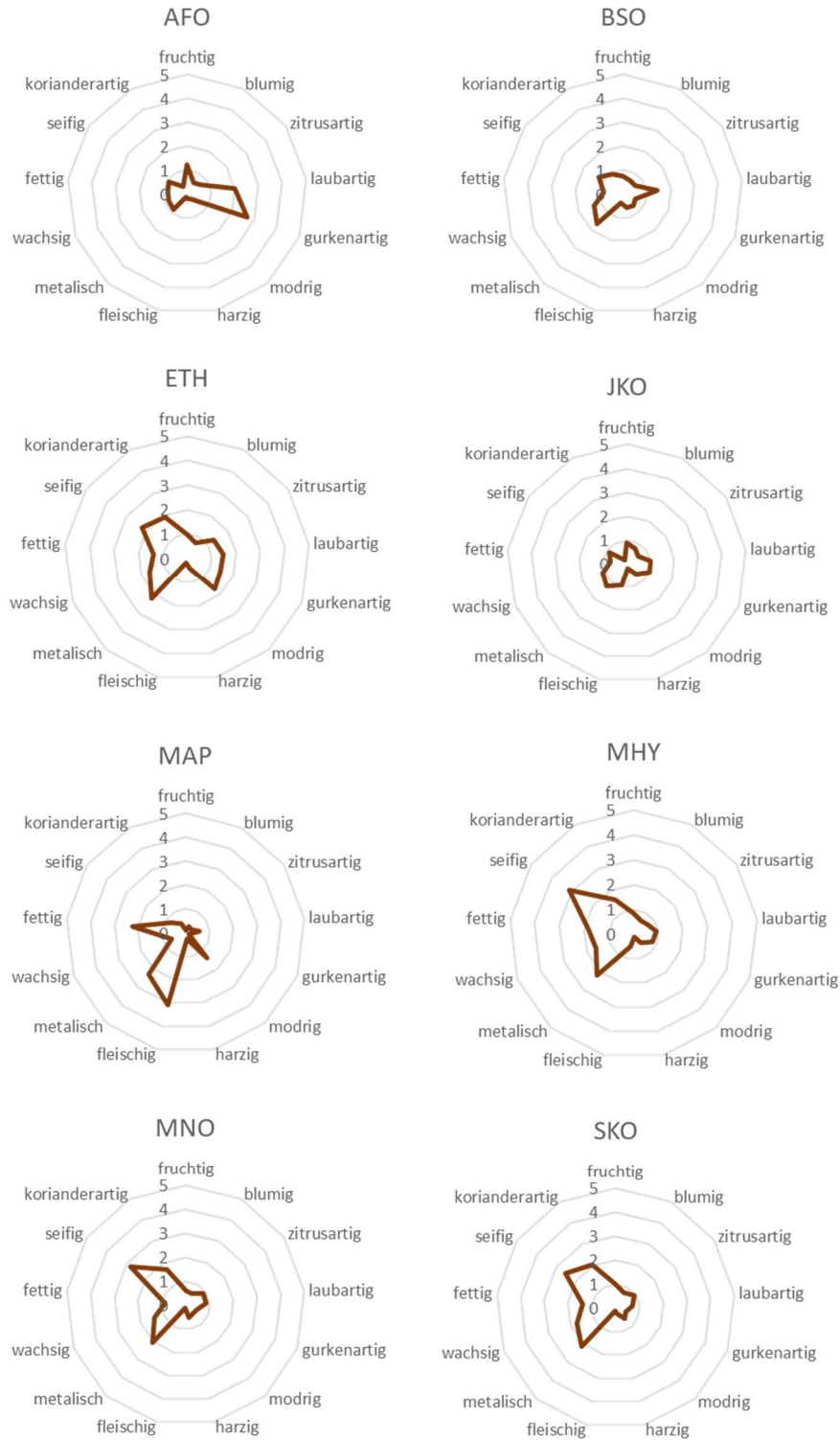


Abbildung 26: Geruchseindrücke der Umsetzungsbrühen von Ahifloweröl (AFO), Borretschsamenöl (BSO), Entomophthora thaxteriana (ETH), Johannisbeerkernöl (JKO), Mortierella alpina peyronel Öl (MAP), Mortierella hyalina (MHY), Macadamianussöl (MNO), Sanddornkernöl (SKO). Skala: 0 = nicht wahrnehmbar; 5 = stark wahrnehmbar.

### 3.6.2 Pilzlipidextrakte und Nussöle

In den Tabelle 46 -Tabelle 55 sind die Aldehydprofile der Umsetzungen der Pilzlipidextrakte und Nussöle AFO, BSO, ETH, IOB, JKO, MAP, MYH, MNO, SKO und SVA zusammengefasst. Zusätzlich sind die Geruchseindrücke der GC-MS-O Analyse zu den einzelnen Aldehyden aufgeführt.

Tabelle 46: Aldehydprofil der Umsetzung von Ahiflower (AFO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1805	Tridecanal	wachsig, krautig, metallisch, grün
1916	Tetradecanal	grün, fruchtig
2023	Pentadecanal	fettig, wachsig
2052	(Z)-8-Pentadecenal	n.d.
2129	Hexadecanal	n.d.
2155	(Z)-7-Hexadecenal	n.d.
2203	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	n.d.
2233	Heptadecanal	seifig, süßlich
2259	(Z)-8-Heptadecenal	n.d.
2309	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	fruchtig, wachsig
2344	(Z,Z,Z)-5,8,11-Heptadecatrienal	seifig, scharf
2379	(Z,Z,Z)-8,11,14-Heptadecatrienal	seifig, wachsig
2414	(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-Heptadecatetraenal	Zitrus, süßlich/Bonbon
2471	(Z)-10-Nonadecenal	fettig, fruchtig, nussig, Kürbis

Tabelle 47: Aldehydprofil der Umsetzung von Borretschsamenöl (BSO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1805	Tridecanal	seifig, wachsig
1916	Tetradecanal	wachsig, grün, seifig
2023	Pentadecanal	metallisch, grün
2129	Hexadecanal	n.d.
2155	(Z)-7-Hexadecenal	n.d.
2203	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	n.d.
2235	Heptadecanal	n.d.
2259	(Z)-8-Heptadecenal	grün, metallisch, seifig
2309	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.
2344	(Z,Z,Z)-5,8,11-Heptadecatrienal	n.d.
2471	(Z)-10-Nonadecenal	n.d.

Tabelle 48: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts aus *Entomophthora thaxteriana* (ETH) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert, \* = nicht hinreichend validiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1395	Nonanal	süßlich, fruchtig, Gurke
1500	Decanal	fruchtig, Gurke
1612	Undecanal	grün, Sternfrucht
1652	(?)-?-Undecenal*	grün, krautig, Nadelholz
1712	Dodecanal	n.d.
1758	(?)-?-Undecenal*	seifig, krautig
1832	Tridecanal	seifig, grün
1939	Tetradecanal	wachsig, Plastik
1974	(Z)-5/7-Tetradecenal*	grün, seifig
2009	(Z,Z)-5,8-Tetradecadienal	seifig, Orange
2046	Pentadecanal	seifig, floral, süßlich
2072	(Z)-8/10-Pentadecenal*	seifig, wachsig
2125	(Z,Z)-5,8-Pentadecadienal	wachsig, Orangenschale
2141	Hexadecanal	n.d.
2179	(Z)-7/9-Hexadecenal*	seifig, krautig
2218	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	seifig, Zitrus
2252	Heptadecanal	n.d.
2297	(Z)-8/10-Heptadecenal*	seifig, Zitruschale, süßlich
2363	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	seifig, krautig, würzig

Tabelle 49: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von *Inonotus obliquus* (IOB) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d. = nicht detektiert, \* = nicht hinreichend validiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1823	Tridecanal	seifig, floral
1856	(Z)-4/6-Tridecenal*	n.d.
1929	Tetradecanal	n.d.
1964	(Z)-5/7-Tetradecenal*	wachsig, seifig
2003	(Z,Z)-5,8-Tetradecadienal	Zitrus, saftig
2035	Pentadecanal	n.d.
2056	(Z)-6/8-Pentadecenal*	wachsig
2125	(Z,Z)-6,9-Pentadecadienal	seifig, floral
2141	Hexadecanal	n.d.
2179	(Z)-7/9-Hexadecenal*	seifig, kräutrig
2212	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	n.d.
2247	Heptadecanal	n.d.
2275	(Z)-8/10-Heptadecenal*	n.d.
2321	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.

Tabelle 50: Aldehydprofil der Umsetzung von Johannisbeerkernöl (JKO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1808	Tridecanal	wachsig, seifig
1916	Tetradecanal	grün, krautig
2023	Pentadecanal	wachsig, fettig
2053	(Z)-8-Pentadecenal	n.d.
2126	Hexadecanal	n.d.
2154	(Z)-7-Hexadecenal	n.d.
2164	(Z)-9-Hexadecenal	n.d.
2203	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	seifig, Hähnchen, fettig
2233	Heptadecanal	n.d.
2259	(Z)-8-Heptadecenal	n.d.
2271	(Z)-10-Heptadecenal	n.d.
2310	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.
2344	(Z,Z,Z)-5,8,11-Heptadecatrienal	metallisch, Blut, fettig
2378	(Z,Z,Z)-8,11,14-Heptadecatrienal	metallisch, fleischig
2414	(Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-Heptadecatetraenal	n.d.
2470	(Z)-10-Nonadecenal	n.d.

Tabelle 51: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von *Mortierella alpina* peyronel Öl (MAP) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1808	Tridecanal	seifig, blumig, Zitrus
1916	Tetradecanal	grün, seifig
2023	Pentadecanal	seifig, wachsig
2052	(Z)-6-Pentadecenal	metallisch, seifig
2128	Hexadecanal	wachsig
2155	(Z)-7-Hexadecenal	Brühe, fleischig
2203	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	fettig, ranzig, süßlich, fleischig
2233	Heptadecanal	seifig, wachsig
2259	(Z)-8-Heptadecenal	fettig, seifig
2310	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	Hähnchen, gekocht, fettig
2344	(Z,Z,Z)-5,8,11-Heptadecatrienal	n.d.
2558	(Z,Z,Z)-7,10,13-Nonadecatetraenal	n.d.
2599	(Z,Z,Z,Z)-4,7,10,13-Nondecateetraenal <sup>†</sup>	n.d.

Tabelle 52: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von *Mortierella hyalina* (MHY) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d. = nicht detektiert, \* = nicht hinreichend validiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1496	Decanal	wachsig, grün
1707	Dodecanal	seifig, grün
1827	Tridecanal	seifig, floral
1856	(Z)-5-Tridecenal	seifig, fettig
1939	Tetradecanal	wachsig, Plastik
1964	(Z)-5/6-Tetradecenal*	krautig, Koriander, seifig
2046	Pentadecanal	n.d.
2067	(Z)-6/7-Pentadecenal*	wachsig, fettig
2152	Hexadecanal	n.d.
2179	(Z)-7/8-Hexadecenal*	n.d.
2258	Heptadecanal	n.d.
2268	(Z)-8-Heptadecenal	n.d.
2327	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.
2380	(Z)-9-Octadecenal	n.d.

Tabelle 53: Aldehydprofil der Umsetzung von Macadamianussöl (MNO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1807	Tridecanal	grün, seifig
1842	(Z)-4-Tridecenal	n.d.
1915	Tetradecanal	seifig, wachsig
1947	(Z)-5-Tetradecenal	wachsig, seifig, harzig, grün, Koriander
2021	Pentadecanal	wachsig
2052	(Z)-6-Pentadecenal	Zitrus, wachsig, grün
2127	Hexadecanal	n.d.
2155	(Z)-7-Hexadecenal	n.d.
2201	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	wachsig, krautig, fettig
2234	Heptadecanal	n.d.
2262	(Z)-8-Heptadecenal	n.d.
2309	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.
2449	Nonadecanal	n.d.
2473	(Z)-10-Nonadecenal	n.d.

Tabelle 54: Aldehydprofil der Umsetzung von Sanddornkernöl (SKO) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1808	Tridecanal	grün, seifig, wachsig
1842	(Z)-6-Tridecenal	seifig, wachsig
1914	Tetradecanal	grün, seifig, blumig, Zitrus
1946	(Z)-7-Tetradecenal	seifig, frisch, grün, Grapefruit
2025	Pentadecanal	seifig, Brühe, wachsig
2053	(Z)-8-Pentadecenal	grün, krautig, metallisch
2154	(Z)-7-Hexadecenal	n.d.
2157	(Z)-9-Hexadecenal	n.d.
2203	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	n.d.
2234	Heptadecanal	n.d.
2261	(Z)-8-Heptadecenal	n.d.
2265	(Z)-10-Heptadecenal	n.d.
2312	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	fettig, Brühe
2381	(Z,Z,Z)-8,11,14-Heptadecatrienal	fettig

Tabelle 55: Aldehydprofil der Umsetzung des Lipidextrakts von *Suillus variegatus* (SVA) mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d. = nicht detektiert, \* = nicht hinreichend validiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1823	Tridecanal	n.d.
1898	(Z,Z)-4,7/5,8-Tridecadienal*	wachsig, seifig
1929	Tetradecanal	wachsig, Plastik
1998	(Z,Z)-6,9-Tetradecadienal	grün
2035	Pentadecanal	n.d.
2061	(Z)-6/8-Pentadecenal*	n.d.
2114	(Z,Z)-7,10-Pentadecadienal	n.d.
2141	Hexadecanal	n.d.
2169	(Z)-7/9-Hexadecenal*	n.d.
2212	(Z,Z)-7,10/8,11-Hexadecadienal*	seifig, Nadelholz, harzig
2247	Heptadecanal	n.d.
2269	(Z)-8/10-Heptadecenal*	wachsig
2321	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	n.d.

### 3.6.3 Fettsäuren

In den nachfolgenden Tabelle 56 -Tabelle 59 sind die, durch die Kaskadenreaktion entstanden Aldehyde der Fettsäuren Linolsäure, Margaroleinsäure, Ölsäure und Palmitoleinsäure und deren Geruchseindrücke dargestellt.

Tabelle 56: Aldehydprofil der Umsetzung von Linolsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde.

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
2003	(Z,Z)-5,8-Tetradecadienal	süß, wachsig, Zitrus
2125	(Z,Z)-6,9-Pentadecadienal	süß, wachsig, fettig
2235	(Z,Z)-7,10-Hexadecadienal	seifig, krautig, würzig
2339	(Z,Z)-8,11-Heptadecadienal	seifig, krautig, fettig, talgig

Tabelle 57: Aldehydprofil der Umsetzung von Margaroleinsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde.

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1745	(Z)-4-Dodecanal	seifig, krautig
1843	(Z)-5-Tridecenal	grün, wachsig, Zitrus,
1965	(Z)-6-Tetradecenal	wachsig, süß, seifig
2083	(Z)-7-Pentadecenal	Zitrus, seifig, fettig, Brühe
2200	(Z)-8-Hexadecenal	fettig, talgig, fleischig, Brühe

Tabelle 58: Aldehydprofil der Umsetzung von Ölsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde. n.d.= nicht detektiert

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1870	(Z)-4-Tridecenal	n.d.
1964	(Z)-5-Tetradecenal	seifig, wachsig
2067	(Z)-6-Pentadecenal	seifig, wachsig
2163	(Z)-7-Hexadecenal	wachsig
2275	(Z)-8-Heptadecenal	wachsig

Tabelle 59: Aldehydprofil der Umsetzung von Palmitoleinsäure mit Retentionsindex (RI) sowie den Geruchseindrücken der Aldehyde.

RI (VF-WAXms)	Aldehyd	Geruchseindruck
1555	(Z)-3-Decenal	grün
1643	(Z)-4-Undecenal	grün, Gurke
1758	(Z)-5-Dodecenal	wachsig, modrig
1870	(Z)-6-Tridecenal	wachsig, grün
1964	(Z)-7-Tetradecenal	seifig, Koriander
2077	(Z)-8-Pentadecenal	grün, fettig, Hühnchen

## 4. Diskussion

### 4.1 Pilzkultivierung und Lipidextraktion

In dieser Arbeit wurden 23 Pilze kultiviert, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit sehr unterschiedlich war. Das langsame Wachstum von LTO war vermutlich den Kulturbedingungen geschuldet. LTO war der einzige Pilz in dieser Versuchsreihe, der nicht auf MEA oder MEPA Medien angewachsen ist und nur mit einem speziellen MMN0.5 Medium im Labor kultiviert werden konnte. In der Natur bevorzugt LTO eher saure und trockene Böden (Bon and Wilkinson 2005), wodurch eine Kultivierung in Flüssigkultur den natürlichen Bedürfnissen des Pilzes widerspricht.

Weitere untersuchte Parameter waren die Lipidausbeute der Pilze in mg/g Trockenmasse (Abbildung 11) und die Trockenmasse in g/L Kulturmedium (Abbildung 12). Um möglichst hohe Erträge an Aldehyden zu erzielen, sind sowohl eine hohe Trockenmasse pro L Kulturmedium als auch ein hoher Lipidgehalt wünschenswert.

Auch wenn die Wachstumsgeschwindigkeit und die Fettsäureausbeute industriell relevant sind, lag das Hauptaugenmerk auf der Fettsäurezusammensetzung für die Transformation der Fettsäuren zu Aldehyden. Zusätzlich zu den Extrakten aus den Nussölen wurden 4 Pilzextrakte für die Biotransformation ausgewählt. ETH wurde gewählt, da dieser Pilz mit 39 unterschiedlichen Fettsäuren eine hohe Bandbreite an Fettsäuren für die Biotransformation besaß und somit in besonderem Maße für die Generierung von Aldehyden geeignet war. Mit 35 verschiedenen Fettsäuren und Margaroleinsäure mit einer Menge von 2,1% war auch *Mortierella hyalina* (MHY) ein geeigneter Kandidat für die Transformation. *Inonotus obliquus* (IOB) wurde ebenfalls wegen der Margaroleinsäure im Fettsäureprofil ausgewählt (0,44%). SVA zeigte geringe Anteile einer 16:1(11Z) Fettsäure von 0,14% und wurde ebenfalls für die Biotransformation eingesetzt.

Für diese Studie wurden die Pilze lediglich in Standardmedien gezüchtet, um Material für die Analyse des Fettsäureprofils zu erhalten. Eine weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurde nicht durchgeführt. Es wäre denkbar, die Biomasse sowie die Lipidausbeute durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu optimieren. Die Temperatur kann sowohl auf die Biomasseausbeute als auch auf das Fettsäureprofil Einfluss haben. Die meisten Pilze wachsen bei höheren Temperaturen

schneller und somit eignet sich eine erhöhte Temperatur für die Kultivierung im Labor am besten. Andererseits sind einige Pilze in ihrem natürlichen Habitat an niedrigere Temperaturen angepasst. Der Pilz *Inonotus obliquus* (IOB) kommt beispielsweise hauptsächlich in kühleren Bergwäldern bis hin zu subarktischen Regionen vor und ist eher an kühlere Umgebungen angepasst (Lee et al. 2008). Studien zeigen auch, dass das Fettsäureprofil temperaturabhängig ist, wobei kühlere Temperaturen zu einer Verschiebung zu einem höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren führt (Suutari 1995). Dieser Effekt rührt womöglich daher, dass ein höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren die Membranflexibilität auch bei niedrigeren Temperaturen gewährleistet.

Ein weiterer Faktor ist die Nährstoffverfügbarkeit im Medium. Es ist bekannt, dass durch ein niedriges Kohlenstoff zu Stickstoff (C/N) Verhältnis die Synthese von Proteinen gesteigert werden kann, während ein höheres C/N Verhältnis die Anreicherung von Lipiden begünstigt (Zhang et al. 2022; Weete 1974). Es wäre somit möglich die Lipidausbeute durch Variation des Mediums zu beeinflussen. Eine Änderung des C/N Verhältnisses während der Zucht wäre möglich um am Anfang auf die Bildung von Biomasse hin zu optimieren und gegen Ende den Kohlenstoffanteil zu erhöhen um die Lipidproduktion zu begünstigen.

Weitere Möglichkeiten der Optimierung bestünden in der Anpassung des pH-Werts des Mediums oder eine gezielte Supplementierung von Präkursoren, die von den Pilzen in eine gewünschte Fettsäure weiter metabolisiert werden.

## 4.2 Enzyme

Die ursprüngliche Idee für die Biotransformation war eine Koexpression der beiden Enzyme *Csα-DOX* und *VhFALDH* in einem pET-Duet-Vektor und der Einsatz der beiden Enzyme in einem Ganzzellassay. Die Hoffnung bestand auch darin, dass bei einem Ganzzellassay auf das Hinzufügen und Regenerieren der Kofaktoren wie  $\text{NAD}^+$  verzichtet werden könnte, da diese durch die lebenden Zellen produziert und regeneriert würden. Leider hat dieser Ansatz einige Nachteile. Das Verhältnis der beiden Enzyme zueinander lässt sich in einem Ganzzellassay nicht oder nur sehr begrenzt variieren und bestimmen. Für eine Kaskadenreaktion müsste die Zelle die Fettsäuren und Aldehyde aufnehmen, um diese mit Hilfe der Enzyme umzusetzen. Die Aufnahme von Fettsäuren ist durch die Zellen meist möglich, da diese für die Zelle als Nahrung dienen kann (Pavoncello et al. 2022). Dies hat wiederum den Nachteil, dass

die Fettsäuren auch anderweitig durch die Zellen metabolisiert werden können und somit der Kaskadenreaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Aldehyde hingegen sind für Mikroorganismen meist toxisch (Kunjapur and Prather 2015) und werden daher durch die Zellen nicht aufgenommen oder schnellst möglich metabolisiert oder ausgeschieden, was eine Kaskadenreaktion verhindert. Die Perforierung der Zellmembrane mittels eines Detergens oder durch eine Ultraschallbehandlung würde die Verfügbarkeit der Enzyme und der chemischen Komponenten zwar erhöhen, würde allerdings an den Nachteilen, wie der schlechteren Bestimmbarkeit der Aktivitätsverhältnisse zwischen den Enzymen und der herausfordernden Analytik durch störende Hintergrundsignale nichts ändern. Jegliche Substanzen der Zellen, die chemisch den Fettsäuren und Aldehyden ähneln, sind als Hintergrundsignal in der Analytik wahrzunehmen. Um eine störungsfreie Analyse der produzierten Aldehyde zu gewährleisten, war es unerlässlich, die Enzyme zu reinigen. Daher wurde die *VhFALDH* mit einem HIS-Tag versehen, um beide Enzyme über eine Nickel-Agarose-Säule reinigen zu können und somit Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren (Abbildung 17).

Die Lagerfähigkeit der gereinigten Enzyme war eingeschränkt. Die Enzymaktivität der *VhFALDH* nahm, ungeachtet der Lagerbedingungen bei  $-20\text{ °C}$  oder  $4\text{ °C}$ , innerhalb von 4 Tagen um etwa die Hälfte ab (Abbildung 19). Daher wurden die Enzyme jeweils frisch gereinigt und zeitnah für die Biotransformation eingesetzt. Die Enzymaktivität der *VhFALDH* konnte durch Verwendung des Kofaktor  $\text{NAD}^+$  anstelle des von (Buchhaupt et al. 2013) beschriebenen Kofaktors  $\text{NADP}^+$  um ca. das 4-fache gesteigert werden (Abbildung 18).

### 4.3 Optimierung der Biotransformation

Mittels der gereinigten Enzyme und Ölsäure als Modellfettsäure wurden die Umsetzungsparameter der Biotransformation optimiert. Ein Verhältnis der *Cs $\alpha$ -DOX* zur *VhFALDH* in U/mL von 8:1 erwiesen sich dabei als vielversprechend (Abbildung 21). Die *Cs $\alpha$ -DOX* wurde in höheren Mengen eingesetzt, um das Gleichgewicht auf der Seite der Aldehyde zu halten. Das Erhöhen der Menge an Enzym im Transformationsansatz bei gleichbleibendem Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander, hatte eine Steigerung der Ausbeute an Aldehyden zur Folge (Abbildung 22). In diesem Fall musste ein Kompromiss zwischen der höchst möglichen Menge pro

Biotransformation und der Verfügbarkeit der Enzyme im Labor gefunden werden. Da durch die Reinigung nur eine bestimmte Menge an Enzym zur Verfügung stand, mussten die Enzyme etwas niedriger konzentriert eingesetzt werden um hinreichend Material für mehrere Biotransformationen und Duplikat-Messungen zur Verfügung zu haben.

Die Umsetzungsdauer wurde auf 4 h festgesetzt. Bei längerer Umsetzungsdauer nahmen die Konzentrationen an Aldehyden und die Anzahl an Zyklen wieder ab (Abbildung 23). Dieser Effekt kann mehrere Gründe haben. Einerseits sind die Enzyme nicht lange stabil und verlieren während der Umsetzung an Aktivität. Eine schnellere Abnahme der *Csα*-DOX-Aktivität gegenüber der *VhFALDH*-Aktivität hätte zur Folge, dass vermehrt Aldehyde zu Fettsäuren oxidiert werden. Daneben sind auch nicht-enzymatische Faktoren möglich. Eine radikalische Oxidation der Aldehyde zur entsprechenden Säure ist als Nebenreaktion denkbar. Diese radikalischen Oxidationen können durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst und begünstigt werden. Einerseits ist die Oxidation durch OH-Radikale bekannt (Castañeda et al. 2017) und Metallionen wie Kupfer und Eisen können die Oxidation katalysieren (Liao et al. 2022; Tanaka et al. 2016). Durch einen leicht alkalischen pH im Umsetzungspuffer von pH 7,5 und die Anwesenheit von Eisen durch die Hämgruppe der *Csα*-DOX ist beides wahrscheinlich. Wie stark diese nicht-enzymatischen Reaktionen den Versuchsaufbau beeinflussen, konnte nicht ermittelt werden. Versuche zeigten jedoch, dass es während der Umsetzung von Palmitinsäure mittels *Csα*-DOX zu einer leichten Erhöhung der Absorption von Peroxyblue668 kam, was auf eine erhöhte Konzentration an Radikalen schließen lässt. Bei der Umsetzung der ungesättigten Ölsäure trat dieser Effekt noch stärker auf (Abbildung 24). Dies könnte auf eine Radikalbildung während des spontanen Zerfalls der von der *Csα*-DOX produzierten 2-Hydroperoxyfettsäure und eine Radikalbildung durch Autoxidation der ungesättigten Verbindungen hinweisen. Der genaue Mechanismus ist allerdings unbekannt. Die Hypothese, dass radikalische nicht-enzymatische Oxidationen die Transformation beeinflussen, wird durch die Tatsache bestärkt, dass sich diese nicht-enzymatische Oxidation der Aldehyde mittels Antioxidantien verringern ließ (Abbildung 25). Das eher lipophile Antioxidans Butylhydroxytoluol (BHT) scheint die radikalische Oxidation der Aldehyde zur korrespondierenden Säure nicht zu unterdrücken, wodurch in Umsetzungen nur mit *Csα*-DOX mehrere Zyklen beobachtet werden konnten. Der

lipophile Charakter von BHT lässt es in der Umsetzungsbrühe koagulieren und flockt aus, wodurch es seine antioxidative Wirkung in dieser Matrix verliert. Das hydrophile Peroxyblue668 hingegen vermag die Oxidation besser zu unterdrücken, was in einer deutlichen Verringerung der Aldehydkonzentration im 1. und 2. Zyklus und eine komplette Unterdrückung des 3. Zyklus zur Folge hatte. Ein Zusatz des Chelatbildners EDTA zum Transformationsansatz resultierte ebenfalls in einer Reduzierung der Zyklen, was auf eine Unterdrückung der durch Metallionen katalysierten Oxidation schließen lässt. Die hier durchgeführten Experimente sind nicht ausreichend, um den genauen Mechanismus zu ergründen. Dennoch wird damit deutlich, dass nicht-enzymatische Reaktionen bei der Biotransformationen eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen und die Produktion von Aldehyden mit diesem biotechnologischen Ansatz beeinflussen.

#### 4.4 Biotransformation und Sensorik

Für die Sensorik und die Bestimmung der geruchsaktiven Aldehyde wurden 8 Lipidextrakte ausgewählt: Ahifloweröl (AFO), Borretschsamenöl (BSO), Lipidextrakte aus *Entomophthora thaxteriana* (ETH), *Mortierella hyalina* (MHY) und *Mortierella alpina peyronel* (MAP), Johannisbeerkernöl (JKO), Macadamianussöl (MNO) und Sanddornkernöl (SKO). Dadurch konnte eine Reihe von verschiedenen Aldehyden generiert und deren olfaktorische Eigenschaften bestimmt werden. Da die Bestimmung der Gerüche stark von der Konzentration der Aldehyde und den Assoziationen des Probanden abhängig ist, wurden den einzelnen Verbindungen in unterschiedlichen Experimenten teilweise unterschiedliche Attribute zugeordnet.

Die Gesamteindrücke der Transformationsansätze (Abbildung 26) mit bestimmten Aldehyden zu assoziieren erwies sich als schwierig, da die meisten Gesamteindrücke keine starke Tendenz zu einem bestimmten Attribut zeigten oder, wie im Falle von MHY und MNO, die seifige Komponente im Vordergrund stand. MAP und AFO allerdings zeigten eine deutliche Tendenz zu gurkenartigen beziehungsweise zu fleischigen Gerüchen und eignen sich besser um bestimmte Aldehyde zu identifizieren, die für diesen Geruchseindruck verantwortlich sein können. Der Gesamtgeruchseindruck des Transformationsansatzes von AFO wurde hauptsächlich mit dem Attribut „gurkenartig“ beschrieben. Tatsächlich überwiegen Aldehyde wie Tridecanal, Tetradeccanal und Heptadecanal, die grüne, fruchtige und süßliche Note

zeigen und mit Gurke in Verbindung gebracht werden können. Auch im Transformationsansatzes von MAP, das im Gesamteindruck überwiegend als fleischig wahrgenommen wurde, sind Aldehyde wie (Z)-7-Hexadecenal, (Z,Z)-7,10-Hexadecadienal und (Z,Z)-8,11-Heptadecadienal dominierend, die einen hühnchenartigen Geruch aufweisen.

Die gesättigten Aldehyde Decanal, Dodecanal, Tridecanal und Tetradecanal wiesen in dieser Studie seifige und grüne Noten auf und waren sich untereinander ähnlich. Die online Datenbank „The Good Scents Company“ beschreibt die Aldehyde Decanal und Dodecanal als süß, wachsig und orangenähnlich. Dagegen werden die Attribute für Tridecanal eher herber, in Richtung Grapefruitgeruch und etwas seifig beschrieben. Tetradecanal wird mit wachsig, fischig angegeben (The Good Scents Company). Die Ähnlichkeit der Geruchseindrücke wird somit für Decanal, Dodecanal und Tridecanal von der Literatur gestützt, wobei die attribuierten Gerüche leicht abweichen. Einzig die Geruchsattribute von Tetradecanal stimmen nicht mit der Literatur überein. Diese Unterschiede könnten auf abweichende Konzentrationen der Aldehyde, unterschiedliche Matrices und unterschiedliche Methoden, wie GC-MS-O vs. Abriechen direkt am Glas, zurück zu führen sein. Pentadecanal vermittelte zusätzlich zu den seifigen, grünen Attributen noch metallische und süßliche Noten. Interessanterweise wird in der Literatur für Pentadecanal kein Geruch angegeben und wird nur bei manchen Herstellern im Produktdatenblatt mit „frischem Wachs“ beschrieben (ALFA Chemistry). Ab einer Kettenlänge von 15 C-Atomen verlieren die gesättigten Aldehyde ihren direkt wahrnehmbaren Geruch. Dies könnte mit der molekularen Masse zusammen hängen, welche die die Flüchtigkeit beeinträchtigen. Für die längerkettigen gesättigten Aldehyde Hexadecanal und Heptadecanal, die in den meisten Analysen detektiert wurden, wurde kein Geruch wahrgenommen. Für diese beiden Aldehyde wurde auch in der Literatur keine Geruchsbeschreibung gefunden. Hexadecanal wird allerdings eine Wirkung als Pheromon zugeschrieben (Mishor et al. 2021; van Nieuwenburg et al. 2019). Nur im Transformationsansatzes von MAP wurde Hexadecanal als wachsig und im Transformationsansatzes von AFO und MAP Heptadecanal als seifig beschrieben.

Obwohl in den meisten Biotransformationen einfach ungesättigte Aldehyde analytisch nachgewiesen wurden, konnten ihnen nur teilweise Geruchseindrücke zugeordnet werden. (Z)-5-Tridecenal und (Z)-6-Tridecenal zeigten die für Aldehyde typischen

seifigen und fettigen Geruchseindrücke. Beide Aldehyde wurden hinsichtlich ihres Geruchs in der Literatur noch nicht beschrieben. Ähnlich verhielt es sich mit (Z)-5-Tetradecenal und (Z)-7-Tetradecenal, die zusätzlich zu den seifigen, fettigen Attributen noch frische, grüne und grapefruitartige Gerüche zeigten. (Z)-5-Tetradecenal wurde auch in der Literatur als seifig und grün beschrieben (Chisholm et al. 2003). (Z)-6-Pentadecanal, (Z)-7-Pentadecanal und (Z)-8-Pentadecanal wurden als metallisch und nach Hühnchen riechend wahrgenommen, (Z)-7-Hexadecenal als am intensivsten fleischig. Attributzuordnungen der Gerüche zu den einzelnen einfach ungesättigten Aldehyden stellt eine Neuheit dar, da bis auf (Z)-5-Tetradecenal keiner der untersuchten, einfach ungesättigten Aldehyde in der Literatur hinsichtlich seiner olfaktorischen Eigenschaften beschrieben wurde. Obwohl sich die in dieser Arbeit untersuchten Fettaldehyde geruchlich ähneln und oft als seifig, beziehungsweise fettig wahrgenommen wurden, wichen die Geruchsattribute in Abhängigkeit von der Kettenlänge voneinander ab. Die Position der Doppelbindung scheint olfaktorisch dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Falle der zweifach ungesättigten Aldehyde zeigten (Z,Z)-5,8-Tetradecadienal und (Z,Z)-6,9-Tetradecadienal frische, grüne und zitrusartige Gerüche. Auch die beiden Pentadecadienale (Z,Z)-5,8-Pentadecadienal und (Z,Z)-6,9-Pentadecadienal wurden als floral und zitrusartig beschrieben. Die Dienale tendieren generell zu einem zitrusartigen Geruch, denn auch (Z,Z)-7,10-Hexadecadienal wurde mit einem Zitrusgeruch beschrieben. Darüber hinaus hinterließ (Z,Z)-7,10-Hexadecadienal allerdings auch einen krautigen und hühnchenartigen Eindruck. Bei (Z,Z)-8,11-Heptadecadienal überwog das krautige und hühnchenartige Aroma und es konnte keine Zitrusnote mehr wahrgenommen werden. In der Literatur wurde es jedoch nach Alge riechend und grün beschrieben (Kajiwara et al. 1989). Auch bei den mehrfach ungesättigten Aldehyden wird durch diese Studie hinsichtlich der Attributierung von Gerüchen Neuland betreten. Einzig die Aldehyde (Z,Z)-8,11-Heptadecadienal und (Z,Z,Z)-8,11,14-Heptadecatrienal wurden als Hauptbestandteil des Aromaprofils von Grünalgen identifiziert und sind somit in der Literatur als nach Alge riechend bekannt (Sugisawa et al. 1990; Sun et al. 2012)

(Z,Z,Z)-5,8,11-Heptadecatrienal und (Z,Z,Z)-8,11,14-Heptadecatrienal wurden beide als seifig, metallisch wahrgenommen mit einer Tendenz zu fleischig und blutig. Der

vierfach ungesättigte Aldehyd (Z,Z,Z,Z)-5,8,11,14-Heptadecatetraenal wies einen süßlichen, zitrusartigen Geruch auf.

#### 4.5 Industrielle Umsetzung

Die in dieser Studie durchgeführte Analysen wurden als wissenschaftliche Grundlagenstudie durchgeführt und sind daher nur bedingt direkt auf eine industrielle Anwendung übertragbar. Hauptaugenmerk wurde auf die Identifizierung neuer geruchsaktiver Aldehyde gelegt, die in dieser Studie durch eine GC-MS-O Analyse identifiziert, und deren Geruchsattribute bestimmt wurden. Dies hatte zur Folge, dass die Aldehyde nur in den, in den jeweiligen Proben vorhandenen Konzentrationen olfaktorisch bestimmt wurden. Unterschiede im olfaktorischen Eindruck durch unterschiedliche Konzentrationen und die Geruchsschwellen der Aldehyde wurden nicht bestimmt. Da geruchsaktive Stoffe je nach Konzentration vom Menschen unterschiedlich wahrgenommen werden, ist dies ein wichtiger Faktor für den industriellen Einsatz. Auch wurde der Fokus auf die einzelnen Aldehyde gelegt und olfaktorische Eindrücke von Mischungen nur am Rande untersucht (Tabelle 45 und Abbildung 26). Bedingt durch die höheren Kosten und den Arbeitsaufwand einer Reinigung ist es eher unwahrscheinlich, dass die einzelnen Substanzen in einer industriellen Herstellung in isolierter Form verarbeitet und verkauft werden. Vielmehr ist an zu nehmen, dass Aldehydmischungen angeboten und verarbeitet werden.

Für diese Studie war es unumgänglich die verwendeten Enzyme in aufgereinigter Form ein zu setzen um eine Analytik mit stark reduzierten Hintergrundsignalen zu garantieren. Für die industrielle Produktion ist dieser Schritt nicht notwendig und ein Ansatz mit ganzen Zellen wäre denkbar. Allerdings müssten die Zellen weiterhin mit Ultraschall aufgeschlossen oder mit Detergenzien perforiert werden um den Zugang der Fettsäuren und Aldehyde zu den Enzymen zu gewährleisten. Dieses Vorgehen hätte den Vorteil, dass die Enzyme in höheren Konzentrationen eingesetzt werden könnten, da der limitierende Faktor der Reinigung entfällt. Auch die Lagerfähigkeit der Enzyme würde dann eine untergeordnete Rolle spielen.

Der Einsatz von natürlichen Ausgangsstoffen für die Produktion von geruchsaktiven Aldehyden hat für die Industrie den Vorteil, dass die Bezeichnung „natürliches Aroma“

verwendet werden darf. Diese Bezeichnung führt bei den Verbrauchern zu einer höheren Akzeptanz und ist somit ein Verkaufsargument. Laut der EG-Aromenverordnung darf ein Aroma so genannt werden, wenn es aus natürlichen Ausgangsstoffen hergestellt wurde, auch wenn der wahrgenommene Geschmack des Aromas den Ausgangstoff nicht widerspiegelt (EG Verordnung Nr.1334/2008). Dennoch dürfen diese Aromen nicht ohne Weiteres in Lebensmitteln verwendet werden. Die Unbedenklichkeit der Aromen muss sichergestellt werden. Für die rechtliche Beurteilung ist auch ausschlaggebend, ob das Ausgangsprodukt als Lebensmittel anerkannt ist. Tatsächlich ist nicht jeder Pilz, der in dieser Studie verwendet wurde als Speisepilz bekannt und somit muss der rechtliche Aspekt und der mögliche Verwendungszweck einzeln geprüft werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Akakabe Y, Matsui K, Kajiwaru T (1999) Enantioselective  $\alpha$ -hydroperoxylation of long-chain fatty acids with crude enzyme of marine green alga *Ulva pertusa*. Tetrahedron Letters 40:1137–1140. doi: 10.1016/S0040-4039(98)02547-7
- Akhtar MK, Turner NJ, Jones PR (2013) Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. Proc Natl Acad Sci U S A 110:87–92. doi: 10.1073/pnas.1216516110
- ALFA Chemistry - Pentadecanal. <https://www.alfa-chemistry.com/product/pentadecanal-cas-2765-11-9-1058.html>. Accessed 17 December 2023
- Bajpai P, Bajpai PK (1993) Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. J Biotechnol 30:161–183. doi: 10.1016/0168-1656(93)90111-y
- Berger RG (1995) Aroma Biotechnology. Springer International Publishing, Cham
- Bon M, Wilkinson J (2005) Pareys Buch der Pilze. Über 1500 Pilze Europas. Kosmos, Stuttgart
- Buchhaupt M, Guder J, Sporleder F, Paetzold M, Schrader J (2013) Oxidation of fatty aldehydes to fatty acids by *Escherichia coli* cells expressing the *Vibrio harveyi* fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH). World J Microbiol Biotechnol 29:569–575. doi: 10.1007/s11274-012-1211-2
- Buchhaupt M, Guder JC, Etschmann MMW, Schrader J (2012) Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. Appl Microbiol Biotechnol 93:159–168. doi: 10.1007/s00253-011-3482-1
- Buráňová L, Řezanka T, Jandera A (1990) Screening for strains of the genus *Mortierella*, showing elevated production of highly unsaturated fatty acids. Folia Microbiol 35:578–582. doi: 10.1007/BF02819994
- Burger P, Plainfossé H, Brochet X, Chemat F, Fernandez X (2019) Extraction of natural fragrance ingredients: History overview and future trends. Chem Biodivers 16:e1900424. doi: 10.1002/cbdv.201900424
- Buttery RG, Turnbaugh JG, Ling LC (1988) Contribution of volatiles to rice aroma. J. Agric. Food Chem. 36:1006–1009. doi: 10.1021/jf00083a025

- Castañeda R, Iuga C, Álvarez-Idaboy JR, Vivier-Bunge A (2017) Rate constants and branching ratios in the oxidation of aliphatic aldehydes by OH radicals under atmospheric conditions. *J. Mex. Chem. Soc.* 56. doi: 10.29356/jmcs.v56i3.296
- Chisholm MG, Jell JA, Cass DM (2003) Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* blanco cv. clementine using gas chromatography-olfactometry. *Flavour Fragr. J.* 18:275–281. doi: 10.1002/ffj.1188
- Cotton S (2012) Every molecule tells a story, 1st edn. CRC Press, Boca Raton
- Dyal SD, Narine SS (2005) Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International* 38:445–467. doi: 10.1016/j.foodres.2004.11.002
- EG Verordnung Nr.1334/2008 - Aromenverordnung (EU). Nr. 1334/2008
- Fraatz MA, Goldmann M, Geissler T, Gross E, Backes M, Hilmer J-M, Ley J, Rost J, Francke A, Zorn H (2018) Biotechnological production of methyl-branched aldehydes. *J Agric Food Chem* 66:2387–2392. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04793
- Gajewski J, Pavlovic R, Fischer M, Boles E, Grininger M (2017) Engineering fungal de novo fatty acid synthesis for short chain fatty acid production. *Nat Commun* 8:14650. doi: 10.1038/ncomms14650
- Galliard T, Matthew JA (1976) The enzymic formation of long chain aldehydes and alcohols by alpha-oxidation of fatty acids in extracts of cucumber fruit (*Cucumis sativus*). *Biochim Biophys Acta* 424:26–35. doi: 10.1016/0005-2760(76)90046-1
- Guadagni DG, Buttery RG, Okano S (1963) Odour thresholds of some organic compounds associated with food flavours. *J. Sci. Food Agric.* 14:761–765. doi: 10.1002/jsfa.2740141014
- Hamberg M, León IP de, Sanz A, Castresana C (2002) Fatty acid  $\alpha$ -dioxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69:363–374. doi: 10.1016/S0090-6980(02)00040-0
- Hamberg M, Sanz A, Castresana C (1999) alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J Biol Chem* 274:24503–24513. doi: 10.1074/jbc.274.35.24503
- Hammer AK, Albrecht F, Hahne F, Jordan P, Fraatz MA, Ley J, Geissler T, Schrader J, Zorn H, Buchhaupt M (2020) Biotechnological production of odor-active methyl-

- branched aldehydes by a novel  $\alpha$ -dioxygenase from *Crocospaera subtropica*. *J Agric Food Chem* 68:10432–10440. doi: 10.1021/acs.jafc.0c02035
- Hammer AK, Emrich NO, Ott J, Birk F, Fraatz MA, Ley JP, Geissler T, Bornscheuer UT, Zorn H (2021) Biotechnological production and sensory evaluation of  $\omega$ 1-unsaturated aldehydes. *J Agric Food Chem* 69:345–353. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06872
- Hansson L, Dostlek M (1988) Effect of culture conditions on mycelial growth and production of  $\alpha$ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28. doi: 10.1007/BF00250448
- Horvat M, Winkler M (2020) In vivo reduction of medium- to long-chain fatty acids by carboxylic acid reductase (CAR) Enzymes: Limitations and Solutions. *ChemCatChem* 12:5076–5090. doi: 10.1002/cctc.202000895
- Kaehne F, Buchhaupt M, Schrader J (2011) A recombinant  $\alpha$ -dioxygenase from rice to produce fatty aldehydes using *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:989–995. doi: 10.1007/s00253-011-3165-y
- Kajiwara T, Yoshikawa H, Matsui K, Hatanaka A, Kawai T (1989) Specificity of the enzyme system producing long chain aldehydes in the green alga, *Ulva pertusa*. *Phytochemistry* 28:407–409. doi: 10.1016/0031-9422(89)80021-4
- Kanter J-P, Honold PJ, Lücke D, Heiles S, Spengler B, Fraatz MA, Harms C, Ley JP, Zorn H, Hammer AK (2022) An enzymatic tandem reaction to produce odor-active fatty aldehydes. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:6095–6107. doi: 10.1007/s00253-022-12134-3
- Kawasaki W, Matsui K, Akakabe Y, Itai N, Kajiwara T (1998) Long-chain aldehyde-forming activity in tobacco leaves. *Phytochemistry* 49:1565–1568. doi: 10.1016/s0031-9422(98)00236-2
- Kendrick A, Ratledge C (1996) Cessation of polyunsaturated fatty acid formation in four selected filamentous fungi when grown on plant oils. *J Amer Oil Chem Soc* 73:431–435. doi: 10.1007/BF02523914
- Kerler J, Kohlen E, van Der VA, Fitz W, Winkel C (2005) Method for the enzymatical preparation of flavors rich in C6-C10 aldehydes. US Patent 6864072
- Kim IJ, Bayer T, Terholsen H, Bornscheuer UT (2022a)  $\alpha$ -dioxygenases ( $\alpha$ -DOXs): Promising biocatalysts for the environmentally friendly production of aroma compounds. *ChemBiochem* 23:e202100693. doi: 10.1002/cbic.202100693

- Kim IJ, Brack Y, Bayer T, Bornscheuer UT (2022b) Two novel cyanobacterial  $\alpha$ -dioxxygenases for the biosynthesis of fatty aldehydes. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:197–210. doi: 10.1007/s00253-021-11724-x
- Koeduka T, Matsui K, Akakabe Y, Kajiwara T (2002) Catalytic properties of rice alpha-oxygenase. A comparison with mammalian prostaglandin H synthases. *J Biol Chem* 277:22648–22655. doi: 10.1074/jbc.M110420200
- Kunjapur AM, Prather KLJ (2015) Microbial engineering for aldehyde synthesis. *Appl Environ Microbiol* 81:1892–1901. doi: 10.1128/AEM.03319-14
- Lamers D, van Biezen N, Martens D, Peters L, van de Zilver E, Jacobs-van Dreumel N, Wijffels RH, Lokman C (2016) Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnol* 16:45. doi: 10.1186/s12896-016-0276-7
- Lee M-W, Hur H, Chang K-C, Lee T-S, Ka K-H, Jankovsky L (2008) Introduction to distribution and ecology of sterile conks of *Inonotus obliquus*. *Mycobiology* 36:199–202. doi: 10.4489/MYCO.2008.36.4.199
- Liao Y, Aspin A, Yang Z (2022) Anaerobic oxidation of aldehydes to carboxylic acids under hydrothermal conditions. *RSC Adv* 12:1738–1741. doi: 10.1039/d1ra08444e
- Liu W, Wang L-H, Fabian P, Hayashi Y, McGinley CM, van der Donk WA, Kulmacz RJ (2006) *Arabidopsis thaliana* fatty acid alpha-dioxygenase-1: evaluation of substrates, inhibitors and amino-terminal function. *Plant Physiol Biochem* 44:284–293. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.06.013
- Mishor E, Amir D, Weiss T, Honigstein D, Weissbrod A, Livne E, Gorodisky L, Karagach S, Ravia A, Snitz K, Karawani D, Zirler R, Weissgross R, Soroka T, Endevelt-Shapira Y, Agron S, Rozenkrantz L, Reshef N, Furman-Haran E, Breer H, Strotmann J, Uebi T, Ozaki M, Sobel N (2021) Sniffing the human body volatile hexadecanal blocks aggression in men but triggers aggression in women. *Sci Adv* 7:eabg1530. doi: 10.1126/sciadv.abg1530
- Pavoncello V, Barras F, Bouveret E (2022) Degradation of exogenous fatty acids in *Escherichia coli*. *Biomolecules* 12. doi: 10.3390/biom12081019
- Runguphan W, Keasling JD (2014) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metab Eng* 21:103–113. doi: 10.1016/j.ymben.2013.07.003

- Sajbidor J, Certík M, Dobroňová S (1988) Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales. *Biotechnol Lett* 10:347–350. doi: 10.1007/BF01026163
- Shimizu S, Kawashima H, Shinmen Y, Akimoto K, Yamada H (1988) Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *J Am Oil Chem Soc* 65:1455–1459. doi: 10.1007/BF02898307
- Shimizu S, Kawashima H, Akimoto K, Shinmen Y, Yamada H (1989) Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing oil by *Mortierella alpina* 1S-4 at low temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 32. doi: 10.1007/BF00164813
- Shimizu S, Kawashima H, Akimoto K, Shinmen Y, Yamada H (1991) Production of odd chain polyunsaturated fatty acids by *Mortierella* fungi. *J Americ Oil Chem Soc* 68:254–258. doi: 10.1007/BF02657620
- Shimizu S, Shinmen Y, Kawashima H, Akimoto K, Yamada H (1988) Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid. Activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature. *Biochem Biophys Res Commun* 150:335–341. doi: 10.1016/0006-291x(88)90525-6
- Shine WE, Stumpf PK (1974) Fat metabolism in higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 162:147–157. doi: 10.1016/0003-9861(74)90113-1
- Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H, Yamada H (1989) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 31. doi: 10.1007/BF00252518
- Stolterfoht H, Rinnofnér C, Winkler M, Pichler H (2019) Recombinant lipoxygenases and hydroperoxide lyases for the synthesis of green leaf volatiles. *J Agric Food Chem* 67:13367–13392. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02690
- Sugisawa H, Nakamura K, Tamura H (1990) The aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*). *Food Reviews International* 6:573–589. doi: 10.1080/87559129009540893
- Sun S-M, Chung G-H, Shin T-S (2012) Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*. *J Appl Phycol* 24:1003–1013. doi: 10.1007/s10811-011-9724-x
- Surburg H, Panten J (2006) Common fragrance and flavor materials. Wiley

- Suutari M (1995) Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). Arch. Microbiol. 164:212–216. doi: 10.1007/BF02529973
- Tanaka S, Kon Y, Uesaka Y, Morioka R, Tamura M, Sato K (2016) Iron-catalyzed selective oxidation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes to  $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic acids by molecular oxygen. Chem. Lett. 45:188–190. doi: 10.1246/cl.151024
- The Good Scents Company. decanal - <https://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1000172.html> dodecanal - <https://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1000371.html> tridecanal - <https://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1005541.html> tetradecanal - <https://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1000161.html> Zuletzt geprüft am: 17.12.2013
- Totani N, Oba K (1987) The filamentous fungus *Mortierella alpina*, high in arachidonic acid. Lipids 22:1060–1062. doi: 10.1007/BF02536452
- Truong K-N, Weger LB, Stahl W, Mouhib H (2017) Favored conformations of carbonyl compounds: A structural study of n-octanal. Chemphyschem 18:2631–2636. doi: 10.1002/cphc.201700341
- van Nieuwenburg D, Groot JHB de, Smeets MAM (2019) The subtle signaling strength of smells: A masked odor enhances interpersonal trust. Front Psychol 10:1890. doi: 10.3389/fpsyg.2019.01890
- Weete JD (1974) Fungal Lipid Biochemistry. Distribution and Metabolism. Springer US, Boston, MA
- Zhang X-Y, Li B, Huang B-C, Wang F-B, Zhang Y-Q, Zhao S-G, Li M, Wang H-Y, Yu X-J, Liu X-Y, Jiang J, Wang Z-P (2022) Production, biosynthesis, and commercial applications of fatty acids from oleaginous fungi. Front Nutr 9:873657. doi: 10.3389/fnut.2022.873657

## Veröffentlichte Literatur

- Kanter J-P, Honold PJ, Lüke D, Heiles S, Spengler B, Fraatz MA, Harms C, Ley JP, Zorn H, Hammer AK (2022) An enzymatic tandem reaction to produce odor-active fatty aldehydes. *Appl Microbiol Biotechnol* 106:6095–6107. doi: 10.1007/s00253-022-12134-3
- Kanter J-P, Honold PJ, Luh D, Heiles S, Spengler B, Fraatz MA, Zorn H, Hammer AK (2023) Biocatalytic Production of Odor-Active Fatty Aldehydes from Fungal Lipids. *J. Agric. Food Chem.* 71:8112–8120. doi: 10.1021/acs.jafc.3c01972

## Danksagung

Zu aller erst möchte ich Prof. Dr. Holger Zorn danken, der es mir ermöglicht hat dieses Projekt in seinem Institut zu bearbeiten und an den Hürden und Herausforderungen zu wachsen.

Ein liebes Dankeschön geht auch an die Symrise AG und deren Mitarbeiter in Holzminden für eine sehr angenehme Zusammenarbeit während des gesamten Projekts.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freunden und Kollegen Wendell Albuquerque, Bernhard Hellmann, Garima Maheshwari, Parviz Ghezellou, Tanya Zhuk und Alejandra Omarini, die mich über die ganze Zeit sowohl fachlich als auch emotional unterstützt haben.

Nicht zu vergessen natürlich Jean-Philippe Kanter und Carolin Mewe, die mich bei den Experimenten tatkräftig unterstützt haben und mit ihren feinen Nasen Gerüche aufgespürt haben, die mir entgangen sind.

Der ganzen „Hood“ danke ich von Herzen für 4 unvergessliche Jahre in einer der seltsamsten und dennoch liebevollsten Wohngemeinschaft die ich jemals kennen lernen durfte.

## Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Ort und Datum

---

Unterschrift