

Untersuchungen zur Biogenese von C₈-Aromastoffen in *Lentinula edodes* (Shiitake)

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von

Lebensmittelchemiker

Alexander Heinz Heuger

2019

Dekan:

Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Gutachter:

Prof. Dr. Holger Zorn

2. Gutachter:

Prof. Dr. Richard Göttlich

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Gießen, Juni 2019

Alexander Heuger

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn danke ich für die Bereitstellung des spannenden Forschungsthemas, die wissenschaftliche Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung sowie seine Geduld und seinen Optimismus. Prof. Dr. Richard Göttlich danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Prof. Dr. Gertrud Morlock und Prof. Dr. Sylvia Schnell danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Marco Fraatz für viele wissenschaftliche Gespräche, wertvolle Tipps und die gute Zusammenarbeit bei diversen Berichten und Vorträgen.

Bei Egon Gross, Torsten Geissler und Dr. Jakob Ley (Symrise AG) bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch.

Bei Prof. Dr. Peter Friedhoff und Dr. Wolfgang Wende (Institut für Biochemie) möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, Ultrazentrifugationen durchführen zu können. Dr. Wolfgang Wende danke ich zudem besonders für zahlreiche Tipps und hilfreiche Ratschläge. Dr. Lilia Gabsalilow, Dr. Laura Walzl und Dr. Anja Drescher danke ich für viele kleine Hilfen rund um die Ultrazentrifugationen.

Dr. Max Nüllen, Prof. Dr. Richard Göttlich und Dr. Jörg Neudert (Institut für Organische Chemie) danke ich für die Unterstützung rund um die Synthese des 10-HPOD. Dr. Erwin Röcker gebührt Dank für die Möglichkeit, verschiedene GC mit chiralen Trennsäulen nutzen zu können. Dr. Heike Hausmann danke ich für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren von 10-HPOD.

Bei Dr. Manfred Nimtz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) und Prof. Dr. Günter Lochnit (Biochemisches Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen) bedanke ich mich herzlich für die massenspektrometrische Proteinanalytik.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und -biotechnologie bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und das freundschaftliche Miteinander. Den ehemaligen „Azubinen“ Franziska Klee und Maxi Zimmer danke ich ganz herzlich für ihren Einsatz bei der Isolierung des 10-HPOD. Bei den Studenten, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten zu Teilbereichen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich herzlich. Insbesondere danke ich Aysha Javeed für ihren Beitrag zum Aromaprofil.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Büro- und Laborpartnern Andrea Bosse, Christiane Lauber, Johanna Rost, Katharina Schmidt, Katrin Kunkel, Marina Rusch, Stephanie Riemer und Vanessa Rühl bedanken. Danke für den tollen Zusammenhalt, die Unterstützung, viele hilfreiche Diskussionen und ganz besonders die schönen Stunden auch außerhalb des Instituts!

Katharina Schmidt und Katrin Kunkel danke ich herzlich für das Korrekturlesen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Meinen Eltern Karla und Heinz danke ich dafür, dass sie an mich glauben und ich mich in allen Situationen auf ihren Rückhalt verlassen kann.

Sarah danke ich für ihre Zuversicht, ihr Verständnis und ihre einzigartige Unterstützung.

Veröffentlichungen

Publikationen

Kleofas V, Heuger A, Fraatz MA, Rühl M, Zorn H (2014) Aroma Profile of the Mushroom *Agrocybe aegerita*. In: Hofmann T, Krautwurst D, Schieberle P (Hrsg.) Current Topics in Flavor Chemistry & Biology. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising. S. 422-425

Heuger AH, Fraatz MA, Zorn H (2015) Biotechnological production of C₈ aroma compounds by submerged cultures of shiitake (*Lentinula edodes*). In: Engel K-H, Takeoka G (Hrsg.) Importance of Chirality to Flavor Compounds. ACS Symposium Series 1212, American Chemical Society, Washington, DC. S. 85-96

Heuger A, Zorn H, Pietzner V (2014) Lebensmittelzusatzstoff Riboflavin. Unterricht Chemie 25 (139):18-23

Tagungsbeiträge

Heuger A, Javeed A, Fraatz MA, Zorn H (2014) Aromaprofil des Myzels von *Lentinula edodes* (Shiitake) und biotechnologische Herstellung von Oct-1-en-3-ol. Vortrag auf der Arbeitstagung des RV Südwest der LChG, Neustadt a. d. Weinstraße, 10.03.2014

Heuger A, Fraatz MA, Zorn H (2014) Biotechnologische Herstellung von Pilzaromen mit *Lentinula edodes* (Shiitake). Lebensmittelchemie 68 (6):149-150

Zusammenfassung

Ein biotechnologischer Ansatz zur Produktion von Aromaextrakten mit der Geruchsqualität „pilzig“ wurde auf Basis der submersen Kultivierung von *Lentinula edodes* (Trivialname Shiitake) und anschließendem Aufschluss des Myzels entwickelt. Die Kultivierung des Basidiomyceten erfolgte in zwei Stufen im Schüttelkolben-Maßstab. Die Bildung von Aromastoffen wurde anhand der Gehalte des Schlüsselaromastoffs Oct-1-en-3-ol in den Homogenaten des Myzels beurteilt. Als Parameter für das Wachstum des Pilzes wurde die Trockenmasse bestimmt. Das Medium der Hauptkultur wurde schrittweise optimiert, um die an der Aromabildung beteiligten Enzyme zu induzieren, und zudem vereinfacht, um Kosten einzusparen. Zusätzlich wurde die Dauer der Hauptkultur unter Steigerung der Ausbeute an Oct-1-en-3-ol um zwei Tage auf acht Tage verkürzt. Die Bildung der Aromastoffe nach Aufschluss des Myzels wurde eingehend untersucht und der Prozess optimiert. Insbesondere der Einfluss des Zusatzes des *precursors* Linolsäure sowie die Auswirkung der Inkubationszeit der Homogenate wurden ermittelt. Der Zusatz von Linolsäure sowie eine Inkubationszeit von bis zu 30 min bewirkte eine signifikante Steigerung der Gehalte an Oct-1-en-3-ol. Unter optimalen Bedingungen wurden mit etwa $6.200 \mu\text{g Oct-1-en-3-ol g}^{-1}$ Trockenmasse Myzel bzw. $35 \text{ mg Oct-1-en-3-ol L}^{-1}$ Transformationsansatz die höchsten bislang für submers kultivierte Basidiomyceten berichteten Gehalte erzielt. Als weitere Bestandteile des Aromaextraktes wurden u. a. die C₈-Aromastoffe Octan-1-ol und Oct-2-en-1-ol identifiziert. Das gebildete Oct-1-en-3-ol weist einen Enantiomerenüberschuss (% ee) von über 90% bis zu 93% zugunsten des erwünschten R(-)-Enantiomers auf.

Das Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von *L. edodes* wurde vergleichend unter enzyminhibierenden und enzymaktivierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurden mittels Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE) mit anschließender *solvent-assisted flavour evaporation* (SAFE) sowie durch *headspace solid-phase microextraction* (HS-SPME) Aromaextrakte aus homogenisiertem Myzel gewonnen. Die Identifizierung der geruchsaktiven Stoffe in den Extrakten erfolgte mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) und Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS). Das Aromaprofil des unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenen Myzels war geprägt durch C₈-Aromastoffe und S-haltige Verbindungen.

Ein zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase (HPL), welche die Spaltung von 10-Hydroperoxy-octadeca-8(*E*),12(*Z*)-diensäure (10-HPOD) zu Oct-1-en-3-ol und 10-Oxo-dec-8(*E*)-ensäure katalysiert. Als notwendige Vorarbeit wurde 10-HPOD über eine Photooxygenierung von Linolsäure synthetisiert und mittels Dünnschichtchromatographie, NMR sowie nach Derivatisierung mittels GC-MS analysiert. Zudem wurde die Bildung von 10-HPOD in submers kultiviertem Myzel nachgewiesen, was den aus Fruchtkörpern von Basidiomyceten bekannten Biosyntheseweg von Oct-1-en-3-ol bestätigt.

Ein spezifischer Assay für die HPL-Aktivität wurde durch Bestimmung des Produktes Oct-1-en-3-ol mittels HS-SPME-enantio-GC-MS entwickelt und erlaubte anhand des Enantiomerenverhältnisses und geeigneter Kontrollen die Unterscheidung zwischen enzymatischer Umsetzung und spontanem Zerfall des Substrates 10-HPOD. Der Assay wurde für die aktivitätsgeleitete Isolierung der HPL eingesetzt.

Im Überstand der Submerskultur von *L. edodes* wurde keine HPL-Aktivität festgestellt und somit eine Sekretion des gesuchten Enzyms ausgeschlossen. Daher erfolgte die Reinigung aus Myzel und Fruchtkörpern. Durch mechanischen Zellaufschluss wurde das Enzym freigesetzt und das Homogenat mittels Ultrazentrifugation separiert. Die HPL-Aktivität wurde im Pellet (Mikrosomenfraktion), aber nicht im Überstand der Ultrazentrifugation nachgewiesen. Folglich handelt es sich nicht um ein lösliches Protein, sondern vermutlich um ein Membranprotein. Für die weitere Reinigung wurde das Enzym unter Verwendung des nichtionischen Detergens Saccharosemonolaurat (SML) solubilisiert. Für die Reinigung der HPL aus dem Extrakt mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) erwiesen sich die Anionenaustauschchromatographie sowie die Gelfiltrationschromatographie (SEC) als geeignete Trenntechniken. Für das Enzym mit HPL-Aktivität wurde mittels Gelfiltrationschromatographie ein apparentes Molekulargewicht im Bereich von 42 kDa bis 66 kDa ermittelt. Als finale Reinigungsstrategie wurden die SEC und Ionenaustauschchromatographie kombiniert. Nach der Reinigung wurde geringe HPL-Aktivität nachgewiesen und mittels SDS-PAGE mit kolloidalen Coomassie-Färbung wurden zwei Proteinbanden mit Molekulargewichten von 62 kDa bzw. 55 kDa detektiert.

Die Banden wurden Partnern zur Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS sowie zur *de novo*-Sequenzierung nach tryptischem Verdau mittels ESI-MS/MS übergeben.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Proteinanalytik führten jedoch weder zu Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen noch wurden mit den generierten Sequenzen Treffer in den verfügbaren Basidiomyceten-Genomen erhalten. Die erfolgreiche Messung von HPL-Aktivität in der gereinigten Proteinlösung zeigt jedoch die Eignung der entwickelten Reinigungsstrategie.

Abstract

A biotechnological approach for the production of flavouring preparations with the odour quality “mushroom” was developed based on the submerged cultivation of *Lentinula edodes* (shiitake) with subsequent cell disruption. The cultivation of the basidiomycetous fungus was conducted in two steps on a shaking flask scale. The formation of aroma compounds in the homogenates of the mycelia was evaluated using the content of the character impact compound oct-1-en-3-ol as an indicator. Dry mass was determined as a parameter for judging the growth of the fungus. The main culture medium was optimised stepwise in order to induce the enzymes involved in the formation of C₈ compounds and, moreover, simplified to save costs. Additionally, the duration of the main culture was shortened by two days to eight days while increasing the yield of oct-1-en-3-ol. The formation of aroma compounds after cell disruption was investigated in detail and the process was optimised. Especially the influence of the addition of the precursor linoleic acid and the effect of the duration of the incubation of the homogenates were determined. The addition of linoleic acid as well as an incubation time of up to 30 min resulted in a significant increase of the oct-1-en-3-ol contents. Under optimised conditions, levels of up to 6,200 µg oct-1-en-3-ol per g mycelium (dry mass) or 35 mg oct-1-en-3-ol per L transformation batch, respectively, were obtained. These are the highest yields reported so far for basidiomycetes in submerged culture. Amongst others, the C₈ flavours octan-1-ol and oct-2-en-1-ol were identified as further constituents of the flavour preparation. The oct-1-en-3-ol formed in the process showed a high enantiomeric excess (% ee) of >90% up to 93% in favour of the desired *R*-(-)-enantiomer.

The flavour profile of the submerged cultivated mycelium of *L. edodes* was analysed comparing extracts obtained under enzyme inhibiting and enzyme activating conditions, respectively. Therefore, aroma extracts were obtained from the homogenised mycelia by means of liquid-liquid extraction (LLE) followed by the solvent-assisted flavour evaporation (SAFE) technique as well as headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The identification of odour-active compounds in the extracts was accomplished applying GC-olfactometry and GC-MS. The aroma profile of mycelia, which were homogenised under enzyme activating conditions, was composed of C₈ volatiles and sulfur-containing aroma compounds.

A second focus of this work was on the analysis and isolation of the hydroperoxide lyase (HPL) catalysing the cleavage of 10-hydroperoxy-octadeca-8(*E*),12(*Z*)-dienoic acid (10-HPOD) to yield oct-1-en-3-ol and 10-oxo-dec-8(*E*)-enoic acid. As a necessary prerequisite, 10-HPOD was synthesised using photooxygenation of linoleic acid and analysed by means of thin layer chromatography, NMR, and, after derivatisation, GC-MS. Furthermore, the formation of 10-HPOD was observed in mycelia from submerged culture, which confirms the biosynthetic pathway for oct-1-en-3-ol known for fruiting bodies of basidiomycetes.

A specific assay for the HPL activity was developed measuring the product oct-1-en-3-ol using HS-SPME-enantio-GC-MS and employment of appropriate controls allowed for differentiation of enzymatic conversion and spontaneous decomposition of the substrate 10-HPOD based on the enantiomeric ratio. The assay was applied for the activity-guided purification of the HPL.

No HPL activity was detected in the culture broth of submerged cultures of *L. edodes*; thus a secretion of the sought-after enzyme can be excluded. Consequentially, mycelia and fruiting bodies were selected as starting materials for the isolation. Mechanical cell disruption liberated the enzyme and the homogenate was separated by means of ultracentrifuging. The HPL activity was detected in the pellet (microsomal fraction) but not in the supernatant of the ultracentrifuging. Hence, the HPL is not a soluble protein but presumably a membrane protein. For the further purification process, the enzyme was solubilised using the non-ionic detergent saccharose monolaurate (SML). Anion exchange chromatography and gel filtration chromatography (SEC) proved to be suitable separation techniques for the purification of the HPL from the extract via fast protein liquid chromatography (FPLC). An apparent molecular weight of 42 kDa to 66 kDa was determined by means of gel filtration chromatography for the enzyme exhibiting HPL activity. In the final purification strategy, SEC and anion exchange chromatography steps were combined. After purification, slight HPL activity was demonstrated and SDS-PAGE with colloidal Coomassie staining detected two protein bands with molecular weights of 62 kDa and 55 kDa, respectively.

The protein bands were handed to partners for protein identification by means of MALDI-TOF-MS and for *de novo* sequencing applying ESI-MS/MS after tryptic digest. The results of the mass spectrometric analyses neither led to matches with known proteins nor the generated sequences yielded hits in the available genomes of

basidiomycetes. However, the successful measurement of HPL activity in the purified protein solution proved the applicability of the purification strategy.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Bisherige Kenntnisse.....	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien	9
2.1.1 Bestandteile der Nährmedien.....	9
2.1.2 Referenzsubstanzen	10
2.1.3 Lösungsmittel und sonstige Chemikalien	11
2.1.4 Gase.....	13
2.2 Basidiomyceten.....	14
2.3 Eluenten, Puffer und Substratlösungen.....	14
2.4 Geräte	15
2.5 Medien und Kultivierung.....	16
2.5.1 Medien für Vorkultur und Agarplatten.....	16
2.5.2 Hauptkulturmedien	17
2.5.3 Nährsalzlösung nach Belinky	20
2.5.4 Stammhaltung	20
2.5.5 Vorkultur.....	20
2.5.6 Hauptkultur.....	20
2.5.7 Kulturabbruch und Ernte des Myzels.....	20
2.5.8 Bestimmung der Biofeuchtmasse und Trockenmasse des Myzels	21
2.5.9 Herstellung von Lyophilisaten	21
2.6 Untersuchung der Bildung von C ₈ -Verbindungen.....	21
2.6.1 Homogenate von frischem Myzel	21
2.6.2 Einsatz von Proteaseinhibitoren.....	22
2.6.3 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle.....	22
2.6.4 Verwendung von Lyophilisat	23
2.6.5 Extraktion der Proben.....	23

2.7	Untersuchung des Aromas von submers kultiviertem Myzel	23
2.7.1	Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE).....	24
2.7.2	<i>Solvent-assisted flavour evaporation</i> (SAFE).....	24
2.7.3	Konzentrierung mittels Vigreux-Kolonne	24
2.7.4	Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME).....	24
2.8	Gaschromatographie.....	25
2.8.1	Berechnung des Retentionsindex nach Kováts	25
2.8.2	Berechnung der Responsefaktoren und Quantifizierung der Aromastoffe 26	
2.8.3	Berechnung des Enantiomerenüberschusses (% ee)	27
2.8.4	GC-Olfaktometrie	27
2.8.5	GC-MS	28
2.8.6	Enantio-GC	31
2.9	Synthese, Isolierung und Analyse von 10-HPOD.....	32
2.9.1	Photooxygenierung von Linolsäure	32
2.9.2	Isolierung der 10-HPOD.....	33
2.9.3	Analyse	34
2.10	Extraktion von 10-HPOD aus Myzel.....	35
2.11	Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase.....	35
2.11.1	Überprüfung auf extrazelluläre HPL-Aktivität	36
2.11.2	Zellaufschluss	36
2.11.3	Zentrifugation und Ultrazentrifugation	36
2.11.4	Solubilisierung.....	36
2.11.5	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	37
2.11.6	Finale Reinigungsstrategie.....	40
2.11.7	Assay des Hydroperoxid-Abbaus (FTC-Assay).....	40
2.11.8	Assay der Hydroperoxidlyase-Aktivität.....	42
2.12	Proteinanalytik.....	44
2.12.1	Konzentrierung.....	44
2.12.2	SDS-PAGE.....	44

2.12.3	Färbung mit kolloidalem Coomassie	47
2.12.4	Bestimmung des Molekulargewichts	47
2.12.5	Sequenzierung	47
2.13	Entsorgung	48
2.13.1	Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen	48
2.13.2	Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Biotechnologische Produktion von Aromaextrakten	49
3.1.1	Optimierung der Kultivierung	49
3.1.2	Optimierung der Bildung von Oct-1-en-3-ol	52
3.1.3	Enantiomerenverhältnis von Oct-1-en-3-ol	57
3.1.4	Vorkommen weiterer C ₈ -Aromastoffe	59
3.2	Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von <i>L. edodes</i>	62
3.2.1	Extraktion mittels LLE und SAFE	62
3.2.2	Extraktion mittels HS-SPME	68
3.3	Synthese, Charakterisierung und Nachweis von 10-HPOD	75
3.3.1	Synthese, Isolierung und Analytik	75
3.3.2	Strukturaufklärung	75
3.3.3	Nachweis aus Myzel	77
3.4	Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase	79
3.4.1	Überprüfung auf extrazelluläre Hydroperoxidlyase-Aktivität	79
3.4.2	Überstand und Pellet der Ultrazentrifugation	79
3.4.3	Extraktion aus dem Pellet	81
3.4.4	Reinigung	82
3.4.5	Finale Reinigungsstrategie	92
3.4.6	Elektrophorese und Sequenzierung	95
4	Diskussion	99
4.1	Biotechnologische Produktion von Aromaextrakten	99
4.1.1	Optimierung der Kultivierung	101
4.1.2	Optimierung der Bildung von Oct-1-en-3-ol	104

4.1.3	Enantiomerenverhältnis von Oct-1-en-3-ol.....	111
4.1.4	Bildung weiterer C ₈ -Aromastoffe	112
4.2	Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von <i>L. edodes</i>	113
4.3	Synthese, Charakterisierung und Nachweis von 10-HPOD	130
4.3.1	Synthese und Charakterisierung	130
4.3.2	Nachweis von 10-HPOD in Myzel	133
4.4	Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase.....	134
4.4.1	Assay	134
4.4.2	Isolierung der Hydroperoxidlyase	137
4.4.3	Hydroperoxid-metabolisierende Enzyme und möglicher Mechanismus der Hydroperoxidlyase	143
5	Ausblick	157
6	Literatur.....	159
7	Anhang.....	172
7.1	NMR-Spektren von 10-HPOD	172

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/Niederlande
DC	Dünnschichtchromatographie
d	Tage
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ee	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
EI	Elektronenstoßionisation
enantio-GC	Gaschromatographie mit chiraler Trennsäule
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
g/v	Gewicht pro Volumen
GC	Gaschromatographie
GC-FID-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS/MS-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HPL	Hydroperoxidlyase(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
10-HPOD	10-Hydroperoxy-octadeca-8(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-diensäure
HPOD	Hydroperoxy-octadecadiensäure(n)
HS-SPME	Kopfraum-Festphasenmikroextraktion
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
kDa	Kilodalton
KI	Kováts-Index
konz.	konzentriert
Lit.	Literatur

LLE	Flüssig-flüssig-Extraktion (<i>liquid-liquid extraction</i>)
m	Masse
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NMR	Kernmagnetresonanz
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
ODP	Olfaktometrie Detektor Port
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P/D	Pentan-Diethylether-Gemisch (1:1,12; v/v)
Ppo	<i>psi-factor producing oxygenase(s)</i>
rac.	racemisch
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAFE	<i>solvent-assisted flavour evaporation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Skt	Skalenteile
SML	Saccharosemonolaurat
S/SL	<i>split/splitless</i>
β -TBDAC	Heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O- <i>t</i> -butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
UV	Ultraviolett
VO	Verordnung
v/v	Volumen pro Volumen

Anmerkung zum Verständnis: Sofern nicht anders angegeben, ist mit dem Begriff Hydroperoxidlyase-Aktivität (HPL-Aktivität) in dieser Arbeit die Umsetzung von 10-HPOD zu Oct-1-en-3-ol gemeint, auch wenn möglicherweise weitere, bislang nicht beschriebene Hydroperoxidlyasen (HPL) mit abweichenden Reaktionen in Basidiomyceten vorkommen.

1 Einleitung

1.1 Bisherige Kenntnisse

Pilze stellen sowohl aufgrund ihres einzigartigen Geruchs und Geschmacks als auch wegen ihres Nährwertes weltweit beliebte Lebensmittel dar (Mau *et al.* 1994). Abgesehen von wenigen Ausnahmen werden die Fruchtkörper von Pilzen aus dem Phylum der Basidiomyceten verzehrt. Die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) schätzte die Weltjahresproduktion an Speisepilzen 2014 auf über 10,3 Mio. t (FAOStat 2017). Der Austerseitling (*Pleurotus ostreatus*), der Kräuterseitling (*Pleurotus eryngii*), der Strohpilz bzw. Reisstrohpilz (*Volvariella volvacea*, auch als Dunkelstreifiger bzw. Schwarzstreifiger Scheidling bezeichnet), der Champignon (*Agaricus bisporus*) und der Shiitake (*Lentinula edodes*) zählen dabei zu den am meisten angebauten und gehandelten Arten (Sánchez 2004). Pilze werden, abhängig von der Sorte, üblicherweise als Frischware, in Konserven oder getrocknet auf dem Markt angeboten.

Aus dem Verlust an Aromastoffen während der industriellen Verarbeitung von Pilzen beispielsweise durch Haltbarmachung als Konserven, durch Trocknung oder auch als Zutaten zu anderen Lebensmitteln kann sich ein Bedarf für den Zusatz von Aromen ergeben. Die Verbraucher und somit auch die lebensmittelproduzierende Industrie verlangen dabei nach Aromen und Aromaextrakten, welche nach den geltenden Anforderungen der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 (VO (EG) 1334/2008) als „natürlich“ deklariert werden können. Die Anwendung biotechnologischer Verfahren ist dabei zulässig und insbesondere dann interessant, wenn extraktive Verfahren aufgrund schlechter Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials oder sehr geringer Konzentrationen der Aromastoffe darin unwirtschaftlich sind (Berger 2009). Einen möglichen biotechnologischen Zugang zur Erzeugung von natürlichem Aromastoffen oder Aromaextrakten mit der Geruchsqualität „pilzig“ stellt dabei die submerse Kultivierung von Basidiomyceten dar.

Das charakteristische Pilzaroma wird durch die Gruppe der sog. C₈-Aromastoffe geprägt (Combet *et al.* 2006). Der Begriff beschreibt flüchtige, aliphatische Verbindungen mit acht Kohlenstoffatomen, welche durch den Abbau von ungesättigten Fettsäuren entstehen. Unter anderem Oct-1-en-3-ol, Octan-3-ol, Oct-2-en-1-ol, Octan-1-ol, Oct-1-en-3-on und Octan-3-on wurden in Basidiomyceten

nachgewiesen (Strukturen s. Abb. 1.1, Maga 1981, Fraatz und Zorn 2010). Das *R*-(-)-konfigurierte Enantiomer des Oct-1-en-3-ol weist den typischen Pilzgeruch auf und ist *character impact compound* des Pilzaromas (Mosandl *et al.* 1986).

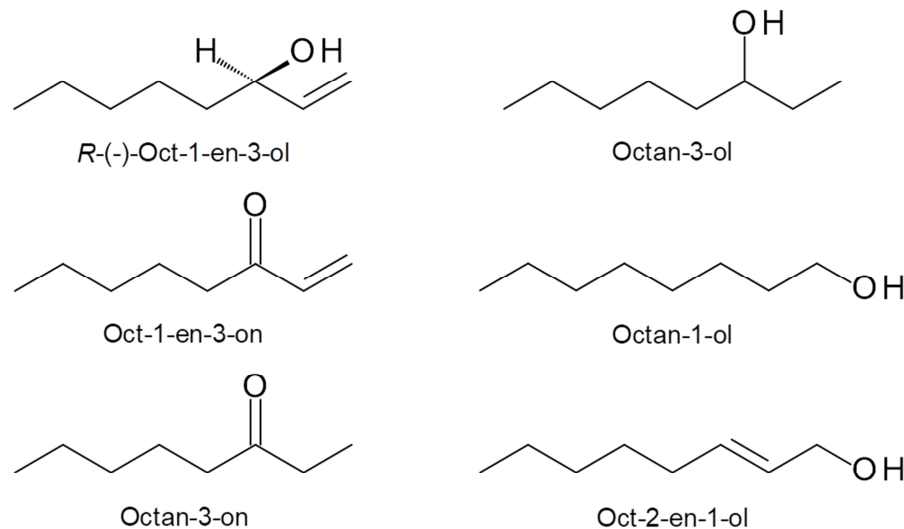


Abb. 1.1: Auswahl an aromarelevanten C₈-Verbindungen in Basidiomyceten (nach Combet *et al.* 2006, Fraatz und Zorn 2010)

Das Aroma des Weißfäulepilzes *L. edodes* wird neben den C₈-Aromen, welche die pilzige Note verursachen, durch das Auftreten einer Reihe potenter S-haltiger Aromastoffe geprägt (Strukturen s. Abb. 1.2). Das cyclische Lenthionin (1,2,3,5,6-Pentathiepan) wird als Schlüsselaromastoff für das schweflige Aroma des Shiitake angesehen (Morita und Kobayashi 1966, Wada *et al.* 1967). Bei den Fruchtkörpern hängt die Intensität und Qualität des Geruchs vom Alter sowie der Behandlung der Fruchtkörper ab. Cho *et al.* (2003) berichten, dass der Anteil der C₈-Aromastoffe an den gesamten flüchtigen Inhaltsstoffen während der Entwicklung von unreifen hin zu reifen Fruchtkörpern abnahm. Auch innerhalb der C₈-Verbindungen kam es zu Verschiebungen: der Anteil an Oct-1-en-3-ol, des Hauptbestandteils des Volatiloms, sank von etwa 63% auf ca. 42% und der Anteil an Octan-3-on stieg an. Ebenso kam es intermediär zu einem Anstieg des Anteils an Octan-3-ol (Cho *et al.* 2003).

Weiterhin beeinflusst die Verarbeitung der Fruchtkörper, beispielsweise das Trocknen, insbesondere die Gehalte S-haltiger Verbindungen und damit wesentlich die schweflige Geruchsqualität (Hiraide *et al.* 2010, Tian *et al.* 2016).

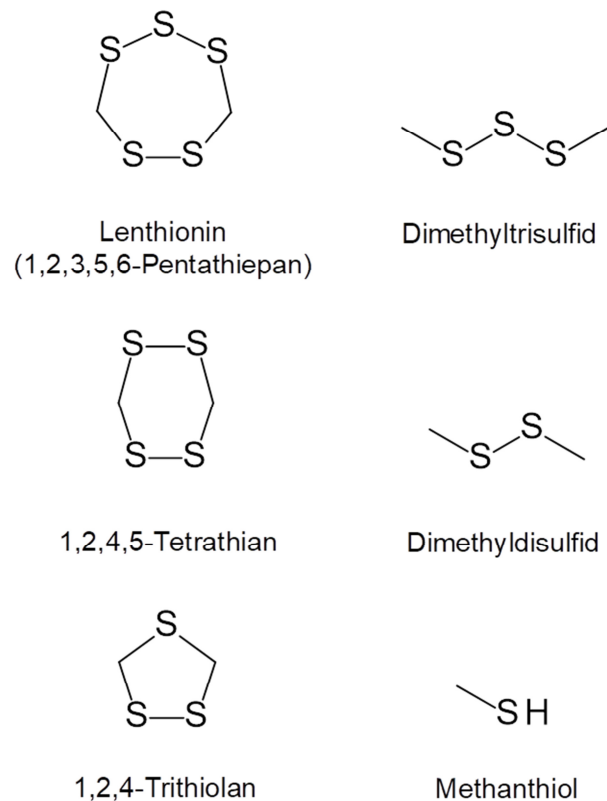


Abb. 1.2: Auswahl an cyclischen und nicht-cyclischen, schwefelhaltigen Aromastoffen in *L. edodes* (Chen *et al.* 1986)

Chen *et al.* (1986) sowie Chen und Ho (1986) beschreiben, dass die Bildung von S-haltigen Aromastoffen nach Zellaufschluss in mehreren Reaktionsschritten erfolgt und diese teils enzymatisch katalysiert sind. Zu den dabei gebildeten Verbindungen gehören u. a. 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian, Lenthionin sowie Dimethyltrisulfid (vgl. Abb. 1.2, Chen *et al.* 1986). Für die flüchtigen schwefelhaltigen Verbindungen wird als gemeinsame Vorstufe Lentinsäure angenommen (Iwami *et al.* 1975a, Yasumoto *et al.* 1976). Die Katalyse durch eine γ -Glutamyltransferase, welche Lentinsäure umsetzt (Iwami *et al.* 1975b,c), und eine Cysteinsulfoxid-Lyase, welche die intermediär auftretende Desglutamyl-Lentinsäure spaltet (Yasumoto *et al.* 1971, Iwami *et al.* 1975a), wurden für die Bildung von Lenthionin bewiesen und die Enzyme charakterisiert. Als weitere Schritte für die Bildung von Lenthionin und der weiteren cyclischen Polythiepane werden nicht-enzymatische Reaktionen angenommen (Yasumoto *et al.* 1976, zur Übersicht s. Abb. 1.3).

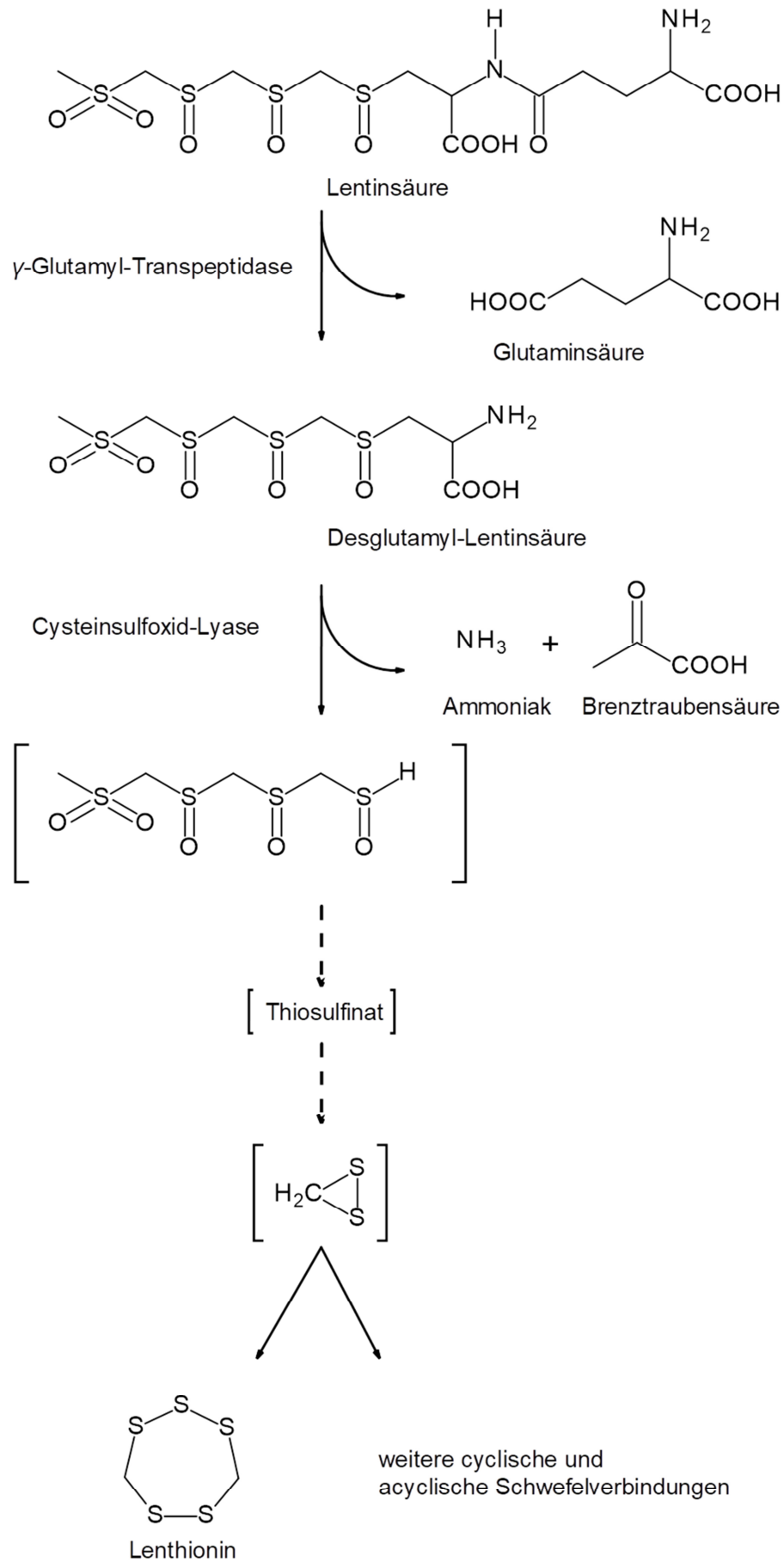


Abb. 1.3: Biosynthese von Lenthionin nach Yasumoto *et al.* (1971 und 1976)

Sowohl die Bildung der schwefelhaltigen Aromastoffe als auch der C₈-Aromen wurde nicht nur in Fruchtkörpern, sondern auch in Submerskulturen beobachtet (Spaether 2000).

Als Biosyntheseweg für die C₈-Aromastoffe wurde analog zur Bildung der *green leaf volatiles* in Pflanzen die enzymatische Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zu Hydroperoxiden und die nachfolgende Spaltung durch Hydroperoxidlyasen sowie ggf. noch eine Reduktion des C₈-Spaltstücks angenommen. Die Vorläuferstoffe und Bildungswege einiger Verbindungen wurden durch Arbeiten in den 1980er-Jahren aufgeklärt.

Tressl *et al.* (1982) lieferten Hinweise dafür, dass Linolsäure sowohl *precursor* der Bildung einiger C₈-Verbindungen als auch von oxo-funktionalisierten Decansäure-Derivaten ist. Wurzenberger und Grosch (1982) bewiesen diese Hypothese durch Experimente mit ¹⁴C-markierter Linolsäure für Oct-1-en-3-ol und 10-Oxo-dec-8(*E*)-ensäure (10-ODA). Dabei entstanden Oct-1-en-3-ol und 10-ODA in etwa im Verhältnis 1:1, was dafür spricht, dass es sich um die beiden Spaltstücke eines Moleküls Linolsäure handelt. Weiterhin zeigten Experimente in ¹⁸O₂-Atmosphäre und mit ¹⁸O-markiertem Wasser, dass der Sauerstoff im Oct-1-en-3-ol aus der Luft stammt (Wurzenberger und Grosch 1984a).

Wurzenberger und Grosch (1984c) wiesen durch Inkubation verschiedener Linolsäure-Hydroperoxide (9-HPOD, 10-HPOD, 12-HPOD und 13-HPOD) mit Homogenaten von *A. bisporus* nach, dass von diesen Hydroperoxiden nur das 10-HPOD (10-Hydroperoxy-octadeca-8(*E*),12(*Z*)-diensäure) zu Oct-1-en-3-ol und 10-ODA umgesetzt wird.

Die Spaltung des Substrates 10-HPOD durch das Homogenat von *A. bisporus* verläuft stereospezifisch nur über das *S*-Enantiomer und liefert Oct-1-en-3-ol mit einem hohen Enantiomerenüberschuss zugunsten des *R*-(-)-Enantiomers. Wurzenberger und Grosch (1984b) zeigten dies, indem sie das Enantiomerenverhältnis des eingesetzten 10-HPOD und des nicht umgesetzten 10-HPOD bestimmten sowie das Enantiomerenverhältnis des Oct-1-en-3-ol im Pilzhomogenat und im Reaktionsansatz mit Homogenat und 10-HPOD ermittelten. Sie folgerten daraus, dass die Reaktion von einer neuartigen Hydroperoxidlyase katalysiert wird.

Ferner schlugen sie vor, dass die Bildung des 10-HPOD durch eine Lipoxygenase (LOX) erfolgt.

Matsui *et al.* (2003) und Akakabe *et al.* (2005) bestätigten in ihren Arbeiten an Fruchtkörpern von *Lentinus decedetes* bzw. von *L. edodes* und *Tricholoma matsutake* durch *in situ*-Reduktion des 10-HPOD mit Glutathion-Peroxidase den Zusammenhang zwischen 10-HPOD und Oct-1-en-3-ol sowie die Stereochemie der beiden Verbindungen.

Dem oxidativen Abbau der Linolsäure zu Oct-1-en-3-ol und 10-ODA kommt eine physiologische Bedeutung für die Pilze zu, denn 10-ODA wirkt wachstumsregulierend und zeigt möglicherweise weitere hormonartige Effekte (Mau *et al.* 1992, Mau und Ma 2001, Champavier *et al.* 2000). Ob Oct-1-en-3-ol ebenfalls eine physiologische Funktion in Pilzen besitzt, ist bislang unklar.

Abb. 1.4 gibt eine Übersicht über den oben beschriebenen Biosyntheseweg von Oct-1-en-3-ol.

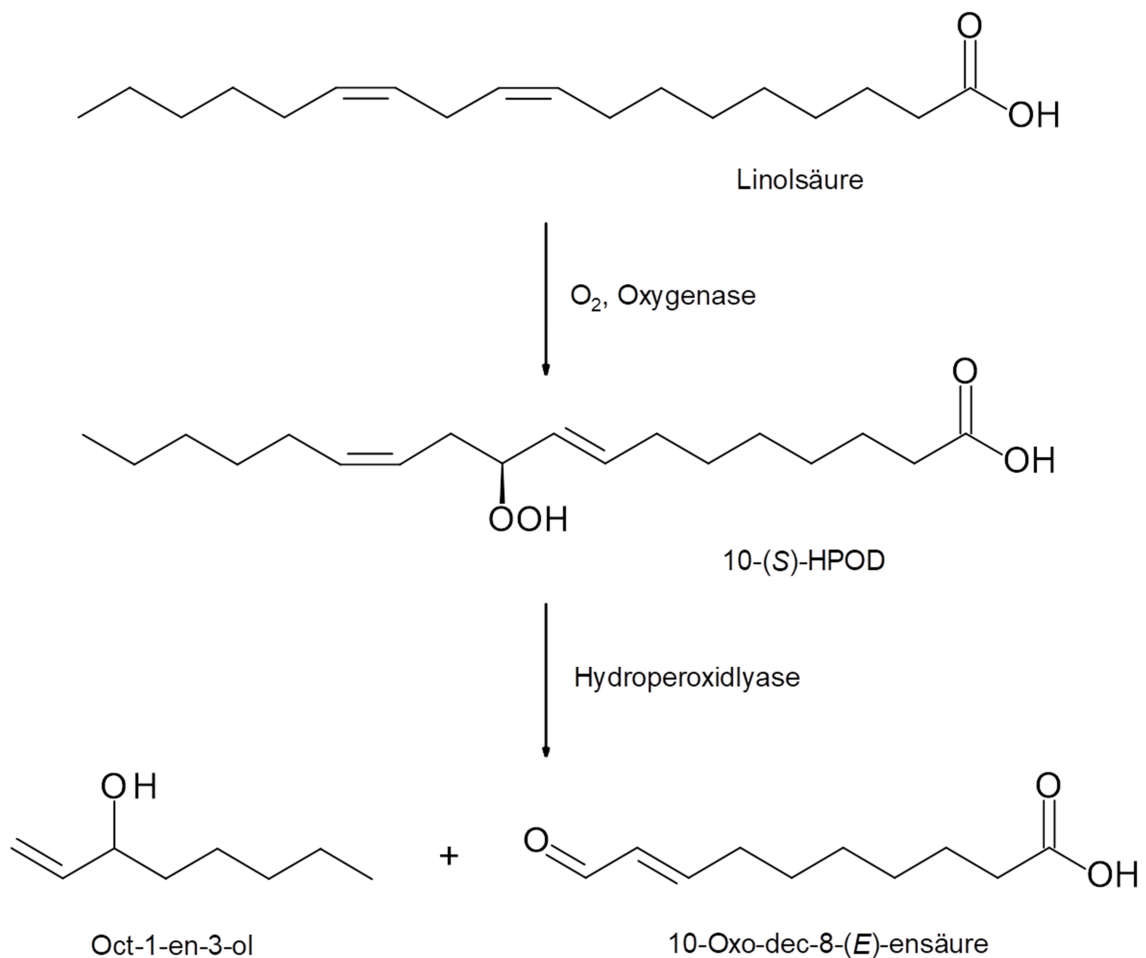


Abb. 1.4: Bildung von Oct-1-en-3-ol in Basidiomyceten nach Wurzenberger und Grosch (Wurzenberger und Grosch 1982, 1984a,b,c, Akakabe *et al.* 2005)

Die Reinigung und proteinbiochemische bzw. molekularbiologische Charakterisierung von LOX aus *Pleurotus* Species sind durch Kuribayashi *et al.* (2002) und Tasaki *et al.* (2013) sowie Fraatz *et al.* (2009) und Leonhardt *et al.* (2013) berichtet worden. Eine Beteiligung an der Bildung von Oct-1-en-3-ol wurde jedoch nicht gefunden, vielmehr handelt es sich um 13-LOX. Zudem wurde in *Laetisaria arvalis* eine Dioxygenase-Aktivität mit den Produkten 8(*R*)-HPOD sowie 8(*R*)-Hydroxy-Linolsäure und somit 8*R*-Spezifität bei der Umsetzung von Linolsäure nachgewiesen (Brodowsky und Oliw 1993).

Zu der postulierten Hydroperoxidlyase-Aktivität sind bislang keine Reinigung oder Charakterisierung beschrieben worden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Einer der Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit war die biotechnologische Herstellung von Aromaextrakten mit der Geruchsqualität „pilzig“ bzw. von natürlichem Oct-1-en-3-ol. Dazu wurde *L. edodes* in zwei Stufen submers kultiviert und die Bildung von C₈-Aromastoffen, insbesondere von Oct-1-en-3-ol, durch Aufschluss des Myzels initiiert. Die Dauer der Kultivierung und die Zusammensetzung des Hauptkulturmediums sollten schrittweise optimiert werden. Der Prozess zur Bildung der Aromastoffe sollte u. a. in Bezug auf den Zellaufschluss, den Zusatz des *precursors* Linolsäure sowie die Inkubationszeit untersucht werden. Die Aromaextrakte wurden mittels gaschromatographischer Analyse des Gehalts an Oct-1-en-3-ol und weiterer C₈-Aromastoffe sowie des Enantiomerenverhältnisses von Oct-1-en-3-ol charakterisiert.

Ferner sollte das Aromaprofil des submers kultivierten Myzels untersucht werden. Hierfür wurden mittels Flüssig-flüssig-Extraktion mit nachfolgender *solvent-assisted flavour evaporation* (SAFE) sowie mittels Kopfraum-Festphasen-Mikroextraktion (HS-SPME) Extrakte aus Homogenaten des Myzels hergestellt und mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Eine entsprechende Untersuchung des Aromaprofils ist bislang noch nicht beschrieben worden.

Den zweiten Fokus dieser Arbeit bildete die Reinigung und Charakterisierung einer an der Bildung von Oct-1-en-3-ol beteiligten Hydroperoxidlyase. Dazu war es nötig, das Substrat 10-HPOD zu synthetisieren und zu analysieren. Zudem sollte ein spezifischer Assay für die Aktivität des Enzyms etabliert werden. Die Isolierung des

gesuchten Enzyms sollte unter Anwendung geeigneter Techniken wie Ultrazentrifugation, Solubilisierung sowie der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) erfolgen. Die Sequenzierung des gereinigten Proteins sollte durch externe Partner mittels massenspektrometrischer Techniken erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

2.1.1 Bestandteile der Nährmedien

Tab. 2.1: Bestandteile der Nährmedien

Substanz	Reinheit	Hersteller
Agar-Agar	Kobe I pulv.	Carl Roth, Karlsruhe
L-Asparagin-Monohydrat	<i>research grade</i>	Serva, Heidelberg
Diammoniumhydrogenphosphat	puriss., p. a.	Fluka Analytical (Sigma Aldrich, Steinheim)
Citronensäure	≥ 99,5%	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	zur Analyse	Applichem, Darmstadt
<i>Corn Steep Liquor</i> *		Sigma Aldrich, Steinheim
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	puriss.	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	zur Analyse	Applichem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	für die Molekularbiologie, min. 99,5%	Applichem
Malzextrakt	<i>for microbiology</i>	Fluka Analytical (Sigma Aldrich)
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	zur Analyse	Applichem
Sojamehl, fettarm		W. Schoenenberg, Magstadt
Sojaöl	raffiniert, reinst	Carl Roth
Sojapepton	<i>for microbiology</i>	Fluka (Sigma Aldrich)
Trinatriumcitrat-Dihydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Tween® 80	reinst, Ph. Eur.	Carl Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	zur Analyse	Applichem

* Spezifikation: 40-60% Feststoffanteil

2.1.2 Referenzsubstanzen

Tab. 2.2: Referenzsubstanzen

Substanz	Reinheit	Hersteller
Alkanstandard-Lösung C 8-20	40 mg L ⁻¹ in n-Hexan	Fluka Analytical (Sigma Aldrich)
Anisaldehyd	purum, ≥ 98,0%	Fluka (Sigma-Aldrich)
Benzaldehyd	purum, ≥ 98,0%	Fluka (Sigma-Aldrich)
Dimethyltrisulfid	> 98,0%	TCI, Zwijndrecht/Belgien
Dodekan	<i>for synthesis</i>	Merck, Hohenbrunn
Grob-Mix	<i>programmed test mix</i>	Supelco (Sigma-Aldrich)
Hexanal	98%	Alfa Aesar, Karlsruhe
Nonanal	95%	Aldrich (Sigma-Aldrich)
Nonan-1-ol	99%	Alfa Aesar
Octanal	99%	Acros Organics, Geel/Belgien
Octan-1-ol	puriss., ≥ 99,5%	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich)
±-Octan-2-ol	98%	Alfa Aesar
DL-Octan-3-ol	97%	Acros Organics
Octan-2-on	98%	Aldrich (Sigma-Aldrich)
Octan-3-on	98%	Alfa Aesar
Oct-2(<i>E</i>)-enal	≥ 94%	SAFC (Sigma-Aldrich)
Oct-1-en-3-on	97%, <i>stab. with 0.1% BHA</i>	Alfa Aesar
Oct-2(<i>E</i>)-en-1-ol	97%	Alfa Aesar
rac. Oct-1-en-3-ol	98%	Acros Organics
<i>R</i> -(-)-Oct-1-en-3-ol	99%	Acros Organics
Protein Molecular Weight Standards Kit MS II	<i>for non-denaturing systems</i>	Serva

2.1.3 Lösungsmittel und sonstige Chemikalien

Tab. 2.3: Lösungsmittel

Substanz	Reinheit	Hersteller
Aceton	technisch	über Chemikalienausgabe bezogen
Chloroform	> 99%, p. a.	Carl Roth
Chloroform-d	für die NMR-Spektroskopie, 99,8 atom% D, stabilisiert mit Silberfolie	Acros Organics
Diethylether	≥ 99,5%, z. Synth., stabilisiert	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	≥ 99,8%, p. a.	Carl Roth
Essigsäure	100%, p. a.	Carl Roth
Ethanol	≥ 99,8%, p. a.	Carl Roth
Ethanol	technisch, mit MEK vergällt	über Chemikalienausgabe bezogen
n-Hexan	für HPLC, Min. 95,0%	Th. Geyer, Renningen
Isopropanol	<i>for HPLC</i>	VWR Chemicals, Löwen/Belgien
Methanol	<i>for HPLC, gradient grade</i>	VWR Chemicals
n-Pentan	laboratory reagent grade, > 99%	Fisher Scientific, Loughborough/UK
Toluol	≥ 99,5%, z. Synth.	Carl Roth

Pentan und Diethylether wurden als Gemisch (1:1,12; v/v; P/D) destillativ gereinigt und als Extraktionsmittel eingesetzt.

Tab. 2.4: Sonstige Chemikalien

Substanz	Reinheit	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese Gel 40	40% in Wasser, 37,5:1	Carl Roth
AEBSF-Hydrochlorid ¹	≥ 98,5%, für die Biochemie	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	<i>analytical grade</i>	Serva
Bromphenolblau, Natriumsalz	f. d. Elektrophorese	Carl Roth

Substanz	Reinheit	Hersteller
Coomassie Brilliant Blau G 250	-	Applichem
Dikaliumhydrogenphosphat	p. a., wasserfrei, $\geq 99\%$	Carl Roth
Dithiothreitol	für die Molekularbiologie	Applichem
E-64 ²	$\geq 98\%$, für die Biochemie	Carl Roth
Farbentwickler 3 ³	-	molekula, Shaftesbury/ Vereinigtes Königreich
Glycerol	$\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich
Glycerolpolypropoxylat	<i>average Mn ~266</i>	Aldrich (Sigma-Aldrich)
Kaliumdihydrogenphosphat	$\geq 99\%$, p. a.	Carl Roth
Kaliumdisulfit	$\geq 96\%$, p. a.	Carl Roth
Kieselgel 60, 0,0063- 0,2 mm	für die Säulen- chromatographie	Macherey-Nagel, Düren
Linolsäure	technisch	Aldrich (Sigma-Aldrich)
Linolsäure	$> 97,0\%$	TCI
MSTFA ⁴	-	Macherey-Nagel
1-Naphthol	99%	Alfa Aesar
Natriumborhydrid	98+%	Acros Organics
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$\geq 99\%$, für die Biochemie	Carl Roth
Natriumhydroxid	$\geq 99\%$, p. a., Plätzchen	Carl Roth
Natriumsulfat	wasserfrei, $\geq 99\%$	Carl Roth
Pepstatin A	min. 98%	Applichem
Saccharosemonolaurat (SML)	-	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
Salzsäure	rauchend, 37%, p. a.	Carl Roth
Schwefelsäure	95-98%, p. a.	Carl Roth
TEMED ⁵	-	Applichem
<i>meso</i> -Tetraphenylporphyrin	-	Synthese der AG Göttlich

Substanz	Reinheit	Hersteller
Trichloressigsäure	purum, p. a., ≥ 99,0%	Fluka (Sigma-Aldrich)
Trifluoressigsäure	<i>about 100 %, for HPLC</i>	VWR Chemicals
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	min. 99,3 %, <i>buffer grade</i>	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	min. 99%	Carl Roth
Tween [®] 20	Ph. Eur.	Carl Roth

¹4-(2-Aminoethyl-)benzensulfonylfluorid-hydrochlorid

²N-(*trans*-Epoxy succinyl-)-L-leucin-4-guanidinobutylamid

³N-(2-(4-Amino-N-ethyl-m-toluidino)-ethyl-)methansulfonamid-sesquisulfat-Monohydrat

⁴N-Methyl-N-(trimethylsilyl-)trifluoracetamid

⁵N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

2.1.4 Gase

Tab. 2.5: Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendungszweck
Druckluft	gereinigt	Hausversorgung	GC
Helium	5.0	Praxair, Düsseldorf	GC
Sauerstoff	2.5	Praxair	Photooxygenierung
Stickstoff	5.0	Praxair	GC
Stickstoff	-	Hausversorgung	enantio-GC-FID
Wasserstoff	5.0	Praxair	GC
Wasserstoff	-	Hausversorgung	enantio-GC-FID

2.2 Basidiomyceten

Der für die Submerskulturen verwendete Stamm von *L. edodes*, Trivialname Shiitake, wurde vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht/Niederlande) bezogen (Stammnummer CBS 389.89). Die Identität wurde in einer vorherigen Arbeit (Kunkel 2013) mittels ITS-Sequenzierung bestätigt.

Frische Fruchtkörper von *L. edodes* wurden im örtlichen Lebensmittelhandel gekauft (Rewe, „Shiitake Pilze“, frisch; Varietät unbekannt).

2.3 Eluenten, Puffer und Substratlösungen

Für die Herstellung der Phosphatpuffer wurden je nach gewünschtem pH-Wert 50 bzw. 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 50 bzw. 100 mM Dikaliumhydrogenphosphat zusammengegeben und der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen. Die weiteren Zusätze erfolgten wie unten angegeben. Als Eluenten für die FPLC verwendete Puffer wurden vor der Verwendung filtriert (0,2 µm Porengröße, regenerierte Cellulose, Whatman (GE Healthcare, München) und im Ultraschallbad entgast.

Linolsäurelösung in Phosphatpuffer (nach Grossman und Zakut 1979)

Die gewünschte Menge an Linolsäure wurde zusammen mit der entsprechenden Menge Tween[®] 20 in der Hälfte des beabsichtigten Gesamtvolumens an Reinstwasser dispergiert. Die Lösung wurde mit 1 M NaOH neutralisiert. Anschließend wurde die Hälfte des beabsichtigten Gesamtvolumens an 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, zugegeben. Es resultiert eine Linolsäurelösung gewünschter Molarität in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5); nach Bedarf wurden durch Verdünnung mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) Lösungen geringerer Konzentration hergestellt.

Beispiel: 500 mL 4 mM Linolsäure in Phosphatpuffer

Linolsäure	562 mg
Tween [®] 20	721 mg
Reinstwasser	250 mL
Phosphatpuffer (100 mM, pH 6,5)	250 mL

2.4 Geräte

Hier nicht aufgeführte Geräte sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

Tab. 2.6: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	Laboklav 150 MSL	SHP Steriltechnik
DC-Platten	Kieselgel 60 F254, 20 x 20 cm, auf Alufolie	Macherey-Nagel
Dispergiergerät	T 25 digital Ultraturrax®	IKA , Staufen
Dispergierwerkzeug	S 25 N – 18 G	IKA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	Christ, Osterode am Harz
Inkubationsschüttler	Ecotron	Infors, Einsbach
Inkubationsschüttler	Orbitron	Infors
Mehrfachdispenser	HandyStep®	Brand, Wertheim
Mikroplatten-Reader	Synergy2	Bio Tek Instruments, Friedrichshall
pH-Meter	SevenEasy™ pH	Mettler Toledo, Gießen
Pipette 0,5 – 10 µL	Transferpipette	Brand
Pipette 2 – 20 µL	Transferpipette	Brand
Pipette 20 – 200 µL	Transferpipette	Brand
Pipette 100 – 1000 µL	Transferpipette	Brand
Pipette 0,5 – 5 mL	Transferpipette	Brand
Pipette 500 – 5000 µL	Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette 1 – 10 mL	Transferpipette	Brand
Reinstwasseranlage	arium 611 VF	Sartorius, Göttingen
Schüttler	stuart Gyrorocker SSL3	Bibby Scientific, Stone/ Vereinigtes Königreich
Scanner	Bio-5000	Microtek, Hsinchu/Taiwan
Tischzentrifuge	Microfuge 22R	Beckman Coulter, Krefeld

Gerät	Modell	Hersteller
Ultrazentrifuge	Optima L-60; Rotor: 60-Ti	Beckman, Krefeld
Waage	Acculab ATL 6202 I	Sartorius
Waage	SI-234 A	Denver Instrument, Göttingen
Zentrifuge	Allegra X-15R	Beckman Coulter
Zentrifugenbecher	FEP/ETFT, 250 mL	Nalgene (Thermo Scientific, Schwerte)

2.5 Medien und Kultivierung

Je 100 mL der Medien wurden in 250 mL-Enghals-Erlenmeyerkolben gegeben, diese mit Cellulosestopfen verschlossen und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.5.1 Medien für Vorkultur und Agarplatten

2.5.1.1 Malzextrakt-Sojapepton-Medium

Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Sojapepton	3,0 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,6	

2.5.1.2 Malzextrakt-Agar

Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Agar-Agar	15,0 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,6	

2.5.1.3 Malzextrakt-Sojapepton-Agar

Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Sojapepton	3,0 g L ⁻¹
Agar-Agar	15,0 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,6	

2.5.2 Hauptkulturmedien

2.5.2.1 Medium I

Malzextrakt 20,0 g L⁻¹

2.5.2.2 Medium II

Malzextrakt 20,0 g L⁻¹

Sojaöl 2,5 g L⁻¹

2.5.2.3 Medium III („Belinky-Medium“, Belinky *et al.* 1994)

Diammoniumhydrogenphosphat 0,2 g L⁻¹

Sojamehl 10,0 g L⁻¹

Sojaöl 2,5 g L⁻¹

Kaliumdihydrogenphosphat 0,068 g L⁻¹

Corn Steep Liquor 8,0 mL L⁻¹

Nährsalzlösung (2.5.3) 100 mL L⁻¹

Citratpuffer (10 mM, pH 5,0) 900 mL L⁻¹

Einstellen auf pH 5,0

2.5.2.4 Medium IV

Diammoniumhydrogenphosphat 0,2 g L⁻¹

Sojamehl 10,0 g L⁻¹

Kaliumdihydrogenphosphat 0,068 g L⁻¹

Corn Steep Liquor 8,0 mL L⁻¹

Nährsalzlösung (2.5.3) 100 mL L⁻¹

Citratpuffer (10 mM, pH 5,0) 900 mL L⁻¹

Tween[®] 80 4,32 g L⁻¹

Einstellen auf pH 5,0

2.5.2.5 Medium V

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojamehl	10,0 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Citratpuffer (10 mM, pH 5,0)	900 mL L ⁻¹
Tween [®] 80	4,32 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.6 Medium VI

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojamehl	10,0 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.7 Medium VII

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojamehl	5,0 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.8 Medium VIII

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.9 Medium IX

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.10 Medium X

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
Tween [®] 80	4,32 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.2.11 Medium XI

Diammoniumhydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Sojaöl	2,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,068 g L ⁻¹
<i>Corn Steep Liquor</i>	8,0 mL L ⁻¹
Nährsalzlösung (2.5.3)	100 mL L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	5,0 g L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0	

2.5.3 Nährsalzlösung nach Belinky

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,48 g L ⁻¹
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	0,10 g L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	0,023 g L ⁻¹
Zinksulfat-Heptahydrat	0,06 g L ⁻¹
Calciumchlorid-Dihydrat	0,08 g L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	0,03 g L ⁻¹

2.5.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf Malzextrakt- (2.5.1.3) bzw. Malzextrakt-Sojapepton-Agarplatten (2.5.1.3). Die Agarplatten wurden jeweils mit einem ca. 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenen Stück einer Agarplatte beimpft. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C im Dunklen inkubiert bis etwa 80% der Platte bewachsen war. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert und regelmäßig nach diesem Verfahren überimpft.

2.5.5 Vorkultur

Die Vorkultur erfolgte in 250 mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium (2.5.1). Das Vorkulturmedium wurde mit einem etwa 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenen Agarstück je Kolben inokuliert. Das Agarstück wurde mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹, 30 s) zerkleinert. Das Wachstum erfolgte für 8 – 10 Tage bei 24 °C und Dunkelheit auf einem Inkubationsschüttler (150 U min⁻¹, 25 mm Auslenkung).

2.5.6 Hauptkultur

Die Hauptkultur erfolgte in 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Hauptkulturmedium (2.5.2). Die Vorkultur wurde mittels Ultraturrax homogenisiert (10.000 U min⁻¹, 30 s) und diente als Inokulum für die Hauptkultur (10 mL je Kolben, \cong 10% (v/v) des Hauptkulturmediums). Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 24 °C auf dem Inkubationsschüttler (150 U min⁻¹, 25 mm Auslenkung).

2.5.7 Kulturabbruch und Ernte des Myzels

Die Kultivierung wurde nach der angegebenen Zeit (typischerweise 8 – 10 Tagen) beendet und als Kulturparameter die Biofeuchtmasse und die Trockenmasse bestimmt (2.5.8). Anschließend wurde das Myzel durch Abseihen durch ein Tuch

vom Medium abgetrennt. Das Myzel wurde mit dest. Wasser gewaschen bis die abfließende Flüssigkeit klar und farblos war, gewogen und auf Eis gekühlt gelagert.

2.5.8 Bestimmung der Biofeuchtmasse und Trockenmasse des Myzels

Etwa 10 mL der Kulturbrühe wurden in ein gewogenes Falcontube gegeben und gewogen. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit dest. Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet ausgewogen und die Biofeuchtmasse nach Gleichung (1) berechnet.

$$BFM [\%] = \frac{m(\text{Auswaage}) - m(\text{Falcontube})}{m(\text{Einwaage}) - m(\text{Falcontube})} * 100 \quad (1)$$

Die Mehrfachbestimmung erfolgte abhängig von der Anzahl der Kulturkolben, typischerweise jedoch aus vier Kolben.

Der Trockenmassegehalt des feuchten Myzels (2.5.7) wurde mittels Lyophilisation bestimmt. Dazu wurden etwa 10 – 20 g des feuchten Myzels in eine gewogene Kristallisierschale genau eingewogen, die Schale mit perforierter Alufolie abgedeckt und bei -20 °C eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgte für mindestens 2 d und üblicherweise als Dreifachbestimmung. Nach Auswiegen wurde mit dem Trockenmassegehalt, der Masse des feuchten Myzels sowie dem Volumen der Kulturbrühe die Trockenmasse in g L⁻¹ berechnet.

2.5.9 Herstellung von Lyophilisaten

Die Herstellung von Lyophilisaten erfolgte aus frischem Myzel der submersen Kultivierungen analog zu der in 2.5.8 beschriebenen Bestimmung der Trockenmasse, jedoch unter Verwendung größerer Mengen Myzel. Das Lyophilisat wurde in verschlossenen Falcontubes im Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert.

2.6 Untersuchung der Bildung von C₈-Verbindungen

2.6.1 Homogenate von frischem Myzel

Je 5,0 g feuchtes Myzel (2.5.7) wurden in ein 40-mL-Schnappdeckelglas eingewogen und mit 15 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) bzw. einer Linolsäurelösung angegebener Konzentration (2.3) versetzt. Das Myzel wurde für 2 min bei

Raumtemperatur mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹) dispergiert. Für die Inkubation der Homogenate wurden die Gläser verschlossen und für die angegebene Zeit auf einem Inkubationsschüttler belassen (24 °C, 150 U min⁻¹).

Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die zwei Ansätze der Doppelbestimmung jeweils gemeinsam eingewogen und ohne Unterbrechung bis zum Überführen der Pentanphase in GC-Vials (2.6.5) durchgeführt. Anschließend wurde die nächste Doppelbestimmung bearbeitet. Die Ansätze wurden in der Reihenfolge aufsteigender Linolsäurekonzentration abgearbeitet.

2.6.2 Einsatz von Proteaseinhibitoren

Je 5,0 g feuchtes Myzel (2.5.7), welches in Medium VIII gewachsen war, wurden in ein 40-mL-Schnappdeckelglas eingewogen und mit 15 mL einer Linolsäurelösung (2 mM, 2.3) versetzt. Der Linolsäurelösung war zuvor ein Proteaseinhibitor-Cocktail zugegeben worden (Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Zusammensetzung des Proteaseinhibitor-Cocktails

AEBSF	1,66 mM
E64	11,5 µM
Pepstatin A	36,7 µM

Das Myzel wurde für 2 min bei Raumtemperatur mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹) dispergiert. Für die Inkubation wurden die Gläser verschlossen und für 15 min auf einem Inkubationsschüttler belassen (24 °C, 150 U min⁻¹). Weiterhin wurde wie unter 2.6.5 beschrieben verfahren. Als Vergleich dienten die entsprechenden Ansätze ohne Inhibitorcocktail und Inkubation (2.6.1).

2.6.3 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle

30,0 g feuchtes Myzel (2.5.7) wurden in ein Becherglas eingewogen, mit 90 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) bzw. einer Linolsäurelösung angegebener Konzentration (2.3) versetzt und 2 min bei Raumtemperatur mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹) behandelt. Das Homogenat wurde in eine Rührwerkskugelmühle (DYNO[®]-MILL Research Lab, WAB Willy A. Bachofen, Muttenz/Schweiz) gefüllt und

10 min lang im Umlauf mit 4000 U min^{-1} zerkleinert. Die Mühle wurde mit $4 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Wasser gekühlt, sodass die Temperatur des Mahlgutes $18 - 22 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug. Die Mahlkammer war zu 70% mit Glasperlen ($0,5 \text{ mm } \varnothing$, WAB Willy A. Bachofen) gefüllt. Nach dem Mahlen wurde das Homogenat direkt entnommen und nach 2.6.5 extrahiert.

2.6.4 Verwendung von Lyophilisat

Je 200 mg Lyophilisat (2.5.9) von Myzel, welches in Medium III gewachsen war, wurden in ein 40-mL-Schnappdeckelglas eingewogen und mit 20 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) bzw. einer Linolsäurelösung angegebener Konzentration (2.3) versetzt. Entweder wurde direkt homogenisiert (Variante A) oder nach kurzem Schütteln zunächst 10 min auf Eis gekühlt rehydratisieren gelassen (Variante B) und anschließend homogenisiert. Zum Homogenisieren wurde der Ultraturrax verwendet ($10.000 \text{ U min}^{-1}$, 2 min).

2.6.5 Extraktion der Proben

10 mL des Homogenats (2.6.1, 2.6.2 \triangleq der Hälfte des Homogenats; 2.6.3) oder der Ansätze mit Lyophilisat (2.6.4) wurden in ein weiteres Schnappdeckelglas ($\sim 15 \text{ mL}$ Volumen) pipettiert und mit $50 \text{ } \mu\text{L}$ Lösung des internen Standards Nonan-1-ol ($c = 0,9640 \text{ mg mL}^{-1}$ bzw. $c = 1,2975 \text{ mg mL}^{-1}$ in Methanol) versetzt. Nach Zugabe von 2 mL kaltem n-Pentan wurde das Gläschen verschlossen, geschüttelt sowie zur Phasentrennung bei $3.000 \times g$ ($5 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min) zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, in ein 2-mL-GC-Vial überführt und durch Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

Nach dem Trocken wurden die Proben gaschromatographisch analysiert (2.8.5).

2.7 Untersuchung des Aromas von submers kultiviertem Myzel

Die Untersuchung des Aromas von submers kultiviertem Myzel erfolgte mittels verschiedener gaschromatographischer Techniken, u. a. auch Gaschromatographie-Olfaktometrie. Die Proben wurden vergleichend unter enzyminhibierenden und enzymaktivierenden Bedingungen jeweils mittels LLE und nachfolgender SAFE sowie mittels HS-SPME extrahiert.

2.7.1 Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE)

200 g feuchtes Myzel (2.5.7) wurden mit 200 mL Methanol (enzyminhibierende Bedingungen) bzw. 200 mL Reinstwasser (enzymaktivierende Bedingungen) versetzt und mittels Ultraturrax homogenisiert (5 min, 10.000 U min⁻¹). Anschließend wurde das Homogenat 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend jeweils 200 mL Reinstwasser bzw. Methanol zugegeben. Die Suspension wurde drei Mal mit je etwa 350 mL P/D extrahiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch in Zentrifugenbechern aus PTFE zentrifugiert (4 °C, 3000 x g, 5 min). Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

2.7.2 Solvent-assisted flavour evaporation (SAFE)

Die Extrakte nach 2.7.1 wurden zur Entfernung nicht-flüchtiger Komponenten der SAFE (Engel *et al.* 1999) unterzogen. Die SAFE-Apparatur (BAENG[®], Glasbläserei Bahr, Manching) wurde über den Kühlkreislauf auf 20 °C temperiert und der mit einigen gläsernen Raschig-Ringen befüllte Probenkolben (1 L) wurde im Wasserbad auf 30 °C temperiert. Die Kühlfalle wurde mit flüssigem Stickstoff befüllt und das Kondensat in einem 500 mL-Kolben aufgefangen. Die Apparatur wurde mittels einer Turbomolekularpumpe (HiPace 80 auf einem HiCube 80 Eco-Pumpenstand, beides Pfeiffer Vacuum, Aßlar) auf 10⁻³ bis 10⁻⁴ mbar evakuiert. Der Extrakt wurde so langsam aus dem Tropftrichter in die Apparatur gelassen, dass die Verdampfung bereits vor Erreichen des Probenkolbens erfolgte. Nach Ende der SAFE-Prozedur bzw. zum Nachfüllen des Extraktes in den Tropftrichter wurde die Apparatur belüftet und ggf. der Auffangkolben mit dem Kondensat geleert.

2.7.3 Konzentrierung mittels Vigreux-Kolonnen

Das Kondensat (2.7.2) wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Spitzkolben an einer Vigreux-Kolonnen bei einer Wasserbadtemperatur von 45 °C auf 1 mL eingeeengt.

2.7.4 Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

7,5 g feuchtes Myzel (2.5.7) wurden mit 11,25 mL Methanol (enzyminhibierende Bedingungen) bzw. 11,25 mL Reinstwasser (enzymaktivierende Bedingungen) versetzt und mittels Ultraturrax homogenisiert (2 min, 10.000 U min⁻¹). Anschließend wurde das Homogenat im verschlossenen Schnappdeckelglas für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend 11,25 mL Reinstwasser bzw. Methanol

zugegeben. 10 mL der Probe wurden in ein 20 mL-Headspace-Vial überführt, ggf. ein Magnetrührstäbchen zugesetzt und dieses mit dem zugehörigen Deckel gasdicht verschlossen.

Für die Analyse mittels GC-MS/MS-O auf einer polaren Trennsäule (2.8.3) erfolgten die Inkubation, die Extraktion sowie die Desorption im S/SL-Injektor des Gaschromatographen automatisiert mit dem MultiPurposeSampler MPS 2XL (Gerstel, Mülheim/Ruhr). Für die Analyse mittels GC-MS auf einer unpolaren Trennsäule erfolgten die Inkubation und die Extraktion im temperierten Wasserbad auf dem Magnetheizrührer sowie die Desorption im S/SL-Injektor des Gaschromatographen manuell.

Tab. 2.8: Parameter der HS-SPME

	automatisiert	manuell
Temperieren	40 °C, 5 min	40 °C, 5 min
Durchmischung	250 rpm (Agitator)	Stufe 2 (Magnetrührer)
Extraktion	40 °C, 30 min (Agitator) Carboxen/PDMS-Faser (85 µm Schichtdicke, 1 cm Länge, Supelco), 2,7 cm Eindringtiefe	40 °C, 30 min (Wasserbad) DVB/Carboxen/PDMS-Faser (85 µm Schichtdicke, 1 cm Länge, Supelco), 1,8 cm Eindringtiefe
Desorption	S/SL-Injektor, 250 °C, 1 min, 5,4 cm Eindringtiefe	S/SL-Injektor, 250 °C, 3 min, 3,6 cm Eindringtiefe

2.8 Gaschromatographie

2.8.1 Berechnung des Retentionsindex nach Kováts

Der Retentionsindex nach Kováts (Kováts-Index, kurz: KI, Kováts 1958) wurde nach Gleichung (2) berechnet:

$$KI = 100 * z + 100 * \frac{(\lg t_{R'A} - \lg t_{R'N})}{(\lg t_{R'N+1} - \lg t_{R'N})} \quad (2)$$

z = Anzahl der C-Atome des n-Alkans, das vor dem Analyten eluiert

$t_{R'A}$ = Netto-Retentionszeit des Analyten [min]

$t_{R'N}$ = Netto-Retentionszeit des n-Alkans, das vor dem Analyten eluiert [min]

$t_{R'N+1}$ = Netto-Retentionszeit des n-Alkans, das nach dem Analyten eluiert [min]

Die Kováts-Indices wurden anhand der homologen n-Alkane im Bereich von 600 bis 3000 bestimmt.

2.8.2 Berechnung der Responsefaktoren und Quantifizierung der Aromastoffe

Die Responsefaktoren wurden bestimmt, indem Mischungen mit bekannten Konzentrationen des Analyten und des internen Standards Nonan-1-ol mittels GC-MS analysiert wurden (2.8.5). Die Bestimmung erfolgte als Dreifachbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen und der Responsefaktor wurde nach Gleichung (3) berechnet.

$$Rf = \frac{m_A * A_{IS}}{m_{IS} * A_A} \quad (3)$$

Rf = Responsefaktor

m_A = Masse Analyt [mg]

m_{IS} = Masse Interner Standard [mg]

A_A = Peakfläche Analyt [Skt]

A_{IS} = Peakfläche Interner Standard [Skt]

Die Gehalte G [$\mu\text{g g}^{-1}$ TM Myzel] an Aromastoffen wurden nach Analyse mittels GC-MS (2.8.5) nach Gleichungen (4) und (5) berechnet.

Menge im analysierten Aliquot:

$$m_A = Rf * \frac{m_{IS} * A_A}{A_{IS}} \quad (4)$$

Gehalt bezogen auf die eingesetzte Menge Myzel:

$$G = \frac{m_A * 2 * 1000}{E * \%TM} \quad (5)$$

G = Gehalt Analyt [$\mu\text{g g}^{-1}$ TM]

2 = Faktor für die Aliquote

1000 = Umrechnung von mg auf μg

E = Einwaage feuchtes Myzel [g]

$\%TM$ = Trockenmasseanteil des Myzels

2.8.3 Berechnung des Enantiomerenüberschusses (% ee)

Der Enantiomerenüberschuss (% ee) wurde aus den mittels enantio-GC (2.8.6) ermittelten Peakflächen der Enantiomere nach Gleichung (6) berechnet.

$$\% ee [R(-)\text{-Oct-1-en-3-ol}] = \frac{A_{R(-)} - A_{S(+)}}{A_{R(-)} + A_{S(+)}} * 100 \quad (6)$$

$A_{R(-)}$ = Peakfläche *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol [Skt]

$A_{S(+)}$ = Peakfläche *S*-(+)-Oct-1-en-3-ol [Skt]

2.8.4 GC-Olfaktometrie

Bei der Untersuchung der Aromaextrakte mittels GC-MS/MS-O und GC-FID-O wurde der am Olfaktometrie Detektor Port (ODP) wahrgenommene Geruchseindruck unter Verwendung eines Signalgebers aufgezeichnet (ODP-Spur). Die Intensität des Geruchseindrucks wurde dabei durch die Intensität der ODP-Spur auf einer Skala von 1 bis 4 wiedergegeben. Die Breite des ODP-Peaks entsprach der Dauer des Geruchseindrucks.

Tab. 2.9: Methodenparameter der GC-MS/MS-O

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Autosampler	MultiPurposeSampler MPS 2XL (Gerstel)
Injektor	Split/splitless, 250 °C
Modus	Splitless
Trennsäule	VF-WAXms 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trägergas	He, Fluss: 1,56 mL min ⁻¹ , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (12 min)
Splitterplatte	Teilungsverhältnis MS/ODP: 1/1
Detektion	MSD 7000 Triple Quadrupole (Agilent Technologies)
Transferline	250 °C
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 250 °C, Quadrupole: 150 °C

Kollisionsgase	N ₂ : 1,5 mL min ⁻¹ , He: 2,25 mL min ⁻¹
Modus	EI (70 eV); Totalionenscan (Q1), Massenbereich 33 – 300 <i>m/z</i>
Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Acquisition (B.05.01)
Olfaktometrie Detektor Port	ODP 3 (Gerstel), Transferline: 250 °C, Mischraumheizung: 150 °C, Make-up Gas: N ₂
Datenaufnahme	ODP-Recorder (3.1.1.5)

Tab. 2.10: Methodenparameter der GC-FID-O

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Injektor	<i>on-column</i> -Injektor, Injektionsvolumen 1 µL, Modus: <i>track oven</i>
Trennsäule	HP-Innowax 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trägergas	H ₂ , Fluss: 2,7 mL min ⁻¹ , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (7 min)
T-Stück	20 kPa, Teilungsverhältnis FID/ODP: 1/1
Detektor	FID, H ₂ : 40 mL min ⁻¹ , Druckluft: 400 mL min ⁻¹ , N ₂ (Make-up Gas): 25 ml min ⁻¹
Datenaufnahme	Chemstation (Rev. B.04.01)
Olfaktometrie Detektor Port	ODP 3 (Gerstel), Transferline: 250 °C, Mischraumheizung: 150 °C, Make-up Gas: N ₂
Datenaufnahme	ODP-Recorder (2.9.3.8)

2.8.5 GC-MS

Zur Identifizierung von Verbindungen in den Aromaextrakten wurden zunächst die mittels GC-MS aufgenommenen Massenspektren mit einer Spektrendatenbank (NIST MS 2008 bzw. 2011) abgeglichen und Substanzvorschläge erhalten. Weiterhin wurden die Kováts-Indices der Substanzen auf polarer und unpolarer Trennsäule mit denen authentischer Standards sowie mit Literaturdaten verglichen.

Die Zuordnung zu den mittels GC-FID-O (2.8.3) bestimmten Geruchseindrücken erfolgte über die Kováts-Indices der Peaks.

Bei der Untersuchung der Derivate der Hydroperoxy-octadecadiensäuren (HPOD, Tab. 2.14; Derivatisierung s. 2.9.3.2) wurden die gemessenen Massenspektren interpretiert und mit Angaben in der Literatur verglichen.

Tab. 2.11: Methodenparameter der GC-MS zur Bestimmung von C₈-Verbindungen und zur Identifizierung von aromaaktiven Verbindungen auf einer polaren Trennsäule

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies)
Autosampler	7693A (Agilent Technologies)
Injektor	Split/splitless, 250 °C
Modus	Splitless <u>oder</u> : split 1:10, Injektionsvolumen 1 µL
Trennsäule	HP-Innowax <u>oder</u> : VF-WAXms 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trägergas	He, Fluss: 1,2 mL min ⁻¹ , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (12 min)
Transferline	250 °C
Detektor	MSD 5975C VL Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Temperaturen Detektor	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C
Modus	EI (70 eV); Totalionenscan, Massenbereich 33 – 300 <i>m/z</i>
Software	MSD Chemstation (E02.00.493)

Tab. 2.12: Methodenparameter der GC-MS zur Identifizierung von aromaaktiven Verbindungen aus flüssigen Extrakten auf einer unpolaren Trennsäule

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies)
Autosampler	7693A (Agilent Technologies)
Injektor	Split/splitless, 250 °C

Modus	Splitless <u>oder</u> : split 1:10, Injektionsvolumen 1 μL
Trennsäule	DB-5MS 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trägergas	He, Fluss: 1,2 mL min^{-1} , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min^{-1} auf 240 °C (12 min) <u>oder</u> : 40 °C (3 min), 5 °C min^{-1} auf 300 °C (5 min)
Transferline	250 °C <u>oder</u> : 320 °C
Detektor	MSD 5975C VL Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Temperaturen Detektor	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C
Modus	EI (70 eV); Totalionenscan, Massenbereich 33 – 300 m/z
Software	MSD Chemstation (E02.00.493)

Tab. 2.13: Methodenparameter der GC-MS zur Identifizierung von aromaaktiven Verbindungen nach SPME auf einer unpolaren Trennsäule

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies)
Injektor	Split/splitless, 250 °C
Modus	Splitless
Trennsäule	DB-5MS 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μm Filmdicke (Agilent Technologies)
Trägergas	He, Fluss: 1,2 mL min^{-1} , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min^{-1} auf 300 °C (5 min)
Transferline	300 °C
Detektor	MSD 5975C VL Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Temperaturen Detektor	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C
Modus	EI (70 eV); Totalionenscan, Massenbereich 33 – 300 m/z
Software	MSD Chemstation (E02.00.493)

Tab. 2.14: Methodenparameter der GC-MS zur Analyse der Derivate der HPOD

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Autosampler	7693A (Agilent Technologies)
Injektor	Split/splitless, 250 °C
Injektionsparameter	Volumen: 1 µL
Trennsäule	DB5-MS (Agilent Technologies), 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	He, Fluss: 1,2 mL min ⁻¹ , konstant
Temperaturprogramm	100 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 200 °C, 2,5 °C min ⁻¹ auf 250 °C, 20 °C min ⁻¹ auf 320 °C (8,5 min)
Transferline	320 °C
Detektor	MSD 5975C VL Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Temperaturen Detektor	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C
Modus	EI (70 eV), Totalionenscan, Massenbereich 33 – 550 <i>m/z</i>
Software	MSD Chemstation (E02.00.493)

2.8.6 Enantio-GC

Tab. 2.15: Methodenparameter der GC-FID zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Oct-1-en-3-ol in flüssigen Extrakten

Gaschromatograph	HP 5890 Series II (Hewlett Packard; heute: Agilent Technologies, Waldbronn)
Injektor	Split/splitless, 250 °C
Injektionsparameter	Split: 1:71,453; Injektionsvolumen: 1 bzw. 2 µL
Trennsäule	Hydrodex β-TBDAC (Macherey-Nagel), 25 m x 0,25 mm ID
Trägergas	N ₂ , 12 psi (<i>constant pressure</i>); 1,12 mL min ⁻¹ bei 80 °C)
Temperaturprogramm	80 °C, 2 °C min ⁻¹ auf 120 °C, 15 °C min ⁻¹ auf 250 °C (5 min)

Detektor	FID, H ₂ : 30 mL min ⁻¹ , Druckluft: 400 mL min ⁻¹ , N ₂ (Make-up Gas): 30 ml min ⁻¹
Software	Chemstation Rev. A.10.02

Tab. 2.16: Methodenparameter der GC-MS zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Oct-1-en-3-ol nach SPME

Gaschromatograph	7890A (Agilent Technologies)
Injektor	Split/splitless, 220 °C
Modus	Splitless <u>oder</u> : split 1:10
Trennsäule	Hydrodex β -TBDAC (Macherey-Nagel), 25 m x 0,25 mm ID
Trägergas	He, Fluss: 0,7 mL min ⁻¹ , konstant
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 10 °C min ⁻¹ auf 80 °C (10 min), 2 °C min ⁻¹ auf 100 °C, 30 °C min ⁻¹ auf 220 °C (4 min)
Transferline	220 °C
Detektor	MSD 5975C VL Triple Axis Detector (Agilent Technologies)
Temperaturen Detektor	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C
Modus	EI (70 eV); Totalionenscan (Massenbereich 33 – 200 bzw. 33 – 400 <i>m/z</i>) <u>oder</u> : SIM (<i>m/z</i> 57, 72; <i>dwell</i> : 100 ms)
Software	MSD Chemstation (E02.00.493)

2.9 Synthese, Isolierung und Analyse von 10-HPOD

2.9.1 Photooxygenierung von Linolsäure

Die Synthese von 10-Hydroperoxyoctadeca-8(*E*),12(*Z*)-diensäure (10-HPOD) wurde modifiziert nach Wurzenberger und Grosch (1984c) mittels einer Photooxygenierung von Linolsäure durchgeführt.

25 g Linolsäure wurden in 100 mL Toluol gelöst und in einen Photoreaktor (mit Glasfritte zur Gaseinleitung am Boden sowie Lampeneinsatz mit Kühlmantel, ~350 mL Volumen) gegeben. 30,8 mg *meso*-Tetraphenylporphyrin wurden in 100 mL Toluol gelöst und in den Reaktor überführt. Nach Zugabe weiterer 120 mL Toluol wurde die Begasung mit Sauerstoff begonnen und die Reaktionsmischung mit einem Mitteldruck-Quecksilber-Strahler (TQ150, 150 W; Labor-UV-Reaktorsystem UV-RS-2, Heraeus, Hanau) bestrahlt. Durch Kühlung wurde die Temperatur der Reaktionsmischung bei maximal 15 °C gehalten. Die Bildung von Peroxiden wurde mittels Dünnschichtchromatographie und peroxidspezifischer Detektion mit Huber-Reagenz (2.9.3.1) verfolgt. Nach 150 min wurde die Reaktion beendet, die Reaktionsmischung in einen Rundkolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

2.9.2 Isolierung der 10-HPOD

Die Reaktionsmischung wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel vorfraktioniert und 10-HPOD mittels präparativer HPLC isoliert.

Für die Säulenchromatographie wurde eine Chromatographiesäule (\varnothing 3 cm) mit Kühlung (8 °C) mit 75 mL Kieselgel, welches in n-Hexan suspendiert war, gefüllt (Füllhöhe 10 cm). Das Kieselgel wurde zuvor nach Esterbauer (Esterbauer 1968) mit konz. Salzsäure gereinigt und der Wassergehalt eingestellt. Zur Trennung wurde ca. 1 mL der konzentrierten Reaktionsmischung (2.9.1) aufgegeben. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 100% n-Hexan zu 100% Diethylether in 10% Schritten (100 mL Volumen je Stufe; Fließgeschwindigkeit 2 Tropfen s^{-1}). Fraktionen von je 50 mL wurden aufgefangen. Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer auf etwa 1 mL eingengt und in Diethylether-Hexan (1:1, v/v; etwa 2 mL) aufgenommen. Die Fraktionen wurden nach 2.9.3.1 und 2.9.3.2 analysiert.

Fraktionen, die 10-HPOD enthielten, wurden mittels präparativer HPLC (Tab. 2.17) weiter getrennt. Erstreckte sich ein Peak über mehrere Fraktionen, wurden die entsprechenden Fraktionen im Spitzkolben gepoolt. Der Eluent wurde am Rotationsverdampfer im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 20 °C entfernt und der Kolben im Tiefkühlschrank gelagert. Sofern die exakte Menge an 10-HPOD benötigt wurde, wurden Lösungsmittelreste mittels Lyophilisation entfernt und anschließend gewogen.

Tab. 2.17: Präparative HPLC zur Isolierung von 10-HPOD

	Young Lin semipräparative HPLC (Young Lin, Anyang/Korea)
Probenaufgabe	manuell über Rheodyne-Ventil
Pumpe	YL 9110S Quarternary Pump
Eluent	Hexan/Isopropanol/Essigsäure 990:10:1 (v/v)
Fluss	20 mL min ⁻¹
Trennsäule	Macherey-Nagel Varioprep 250x21 mm Nucleodur 100-5 (µm) mit entsprechender Vorsäule
Detektor	YL 9120S UV/Vis Detector
Detektion	UV; $\lambda = 205$ und 232 nm
Fraktionssammler	CHF 122SC, Advantec, Tokio/Japan

2.9.3 Analyse

2.9.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Kontrolle auf Anwesenheit von Peroxiden erfolgte mittels DC unter Verwendung von Kieselgel 60-Platten als stationärer Phase und eines Pentan-Diethylether-Gemisches (1: 1,12; v/v) als Fließmittel. Nach Trennung und Abtrocknen der Platten wurden diese mit peroxidspezifischem Sprühreagenz nach Huber und Fröhlke (1972) entwickelt. Die Analyten erscheinen dabei als blaue Spots auf weißem Hintergrund. Das Reagenz wurde geschützt vor Licht und gekühlt gelagert. Zudem wurde das Reagenz mittels Positivkontrolle (ranzige Linolsäure oder Reaktionsmischung) überprüft.

2.9.3.2 Derivatisierung

Die Proben der Reaktionsmischung (2.9.1), der Fraktionen der Säulenchromatographie und präparativen HPLC (2.9.2) sowie Extrakte aus Myzel (2.10) wurden derivatisiert, um eine Untersuchung mittels GC-MS durchführen zu können. Dazu wurde abhängig vom erwarteten Gehalt an Hydroperoxiden etwa 0,5 bis 4 mL der Probenlösung mit Natriumborhydrid-Lösung (etwa 10%-ig in Methanol) versetzt. Nach Ende der Gasentwicklung wurde mittels DC (2.9.3.1) auf Peroxid-Freiheit geprüft; ggf. wurde weitere Natriumborhydrid-Lösung zugesetzt und erneut geprüft.

Der Überschuss an Natriumborhydrid wurde durch Zugabe von Salzsäure (0,5 M) zerstört und anschließend Hexan-Diethylether-Gemisch (1:1, v/v) zugesetzt. Nach Schütteln wurde die organische Phase abgenommen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde in Derivatisierungsröhrchen überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen (stuart Sample Concentrator SBH CONC/1, Barloworld Scientific Ltd., Stone/Vereinigtes Königreich). Der Rückstand wurde in 0,25 bis 0,5 mL Tetrahydrofuran gelöst und 0,25 bis 0,5 mL MSTFA zugesetzt. Nach Verschließen erfolgte die Silylierung für 1 h bei 70 °C, nach Abkühlen wurde die Probe in ein GC-Vial überführt.

Die derivatisierten Fettsäurehydroperoxide wurden unter den in 2.8.5 beschriebenen Bedingungen analysiert.

2.9.3.3 NMR-Spektroskopie

Für die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie wurden 15 mg 10-HPOD in 300 µL CDCl₃ aufgenommen und in ein Kapillar-NMR-Röhrchen überführt. Die Durchführung der NMR-Experimente (u. a. ¹³C, ¹H, NOESY) erfolgte durch Frau Dr. Hausmann (Institut für Organische Chemie) auf einem Avance III 600-NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten; 600 MHz). Frau Dr. Hausmann übernahm ebenfalls die Auswertung der Spektren.

2.10 Extraktion von 10-HPOD aus Myzel

10,0 g feuchtes Myzel (2.5.7), welches in Medium X (2.5.2.10) gewachsen war, wurde mit 10 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) bzw. Linolsäurelösung (2 oder 4 mM, 2.3) versetzt. Das Myzel wurde für 2 min bei Raumtemperatur mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹) dispergiert. Aus zwei Bestimmungen wurden je 7,5 mL Homogenat vereinigt und zwei Mal mit je 25 mL P/D-Gemisch extrahiert. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (5 min, 3000 x g). Die organischen Phasen der jeweiligen Proben wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Derivatisierung wurde mittels GC-MS auf 10-HPOD analysiert (2.9.3.2).

2.11 Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase

Zur Isolierung der Hydroperoxidlyase (HPL) wurden als Probenmaterial submers kultiviertes Myzel sowie Fruchtkörper eingesetzt. Durch eine Kombination geeigneter

Schritte (2.11.6) wurde das Enzym aus Fruchtkörpern soweit gereinigt, dass mittels SDS-PAGE nur noch zwei Banden nachweisbar waren. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung von Myzel, Fruchtkörpern und Enzympräparationen gekühlt.

2.11.1 Überprüfung auf extrazelluläre HPL-Aktivität

Der klare Kulturüberstand (2.5.8) einer Kultivierung im optimierten Medium (Medium VIII, 2.5.2.8) wurde im Aktivitätsassay (2.11.8) eingesetzt.

2.11.2 Zellaufschluss

Submers kultiviertes Myzel

Feuchtes Myzel (2.5.7) einer Kultivierung im optimierten Medium (2.5.2.8) wurde mit der gleichen Menge Puffer (g/v; Kaliumphosphatpuffer, 50 mM, pH 6,5, 4,6 mg Tween[®] 20 auf 100 mL) versetzt und mittels Ultraturrax (10.000 U min⁻¹, 2 min, auf Eis gekühlt) aufgeschlossen.

Fruchtkörper

Klein geschnittene Fruchtkörper wurden mit der dreifachen Menge an Puffer (g/v; s.o.) versetzt und durch Behandlung mit dem Ultraturrax (10.000 U min⁻¹, 3 min, auf Eis gekühlt) zerkleinert.

2.11.3 Zentrifugation und Ultrazentrifugation

Das Homogenat (2.11.2) wurde zur Entfernung grober Partikel zentrifugiert (10.000 x g, 15 min, 4 °C).

Der trübe Überstand wurde zur Ultrazentrifugation eingesetzt (Beckman Optima L-60, Rotor: 60-Ti, 40.000 U min⁻¹, mind. 30 min, 7 °C). Der Überstand – teilweise mit einer feinen, flotierenden, milchigen Schicht – wurde vom Pellet abgenommen.

Zur Untersuchung der Aktivität wurde das Pellet in 40 mL Puffer (Kaliumphosphatpuffer, 50 mM, pH 6,5, 4,6 mg Tween[®] 20 auf 100 mL) mit dem Ultraturrax (10.000 U min⁻¹, 2 x 30 s) dispergiert und die trübe Suspension im Assay eingesetzt.

2.11.4 Solubilisierung

Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde mit Puffer mit Zusatz des Detergens Saccharosemonolaurat (SML; 50 mM Kaliumphosphat, pH 8,0, 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat) in einem Mörser auf Eis verrieben. Die Suspension wurde in

ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Mörser mit weiteren 5 mL Puffer nachgespült. Durch Ultrazentrifugation (2.11.3) wurde ein klarer Überstand erhalten.

2.11.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) wurde an einem BioLogic DuoFlow-System mit BioLogic BioFrac-Fraktionssammler (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Extinktion bei 280 nm sowie der Leitfähigkeit.

Die Fraktionen, die diskreten Peaks im Chromatogramm bzw. festgelegten Bereichen des Chromatogramms entsprachen, wurden gepoolt und dann zur weiteren Reinigung oder zum Aktivitätsassay eingesetzt. Zudem wurden nach Bedarf die entsprechenden Fraktionen von mehreren Läufen vereinigt.

2.11.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Tab. 2.18: Parameter zur Ionenaustauschchromatographie

Trennsäule	HiTrap Q FF 1 mL (GE Healthcare)
Ladepuffer (A)	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat
Elutionspuffer (B)	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat, 1 M NaCl
Fluss	1 mL min ⁻¹
Gradient	100% A (1 min, dann Injektion, 7 min), 100% A auf 80% A 20% B in 2 min, 80% A 20% B (5 min), 80% A 20% B auf 100% B in 5 min, 100% B (5 min), 100% A (5 min)
Probenaufgabe	1 bis 2 mL
Fraktionsgröße	1 mL

Tab. 2.19: Parameter zur Ionenaustauschchromatographie – letzter Reinigungsschritt

Trennsäule	HiTrap Q FF 1 mL (GE Healthcare)
Ladepuffer (A)	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat
Elutionspuffer (B)	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat, 1 M NaCl
Fluss	1 mL min ⁻¹
Gradient	100% A (1 min, dann Injektion, 10 min), 100% A auf 80% A 20% B in 2 min, 80% A 20% B (5 min), 100% B (5 min), 100% A (10 min)
Probenaufgabe	0,5 mL bis 2,0 mL
Fraktionsgröße	0,5 mL

2.11.5.2 Gelfiltrationschromatographie

Tab. 2.20: Parameter zur Gelfiltrationschromatographie

Trennsäule	ENrich 650 SEC (10 x 300 mm, Bio-Rad)
Laufpuffer	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat
Fluss	0,8 mL min ⁻¹
Probenaufgabe	0,5 mL
Fraktionsgröße	1 mL

Tab. 2.21: Parameter zur Gelfiltrationschromatographie

Trennsäule	Superdex 75 (10/300 GL, GE Healthcare)
Laufpuffer	50 mM Kaliumphosphat pH 8,0 mit Zusatz von 0,5% SML, 10% Glycerolpolypropoxylat
Fluss	0,4 mL min ⁻¹
Probenaufgabe	0,5 mL
Fraktionsgröße	0,5 mL

Zur Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte eine Kalibrierung mit Proteinstandards (Serva), welche im Laufpuffer gelöst wurden. Die Bestimmung des Ausschlussvolumens erfolgte mit Thyroglobulin bzw. boviner Katalase. Die Retentionskoeffizienten K_{av} wurden nach Gleichung (7) berechnet und gegen die Logarithmen der Molekulargewichte aufgetragen. Die Kalibriergerade wurde mittels linearer Regression erstellt.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (7)$$

V_e = Elutionsvolumen des Proteins

V_0 = Ausschlussvolumen

V_t = Gesamtvolumen der Säule

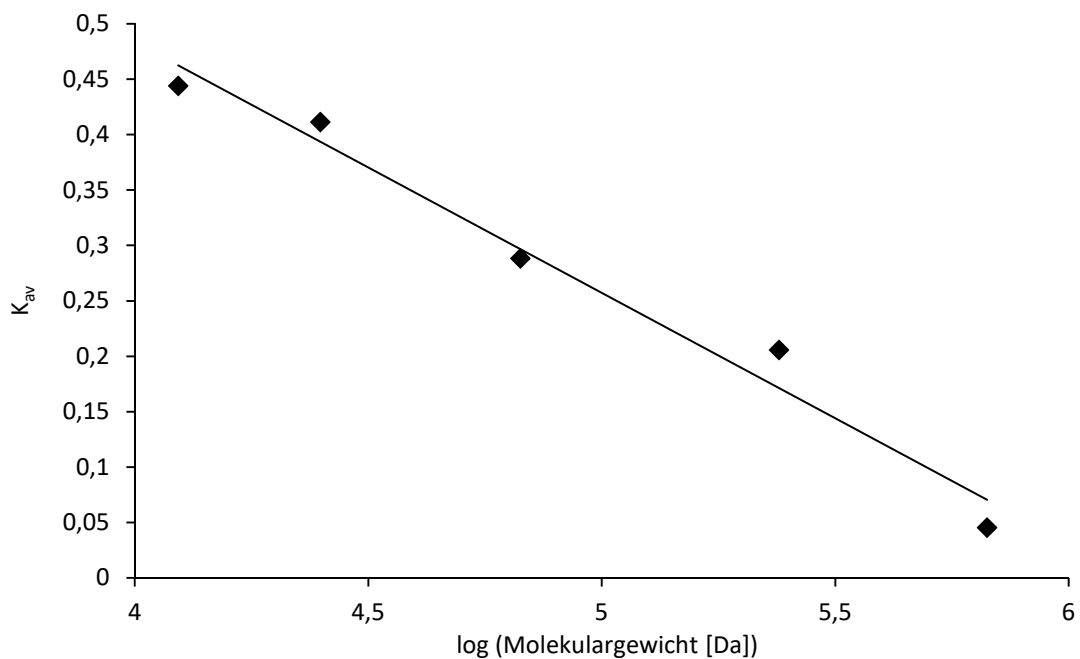


Abb. 2.1: Kalibriergerade der Gelfiltration auf einer ENrich 650-Säule

$$(y = -0,2264x + 1,389; R^2 = 0,9757)$$

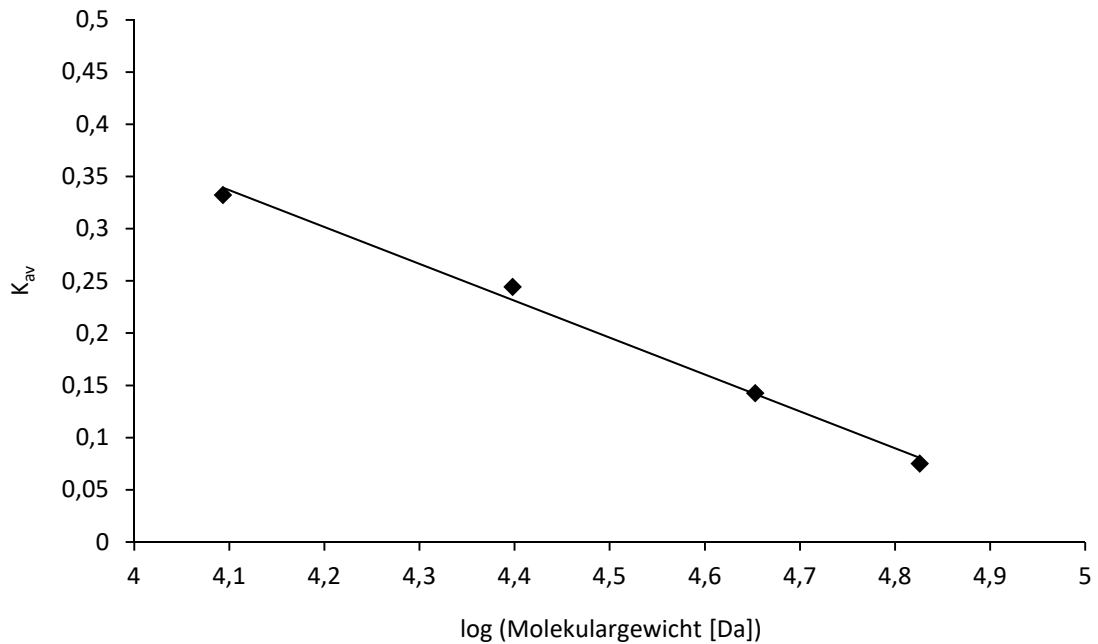


Abb. 2.2: Kalibriergerade der Gelfiltration auf einer Superdex 75-Säule

$$(y = -0,3532x + 1,7852; R^2 = 0,9938)$$

2.11.6 Finale Reinigungsstrategie

Die mehrstufige Reinigung wurde in der nachfolgend beschriebenen Form mit Fruchtkörpern als Ausgangsmaterial durchgeführt:

Nach dem Zellaufschluss (2.11.2) erfolgte die Zentrifugation und Ultrazentrifugation des Homogenats (2.11.3). Anschließend wurde das gesuchte Enzym aus der Mikrosomenfraktion nach 2.11.4 in Lösung gebracht und der Extrakt zur Reinigung mittels FPLC eingesetzt. Zunächst erfolgte eine Reinigung mittels Gelfiltration auf einer Superdex 75-Säule (2.11.5.2) und nachfolgend eine Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie des relevanten Pools (2.11.5.1). Die vereinigten Fraktionen wurden im Aktivitätsassay (2.11.8) eingesetzt und die restliche Lösung für die Proteinanalytik (2.12) verwendet.

2.11.7 Assay des Hydroperoxid-Abbaus (FTC-Assay)

Zur Bestimmung des Abbaus von 10-HPOD durch Enzympräparationen wurde eine modifizierte Form des von Wurzenberger (1986) beschriebenen Eisen(III)-Thiocyanat-Tests verwendet. Die Aktivität wurde anhand der Extinktionsdifferenz zwischen der Negativkontrolle mit inaktivierter Enzympräparation und der Umsetzung beurteilt.

Als Proben dienten entweder die entsprechenden Ansätze aus 2.11.8 oder analog angesetzte Proben mit 10-HPOD als Substrat (s. u.). Dazu wurde eine definierte

Menge 10-HPOD in P/D (1:1,12; v/v) gelöst und Aliquote der Lösung in 20-mL-Headspace-Vials gegeben. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt. Die Proben enthielten typischerweise etwa 150 µg 10-HPOD (~0,5 µmol). Für die Negativkontrollen wurden die Enzympräparationen durch Abkochen (mind. 30 min, 100 °C) inaktiviert.

Nach Zusatz der Enzympräparation bzw. der inaktivierten Enzympräparation und des Puffers wurde das Glas verschlossen und die Proben im Schüttler bei 150 U min⁻¹ und 24 °C inkubiert.

Zusammensetzung der Ansätze:

Umsetzung:

Enzympräparation	1-4 mL
Puffer *	ad 5 mL
10-HPOD	~150 µg

Negativkontrolle:

Inaktivierte Enzympräparation	1-4 mL
Puffer *	ad 5 mL
10-HPOD	~150 µg

* Verwendet wurde der Puffer der jeweiligen Präparation oder Phosphatpuffer mit Zusatz von Tween[®] 20 (50 mM, pH 6,5; 4,6 mg Tween 20[®] auf 100 mL).

Die Inkubation wurde durch den Zusatz von 5 mL Methanol terminiert. Anschließend wurden 500 µL der gut durchmischten Probe sowie die folgenden Reagenzien für die Farbreaktion in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben.

Pipettierschema:

Probe	0,50 mL
Methanol	0,95 mL
Salzsäure (18,5%)	0,05 mL
Eisen(II)-sulfat-Lösung (0,36% in 3,6% HCl)	0,05 mL
Kaliumthiocyanat-Lösung (20%)	0,25 mL
Gesamtvolumen	1,80 mL

Nach dem Zusatz der Kaliumthiocyanat-Lösung wurde gut gemischt und 250 μL in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach 1 min Durchmischen durch den Reader wurde die Extinktion bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ gemessen.

Der Assay wurde im Konzentrationsbereich von 0 – 33 μg 10-HPOD mL^{-1} Probelösung kalibriert (Abb. 2.3).

Ein Einfluss des Abkochens der Enzympräparation für die Negativkontrollen auf die Messung wurde ausgeschlossen, indem die Extinktion eines Ansatzes bestehend aus Puffer und Enzympräparation mit der Extinktion eines Ansatzes mit Puffer und inaktivierter Enzympräparation exemplarisch verglichen wurde.

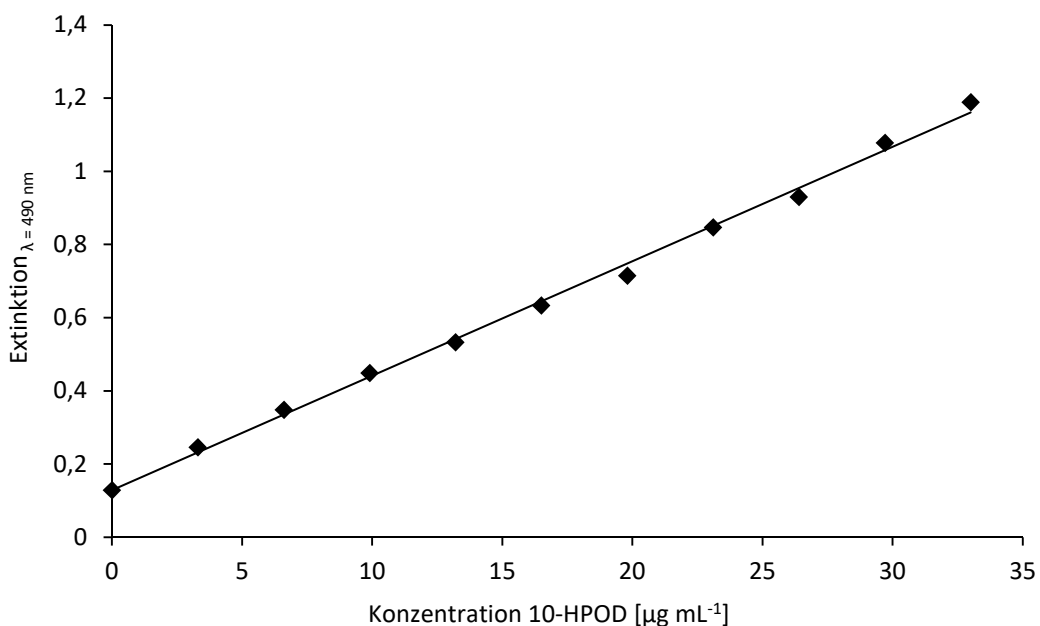


Abb. 2.3: Kalibriergerade des FTC-Assays ($y = 0,0313x + 0,1285$; $R^2 = 0,9969$)

2.11.8 Assay der Hydroperoxidlyase-Aktivität

Zur Bestimmung der Hydroperoxidlyase-Aktivität von Enzympräparationen wurde die Bildung von Oct-1-en-3-ol aus dem Substrat 10-HPOD sowie das Enantiomerenverhältnis des Oct-1-en-3-ols bestimmt.

Eine definierte Menge 10-HPOD wurde, ggf. nach erneuter präp. HPLC zur Entfernung von Zerfallsprodukten (2.9.2), in P/D gelöst und Aliquote der Lösung in ausgeglühte 20-mL-Headspace-Vials gegeben. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und die Vials mit einer Schraubkappe verschlossen. Die Headspace-Vials enthielten typischerweise etwa 150 μg 10-HPOD ($\sim 0,5 \mu\text{mol}$).

Für die Negativkontrollen wurden die Enzympräparationen durch Abkochen (mind. 30 min, 100 °C) inaktiviert.

Abhängig von der untersuchten Enzympräparation wurde neben der Umsetzung von 10-HPOD sowie einer Negativkontrolle mit inaktivierter Enzympräparation ggf. auch ein Grundgehalt der Enzympräparation an Oct-1-en-3-ol bestimmt.

Zusammensetzung der Ansätze:

Umsetzung:

Enzympräparation	0,5-5 mL
Puffer *	ad 5 mL
10-HPOD	~150 µg

Negativkontrolle:

Inaktivierte Enzympräparation	0,5-5 mL
Puffer *	ad 5 mL
10-HPOD	~150 µg

Grundgehalt:

Enzympräparation	0,5-5 mL
Puffer *	ad 5 mL
10-HPOD	kein

* Verwendet wurde der Puffer der jeweiligen Präparation oder Phosphatpuffer mit Zusatz von Tween[®] 20 (50 mM, pH 6,5; 4,6 mg Tween[®] 20 auf 100 mL).

Die Ansätze wurden nacheinander pipettiert, ein Magnetrührstäbchen zugesetzt und verschlossen. Die Probe wurde auf dem Magnetrührer (Stufe 2) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die manuelle HS-SPME im Wasserbad auf dem Magnetrührer nach Tab. 2.22.

Tab. 2.22: Parameter der HS-SPME zur Messung von Oct-1-en-3-ol

Temperieren	40 °C, 5 min
Durchmischung	Stufe 2 (Magnetrührer)
Extraktion	40 °C, 30 min (Wasserbad) DVB/PDMS-Faser (85 µm Schichtdicke, 1 cm Länge, Supelco), 1,8 cm Eindringtiefe
Desorption	S/SL-Injektor des GC, 220 °C, 3 min, 3,6 cm Eindringtiefe

Die Analyse erfolgte nach den in 2.8.6 beschriebenen Methoden mittels enantio-GC.

2.12 Proteinanalytik

2.12.1 Konzentrierung

Sofern die Proteinmenge nach der Elektrophorese der Proben zu gering für eine Färbung mittels kolloidalem Coomassie war und kein größeres Volumen eingesetzt werden konnte, wurden die Proteine mit 10%-iger Trichloressigsäure (TCA) in Ethanol gefällt und direkt in Probenauftragspuffer aufgenommen, um eine Konzentrierung zu erzielen. Etwa 1 mL Probe wurden dazu mit 9 mL TCA (10% in Ethanol) versetzt und anschließend 30 min gerührt. Die Lösung wurde zentrifugiert (18.000 x g, 10 min) und über Nacht stehen gelassen. Dann wurde erneut zentrifugiert (18.000 x g, 15 min) und der Überstand vorsichtig vom Präzipitat abgenommen. Das Präzipitat wurde mit 500 µL Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Waschlösung wurde abgenommen und das Präzipitat im Stickstoffstrom getrocknet.

2.12.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) im Mini PROTEAN[®] Tetracell-System (Bio-Rad; Spannungsquelle: EV262, peqlab, Erlangen) und mit den nachfolgenden Puffern, Reagenzien und Gelen (Tab. 2.23) durchgeführt.

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung):

Ammoniumperoxodisulfat 400 g L⁻¹

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lower Tris-Puffer:

Tris 181,7 g L⁻¹

SDS 4,0 g L⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 8,8 eingestellt.

Upper Tris-Puffer:

Tris 60,55 g L⁻¹

SDS 4,0 g L⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 6,8 eingestellt.

Dithiothreitol-Lösung:

Dithiothreitol 154,25 g L⁻¹

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

10x-Laufpuffer:

Glycin 144,2 g L⁻¹

Tris 30,3 g L⁻¹

SDS 10,0 g L⁻¹

Der Laufpuffer wurde vor Verwendung mit Reinstwasser auf 1-fache Stärke verdünnt.

Probenauftragspuffer (denaturierend):

1 M Tris-HCl, pH 6,8 1,0 mL

SDS-Lösung (20%, w/v) 2,0 mL

Bromphenolblau 20 mg

Glycerol 2,2 mL

Reinstwasser ad 8 mL

Tab. 2.23: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen für die SDS-PAGE

	Sammelgel (6%)	Trenngel (12%)
Reinstwasser	1,8 mL	2,7 mL
Lower Tris-Puffer		1,5 mL
Upper Tris-Puffer	750 µL	
Rotiphorese-Gel 40 (37,5 : 1)	450 µL	1,8 mL
APS-Lösung	10 µL	15 µL
TEMED	4 µL	7,5 µL

Probenvorbereitung

Typischerweise wurden 30 µL der Probe mit 15 µL Probenauftragspuffer in einem Eppendorf-Cap zusammengegeben und 3 min bei 95 °C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurden 5 µL Dithiothreitol-Lösung hinzugefügt und gevortext.

Abhängig von der Proteinkonzentration wurden typischerweise 30 µL der Lösung in die Tasche des Gels geladen.

Eine Tasche des Gels wurde stets mit einem Marker (PageRuler Unstained Protein Ladder, Fisher Scientific) beladen, um die molekulare Masse der analysierten Proteine abschätzen zu können. Der Marker diente gleichzeitig als Kontrolle der Färbung.

Elektrophorese

Die Kammer wurde mit Laufpuffer (1 x) gefüllt, sodass die Geltaschen mit Puffer überschichtet waren. Nach Beladen des Gels wurde zur Fokussierung der Proteine an der Grenze von Sammel- und Trenngel eine Stromstärke von 10 mA (pro Gel) angelegt. Danach wurde die Stromstärke auf 20 mA (je Gel) gesteigert. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenauftragspuffers aus dem Gel lief.

2.12.3 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie erfolgte nach Kang *et al.* (2002).

Färbelösung:

Coomassie Blue G 250	1 g
Ethanol	100 mL
Aluminiumsulfat-Hydrat (14-18 H ₂ O)	50 g
Phosphorsäure (85%)	23,5 mL
Reinstwasser	ad 1 L

Die Lösung wurde durch Lösen in der angegebenen Reihenfolge und Rühren über Nacht hergestellt. Anschließend wurde filtriert und dunkel gelagert.

Das gewaschene Gel (2.12.2) wurde mit der Färbelösung überschichtet und unter Schütteln mindestens 30 min gefärbt. Typischerweise wurden erste Banden des Markers nach ca. 15 min sichtbar und das Gel nach Bedarf weiter gefärbt.

Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel mehrfach mit Wasser unter Schütteln gewaschen.

Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel eingescannt.

2.12.4 Bestimmung des Molekulargewichts

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte anhand des Proteinstandards (PageRuler Unstained Protein Ladder, vgl. 2.12.2). Die Logarithmen der Molekulargewichte der Proteine wurden gegen die Laufstrecke aufgetragen und durch lineare Regression eine Kalibriergerade erhalten. Das Molekulargewicht des analysierten Proteins wurde mit Hilfe der Kalibriergeraden berechnet.

2.12.5 Sequenzierung

Zur weiteren Untersuchung wurden zwei mit kolloidalem Coomassie angefärbte Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Diese wurden zum einen zur Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach tryptischem Verdau und zum anderen zur *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS verwendet. Die Proteinidentifizierung erfolgte durch Prof. Dr. G. Lochnit im Institut für Biochemie (Fachbereich Medizin, JLU Gießen) und die *de novo*-Sequenzierung (ESI-MS/MS bzw. HPLC-ESI-MS/MS) wurde von Dr. M. Nimitz im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) durchgeführt.

2.13 Entsorgung

2.13.1 Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen

Feste wie auch flüssige S1-Abfälle wurden für 40 min bei 120 °C autoklaviert. Die festen Abfälle wurden über den Laborabfall entsorgt. Autoklavierte Kulturen wurden filtriert und in das Laborabwasser gegeben und die festen Bestandteile in den Laborabfall gegeben.

2.13.2 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Die zu entsorgende Menge an Lösungsmitteln wurde durch weitgehende Wiederverwendung nach destillativer Aufarbeitung soweit möglich verringert. Nicht weiter verwendbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel

Die Chemikalien- und Lösungsmittelabfälle wurden der zentralen Entsorgungseinrichtung der Justus-Liebig-Universität Gießen zugeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Biotechnologische Produktion von Aromaextrakten

Die Produktion von Aromaextrakten mit der Geruchsrichtung „pilzig“ erfolgte durch Aufschluss von submers kultiviertem Myzel, um die enzymatische Bildung der C₈-Aromastoffe zu initiieren.

Die Kultivierung von *L. edodes* erfolgte in einem zweistufigen Prozess. Die Vorkultur (2.5.5) diente dabei zur Erzeugung von homogen wachsendem Myzel für die Inokulation der Hauptkulturmedien. Die Hauptkultur (2.5.6) diente zur Produktion von Myzel, welches für die Bildung von C₈-Aromastoffen in den nachfolgenden Experimenten (2.6) verwendet wurde.

3.1.1 Optimierung der Kultivierung

Das Hauptkulturmedium wurde schrittweise optimiert, um die an der Aromabildung beteiligten Enzyme zu induzieren, und vereinfacht, um Kosten einzusparen. Die Beurteilung der Medien erfolgte einerseits über die Ausbeuten an Oct-1-en-3-ol, die zunächst in Experimenten ohne Zusatz von Linolsäure zum Transformationsansatz (2.6.1) ermittelt wurden. Andererseits wurde das Wachstum des Pilzes über den Parameter Trockenmasse (2.5.8) bewertet.

Als Ausgangspunkte für die Optimierung des Mediums wurden dabei ein in der Literatur beschriebenes Medium (III, „Belinky-Medium“, 2.5.2.3) sowie als Vergleich dazu ein einfaches Malzextrakt-Medium (I, 2.5.2.1) gewählt.

Das Wachstum in Medium I war bei einer Kulturdauer von 10 d sehr gering und die Bildung von Oct-1-en-3-ol fiel mit ca. 300 µg g⁻¹ TM mäßig aus (Tab. 3.1). Der Zusatz von Sojaöl zum Medium (II, 2.5.2.2) bewirkte eine Steigerung der Biomasseproduktion sowie eine leichte Steigerung der Gehalte an Oct-1-en-3-ol.

Bei Verwendung des von Belinky *et al.* (1994) beschriebenen Mediums (III) wurden höhere Oct-1-en-3-ol-Mengen von im Mittel etwa 500 µg g⁻¹ TM bestimmt. Die ermittelte Trockenmasse betrug etwa 6 g L⁻¹. Bei der Ernte des Myzels fiel auf, dass die Myzel-Pellets feste Bestandteile des Mediums enthielten. Das Sojamehl löste sich nicht vollständig im Medium und diese Partikel wurden vom Pilz überwachsen. Diese Beobachtung wurde ebenfalls bei den Medien IV – VI (2.5.2.4 – 2.5.2.6) sowie in geringerem Maße bei Medium VII (halbe Menge an Sojamehl, 2.5.2.7) gemacht.

Der Zusatz von Tween[®] 80 (Medium V, 2.5.2.5) bewirkte eine leicht erhöhte Trockenmasse, jedoch auch eine verringerte Bildung von Oct-1-en-3-ol. Wurde auf das Sojaöl verzichtet und der Emulgator eingesetzt (Medium IV, 2.5.2.4), fiel die Trockenmasse niedriger aus und die Bildung von Oct-1-en-3-ol war sehr gering ($< 100 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TM}$).

Der Citratpuffer erwies sich sowohl für die Biomasseproduktion als auch die Bildung von Oct-1-en-3-ol als verzichtbar (Medium VI, 2.5.2.6); entsprechend wurde er auch in den folgenden Medien weggelassen.

Anschließend wurde die Menge an Sojamehl zunächst halbiert (Medium VII, 2.5.2.7) und später komplett darauf verzichtet (Medium VIII, 2.5.2.8, und folgende Medien). Dies hatte einen moderaten Rückgang der Trockenmasse im Vergleich zur Kultivierung in Medium VI zur Folge. Die Bildung von Oct-1-en-3-ol durch das Myzel war vergleichbar hoch (Medium VIII) bzw. etwas höher (Medium VII) als bei der Kultivierung in Medium VI.

Eine Verkürzung der Kulturdauer um 2 d unter Verwendung von Medium VIII ergab zwar eine geringfügig niedrigere Biomasseproduktion, aber auch eine deutliche Steigerung der Konzentration an Oct-1-en-3-ol auf über $900 \mu\text{g g}^{-1} \text{ TM}$ im Mittel.

Der Verzicht auf *corn steep liquor* als Medienbestandteil (Medium IX, 2.5.2.9) ergab ein deutlich geringeres Wachstum bei weiterhin hohen Ausbeuten an Oct-1-en-3-ol.

Ein Zusatz von Tween[®] 80 (Medium X, 2.5.2.10) führte im Vergleich zum Medium ohne Zusatz (VIII) zwar zu einer höheren Trockenmasse, jedoch gleichzeitig auch zu einer Halbierung der Gehalte an Oct-1-en-3-ol.

Das Hinzufügen von Glucose (Medium XI, 2.5.2.11) bewirkte nur eine geringe Steigerung der Biomasse, aber ebenso eine Verringerung der Oct-1-en-3-ol-Gehalte.

Insgesamt erwiesen sich Medium VIII und eine Kulturdauer von 8 d als am besten geeignet.

Tab. 3.1: Wachstum von *L. edodes* in verschiedenen Medien und Bildung von Oct-1-en-3-ol. (Angegeben sind die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen sowie bei mehreren Wiederholungen in Klammern die Mittelwerte der unabhängigen Experimente.)

Medium	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	VIII	IX	X	XI
Kulturdauer [d]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8
Trockenmasse [g L ⁻¹]	1,1	2,9	5,9 (4,9-6,8)	4,3	6,8	4,9	4,2	3,7	3,1 (2,4-4,0)	1,8	4,3 (4,1-4,8)	3,5 (2,5-4,5)
Oct-1-en-3-ol [µg g ⁻¹ TM]	305	416	515 (365-644)	90	279	470	882	546	938 (650-1.531)	976	400 (296-500)	772 (590-953)

3.1.2 Optimierung der Bildung von Oct-1-en-3-ol

Parallel zur Optimierung der Kultivierung (3.1.1) wurden verschiedene Experimente zur Verbesserung des Prozesses zur Bildung der C₈-Aromastoffe durchgeführt. In diesen wurde u. a. durch den Zusatz von Linolsäure zum Transformationsansatz der Einfluss der Verfügbarkeit des *precursors* auf die Bildung von Oct-1-en-3-ol ermittelt sowie unterschiedliche Techniken zum Zellaufschluss untersucht.

3.1.2.1 Verwendung von Lyophilisat

Myzel, das in Medium III gewachsen war, wurde gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde eingesetzt, um zu klären, ob lyophilisiertes Myzel zur Bildung von C₈-Aromastoffen geeignet ist (2.6.4). Die Gehalte an Oct-1-en-3-ol fielen dabei mit durchweg $< 50 \mu\text{g g}^{-1}$ TM sehr niedrig aus. Weder die 10-minütige Phase zum Rehydratisieren (Variante B) noch der Zusatz von Linolsäure hatten einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis (Abb. 3.1).

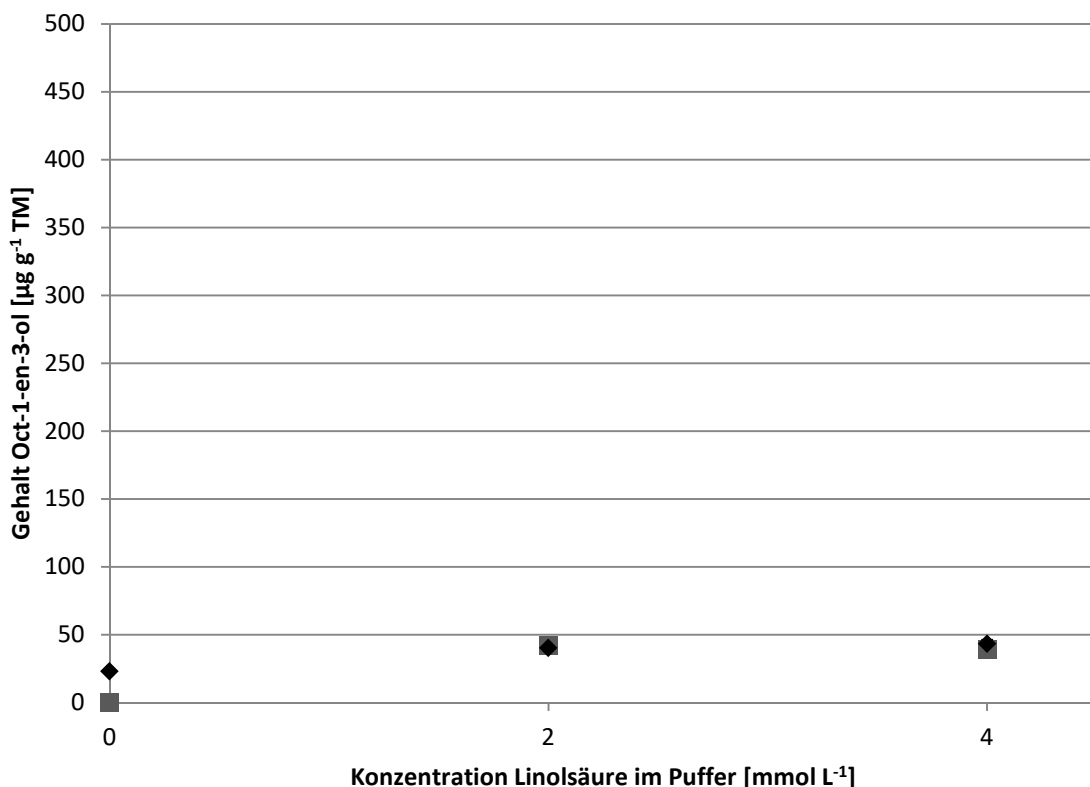


Abb. 3.1 Bildung von Oct-1-en-3-ol durch Lyophilisat in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Linolsäure und Rehydratisieren des Lyophilisats (■ Variante A ◆ Variante B, s. 2.6.4)

3.1.2.2 Einfluss des Zellaufschlusses

Der Einfluss der Zellaufschlusstechnik auf die Bildung von C_8 -Aromastoffen wurde anhand der Verwendung von Ultraturrax (2.6.1) und Rührwerkskugelmühle (2.6.3) verglichen. Hierzu wurde frisches Myzel, welches in Medium III (2.5.2.3) gewachsen war, eingesetzt.

Die Gehalte an Oct-1-en-3-ol lagen abhängig von der zugesetzten Menge an Linolsäure zwischen etwa $500 \mu\text{g g}^{-1}$ TM und knapp $1.200 \mu\text{g g}^{-1}$ TM (Abb. 3.2). Mit Ausnahme der Transformationsansätze mit 4 mM Linolsäure im Puffer wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aufschlusstechniken festgestellt. Bei den Ansätzen mit 4 mM Linolsäure-Zusatz im Puffer lagen die mittels Turrax-Aufschluss erzielten Gehalte etwa 30% höher als die Gehalte nach Aufschluss mit der Rührwerkskugelmühle.

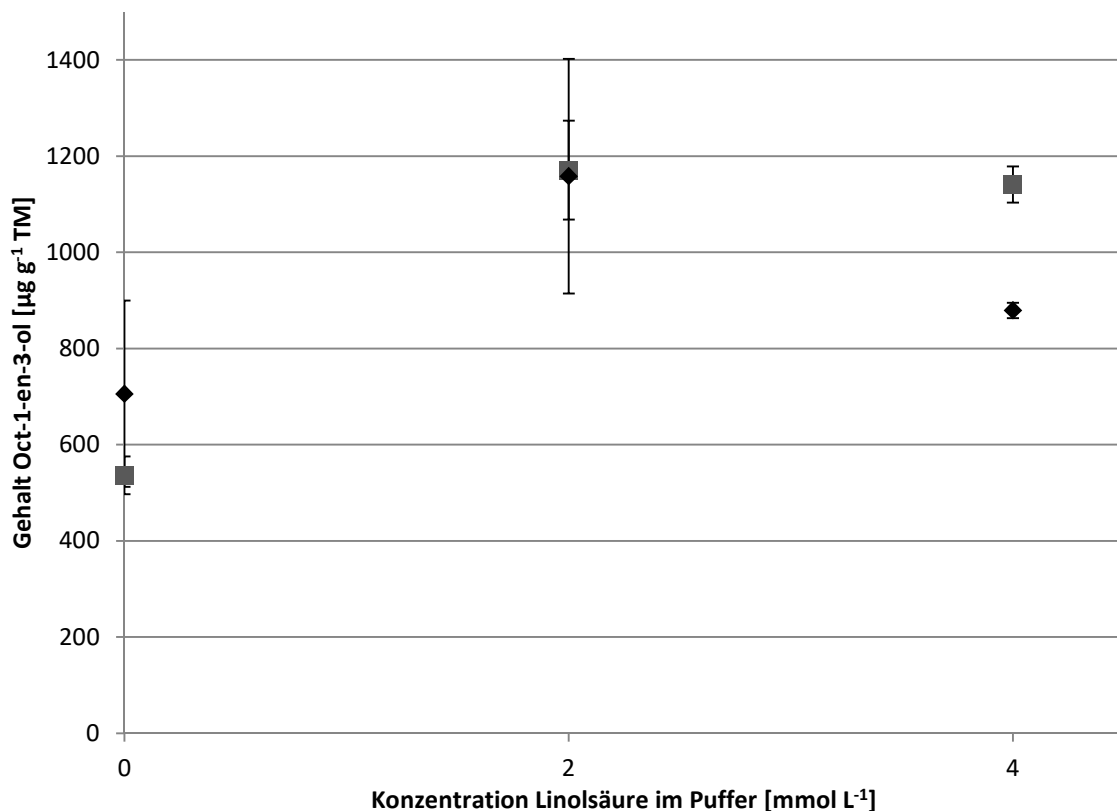


Abb. 3.2: Bildung von Oct-1-en-3-ol durch Myzel in Abhängigkeit von der Aufschlusstechnik (■ Turrax ◆ Rührwerkskugelmühle) und der zugesetzten Menge Linolsäure

3.1.2.3 Einsatz von Proteaseinhibitoren

Der Effekt des Einsatzes von Proteaseinhibitoren wurde an Myzel, welches in Medium VIII (2.5.2.8) kultiviert wurde, mit einem Linolsäurezusatz von 2 mM zum Transformationspuffer untersucht (2.6.2). Als Vergleich dienten Ansätze ohne Inhibitor mit unterschiedlichen Mengen an Linolsäure nach 2.6.1.

In den Ansätzen ohne Inhibitor wurden Gehalte zwischen 650 $\mu\text{g Oct-1-en-3-ol g}^{-1}$ TM (ohne Zusatz von Linolsäure) und etwa 3.100 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM gemessen (mit 2 bzw. 4 mM Linolsäure im Puffer; Abb. 3.3).

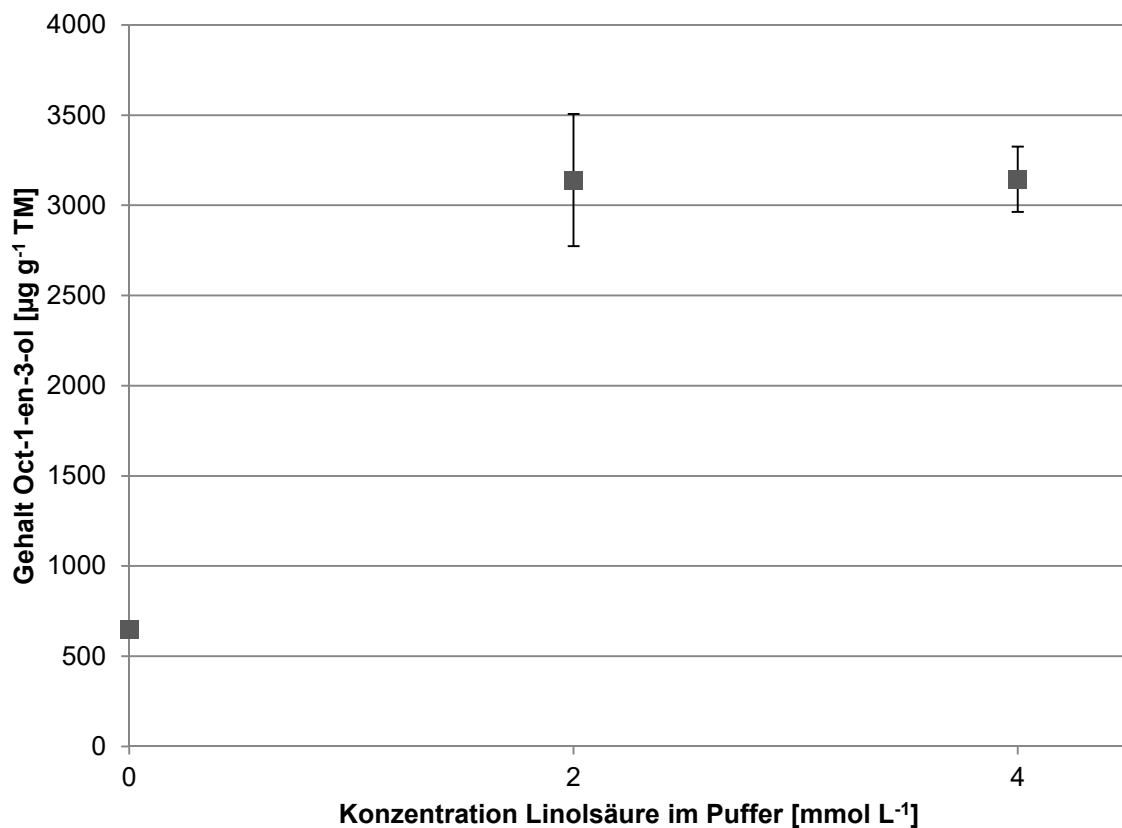


Abb. 3.3: Bildung von Oct-1-en-3-ol durch Myzel in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Linolsäure

Im Vergleich der Ansätze ohne und mit Einsatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails nach 2.6.2 wurden keine Unterschiede bezüglich der Gehalte an Oct-1-en-3-ol festgestellt (Abb. 3.4). Jedoch bewirkte die 15-minütige Inkubation der Transformationsansätze eine massive Steigerung der Gehalte auf über 4.300 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM. Die Gehalte lagen damit über denen in den Ansätzen mit mehr Linolsäurezusatz.

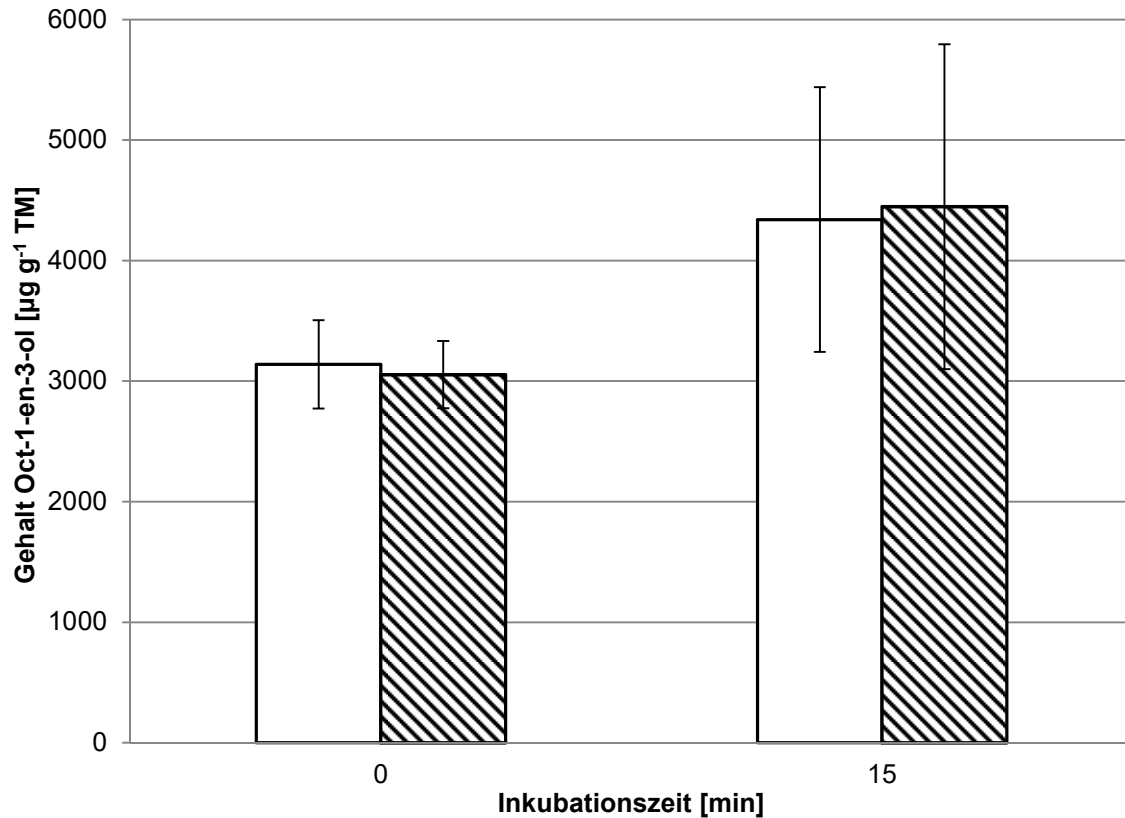


Abb. 3.4: Bildung von Oct-1-en-3-ol in Abhängigkeit des Einsatzes von Proteaseinhibitoren und der Inkubationszeit bei einem Linolsäurezusatz von 2 mM im Transformationspuffer (weiß: ohne Inhibitoren, schraffiert: mit Proteaseinhibitoren)

3.1.2.4 Einfluss der Inkubationszeit

Der Einfluss einer Inkubation der Homogenate nach dem Aufschluss wurde an Myzel, welches 8 d in Medium VIII (2.5.2.8) gewachsen war, nach 2.6.1 untersucht. In den Ansätzen ohne Zusatz von Linolsäure lagen die Gehalte an Oct-1-en-3-ol unabhängig von der Inkubationszeit um $1.500 \mu\text{g g}^{-1}$ TM (Abb. 3.5). Bei Zusatz von 2 mM Linolsäure zum Transformationspuffer war ebenfalls kein Effekt durch die Inkubation festzustellen. Die Gehalte betragen zwischen ca. 4.000 und etwa $4.700 \mu\text{g g}^{-1}$ TM. Die Inkubation der Homogenate bewirkte jedoch bei einem Linolsäurezusatz von 4 mM im Puffer eine signifikante Steigerung der Ausbeuten. Ohne Inkubation (0 min) betragen die Gehalte an Oct-1-en-3-ol im Mittel $4.500 \mu\text{g g}^{-1}$ TM und waren damit vergleichbar mit den Ansätzen mit Zusatz von 2 mM Linolsäure. Bereits eine 15-minütige Inkubation steigerte die Gehalte um 30% auf etwa $5.900 \mu\text{g g}^{-1}$ TM. Die höchsten Gehalte wurden mit $6.200 \mu\text{g Oct-1-en-3-ol g}^{-1}$ TM nach 30 min Inkubationsdauer erzielt.

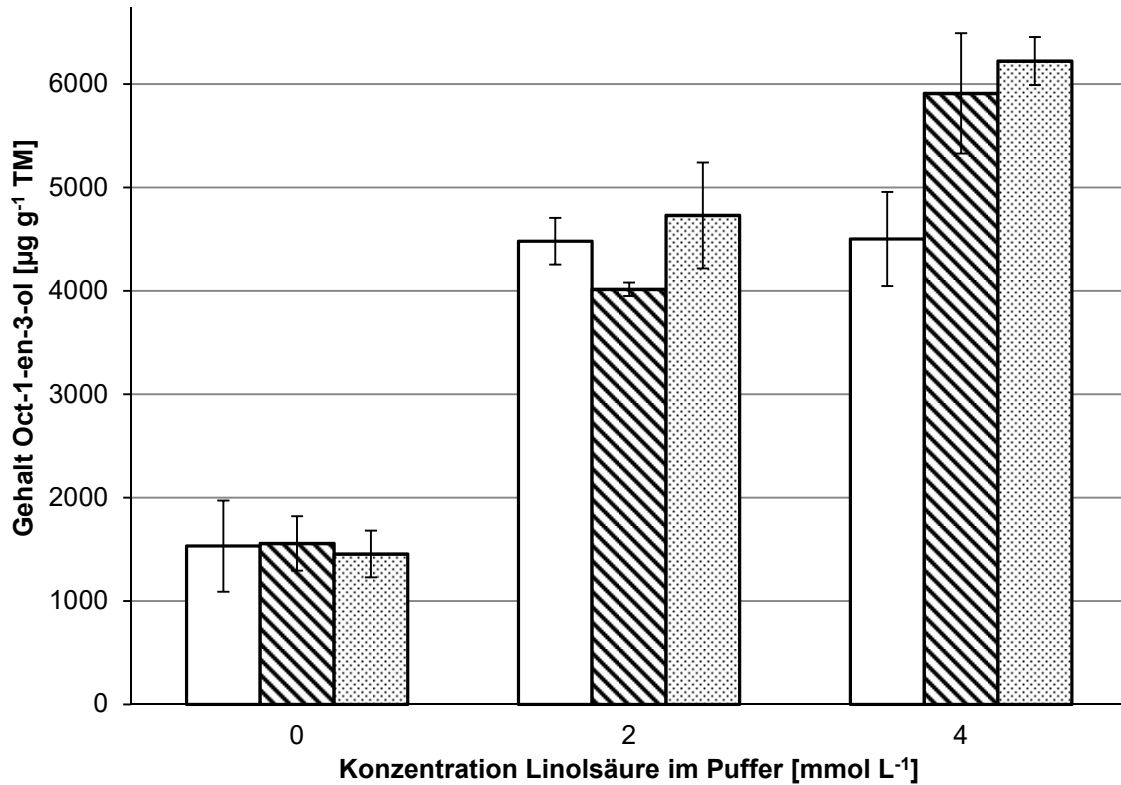


Abb. 3.5: Bildung von Oct-1-en-3-ol in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Linolsäure und der Inkubationszeit (weiß: 0 min, schraffiert: 15 min, gepunktet: 30 min)

Bei Berechnung der Ausbeuten bezogen auf das Volumen der Ansätze ergaben sich Gehalte zwischen etwa 8 und $35 \text{ mg Oct-1-en-3-ol L}^{-1}$ (Abb. 3.6).

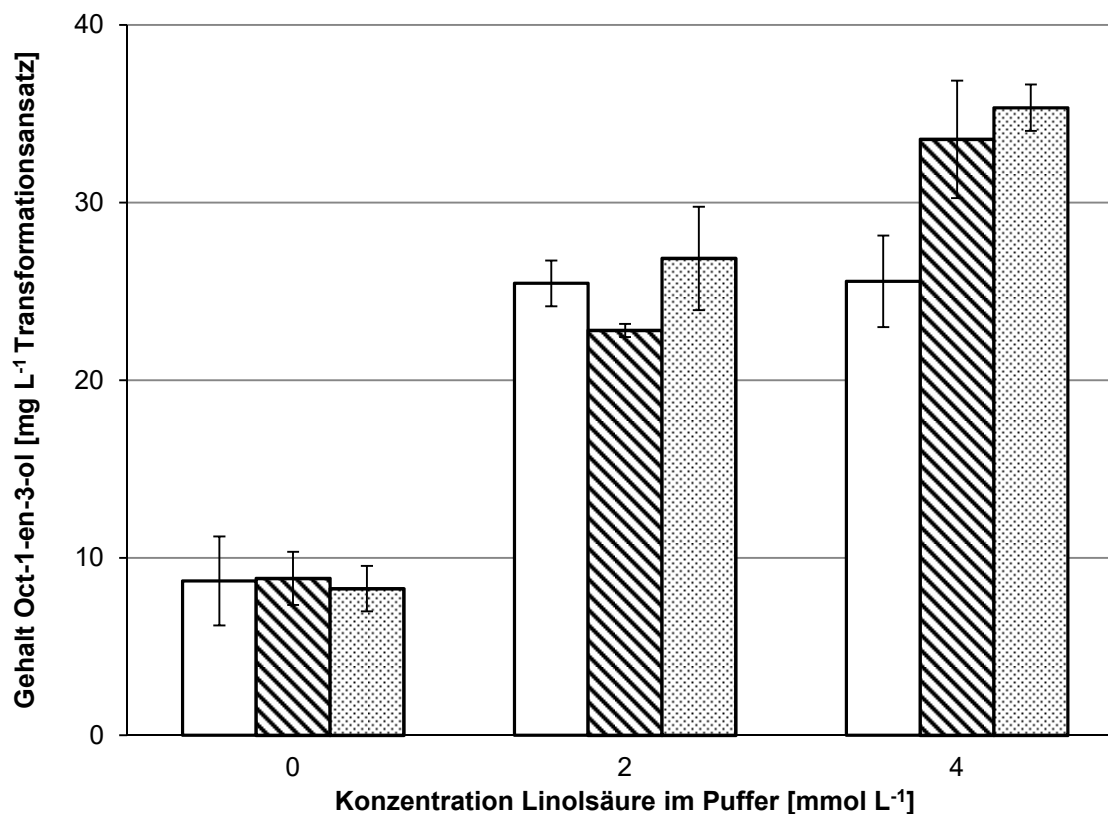


Abb. 3.6: Konzentration an Oct-1-en-3-ol bezogen auf das Transformationsvolumen in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Linolsäure und der Inkubationszeit (weiß: 0 min, schraffiert: 15 min, gepunktet: 30 min)

3.1.3 Enantiomerenverhältnis von Oct-1-en-3-ol

Das Enantiomerenverhältnis des gebildeten Oct-1-en-3-ols (3.1.2.4) wurde mittels enantioselektiver GC bestimmt (2.8.6) und nach 2.8.3 berechnet. Dazu wurde die Trennmethode mit racemischen Oct-1-en-3-ol entwickelt und die Elutionsreihenfolge der Enantiomere anhand von authentischem *R*(-)-Oct-1-en-3-ol bestimmt (Abb. 3.7). In den Proben wurde unabhängig vom Zusatz von Linolsäure und der Inkubationszeit ein hoher Überschuss des *R*(-)-Enantiomers festgestellt (Tab. 3.2, Abb. 3.8). In den Ansätzen ohne Zusatz von Linolsäure war die Menge an *S*(+)-Oct-1-en-3-ol jedoch so gering, dass der Überschuss abgeschätzt wurde.

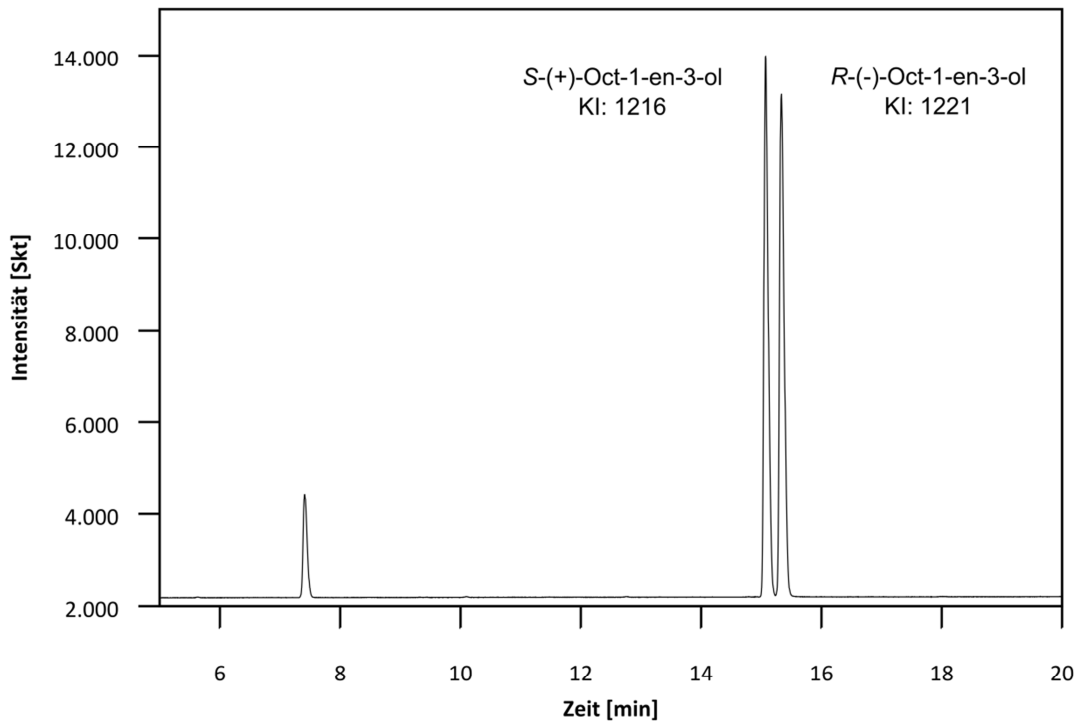


Abb. 3.7: Ausschnitt des Chromatogramms der Trennung von racemischem Oct-1-en-3-ol mittels enantio-GC (2.8.6) und Zuordnung der Enantiomere

Tab. 3.2: Enantiomerenüberschuss (% ee) von Oct-1-en-3-ol in den Extrakten aus Myzel

Probe	% ee [<i>R</i> -(-)-Oct-1-en-3-ol]
Myzel ohne Linolsäurezusatz	> 90 *
Myzel mit Linolsäurezusatz (2 mM)	92,1 – 92,4
Myzel mit Linolsäurezusatz (4 mM)	92,0 – 92,6

* *S*-(+)-Oct-1-en-3-ol nicht bestimmbar

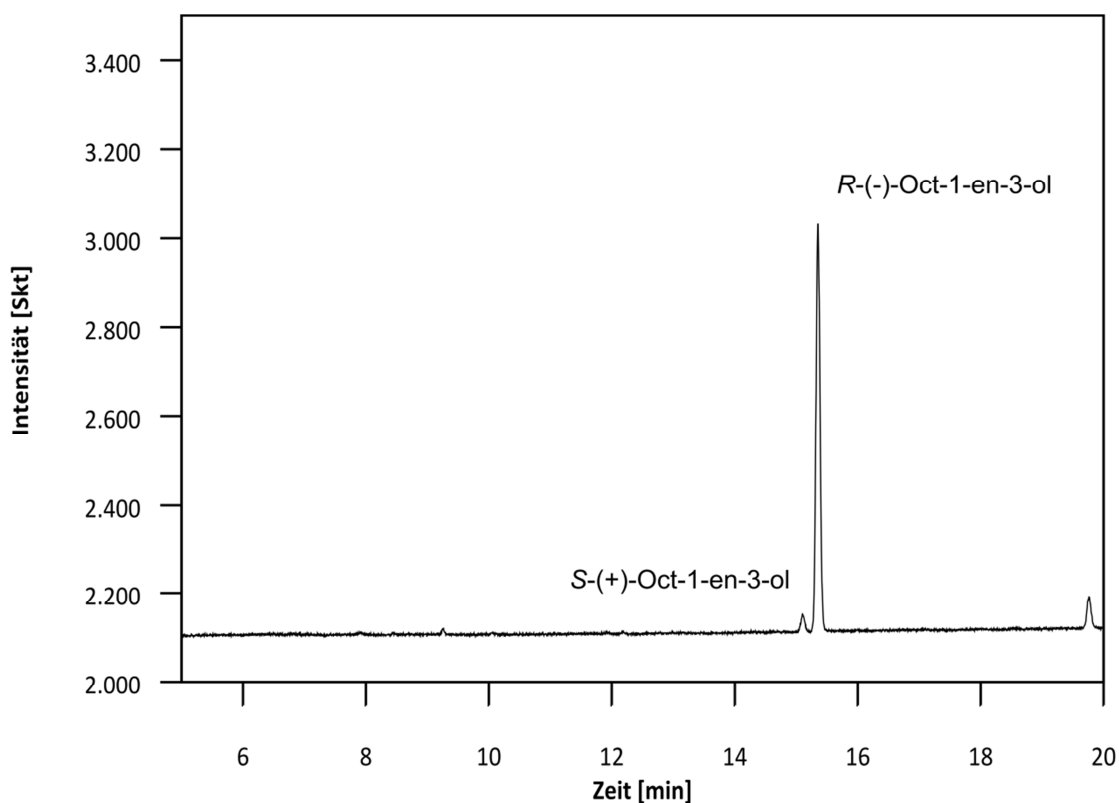


Abb. 3.8: Ausschnitt des Chromatogramms der Trennung von Oct-1-en-3-ol in einem Extrakt von *L. edodes* mit Zusatz von Linolsäure (4 mM)

3.1.4 Vorkommen weiterer C₈-Aromastoffe

Bei der gaschromatographischen Untersuchung der Extrakte von *L. edodes* wurden neben Oct-1-en-3-ol teilweise weitere C₈-Aromastoffe nachgewiesen (Tab. 3.3, Abb. 3.9). Dabei handelte es sich um die Alkohole Octan-1-ol und Oct-2-en-1-ol.

Tab. 3.3: C₈-Aromastoffe in Extrakten von *L. edodes* (KI für polare Trennsäule angegeben)

Substanz	KI Probe	KI Standard	KI Literatur
Oct-1-en-3-ol	1446 – 1460	1460	1447 ¹
Octan-1-ol	1555 – 1564	1553	1557 ²
Oct-2-en-1-ol *	1612 – 1620	1615	1610 ¹

* Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangabe Oct-2(*E*)-en-1-ol, ¹ Fischer und Grosch (1987), ² Valim *et al.* (2003)

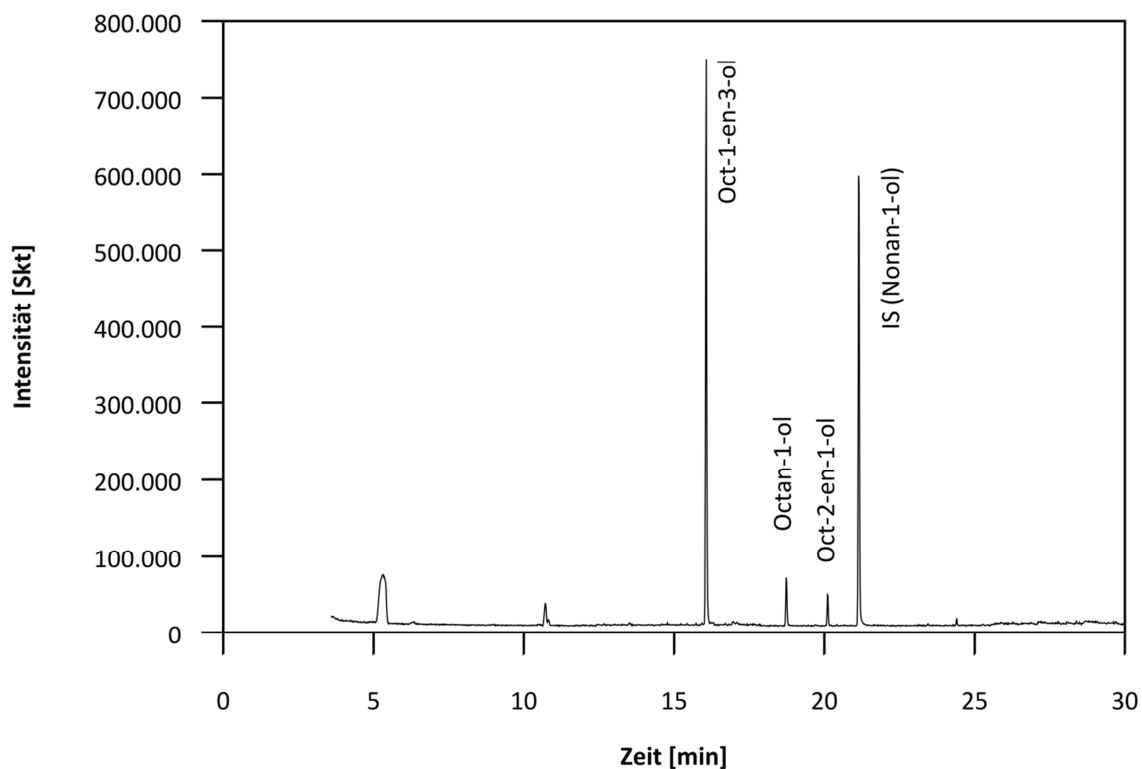


Abb. 3.9: GC-MS-Chromatogramm eines Extrakts von *L. edodes* ohne Zusatz von Linolsäure; markiert sind die C₈-Aromastoffe sowie der interne Standard (IS) Nonan-1-ol

Die Bildung von Oct-2-en-1-ol wurde ebenfalls in Abhängigkeit des Linolsäurezusatzes und der Inkubation der Ansätze (vgl. 3.1.2.4) untersucht und die Gehalte nach 2.8.5 und 2.8.2 bestimmt.

Die Gehalte an Oct-2-en-1-ol lagen zwischen etwa 100 und knapp 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM abhängig von den Transformationsbedingungen (Abb. 3.10). In den Ansätzen ohne Zugabe von Linolsäure lagen sie unabhängig von der Inkubationszeit bei etwa 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM. Bei Zusatz von 2 mM Linolsäure zum Puffer trat ebenso kein deutlicher Einfluss der Inkubationsdauer auf (etwa 300 bis 350 $\mu\text{g Oct-2-en-1-ol g}^{-1}$ TM). Bei einer höheren Linolsäurezugabe jedoch bewirkte die Inkubation von 15 bzw. 30 min eine Steigerung der Gehalte von ca. 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM auf rund 450 und etwa 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM. Diese Trends sind analog zu den für Oct-1-en-3-ol gefundenen (3.1.2.4).

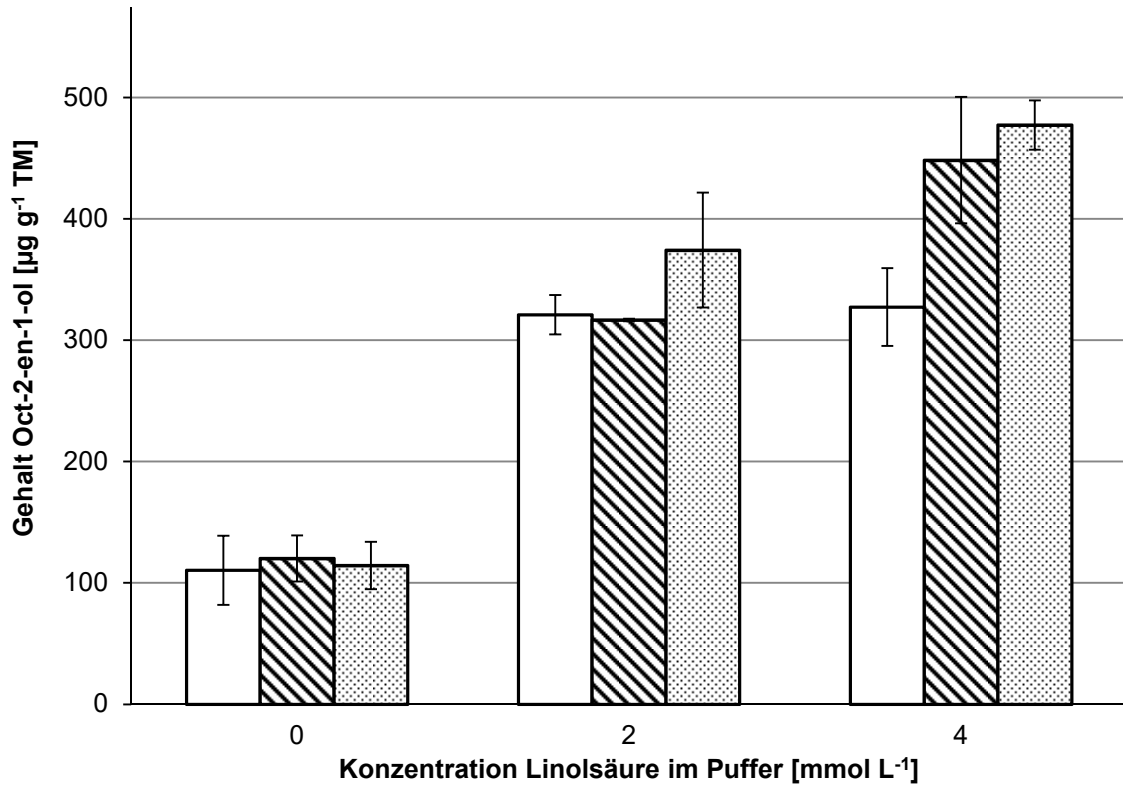


Abb. 3.10: Bildung von Oct-2-en-1-ol in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Linolsäure und der Inkubationszeit (weiß: 0 min, schraffiert: 15 min, gepunktet: 30 min)

3.2 Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von *L. edodes*

Für die Untersuchung des Aromaprofils wurde *L. edodes* wie unter 2.5 beschrieben in Medium VIII (2.5.2.8) 8 d kultiviert. Aus dem geernteten Myzel wurden zum einen unter enzymaktivierenden Bedingungen und zum anderen unter enzyminhibierenden Bedingungen Homogenate hergestellt. Aus diesen Homogenaten wurden mittels Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE, 2.7.1) mit nachfolgender *solvent-assisted flavour evaporation* (SAFE, 2.7.2) sowie mittels Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME, 2.7.4) Aromaextrakte hergestellt. Mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O, 2.8.4) wurden die geruchsaktiven Bestandteile der Aromaextrakte ermittelt und die Substanzen mittels GC-MS (2.8.5) identifiziert.

3.2.1 Extraktion mittels LLE und SAFE

Im flüssigen Aromaextrakt des unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenen Myzels wurden durch GC-O zehn Geruchseindrücke detektiert (Abb. 3.11) und, soweit möglich, einem Peak zugeordnet. Mittels GC-MS-Analyse des Extrakts und Datenbankabgleich der Massenspektren wurden zu sechs dieser Peaks Substanzvorschläge erhalten (Tab. 3.4).

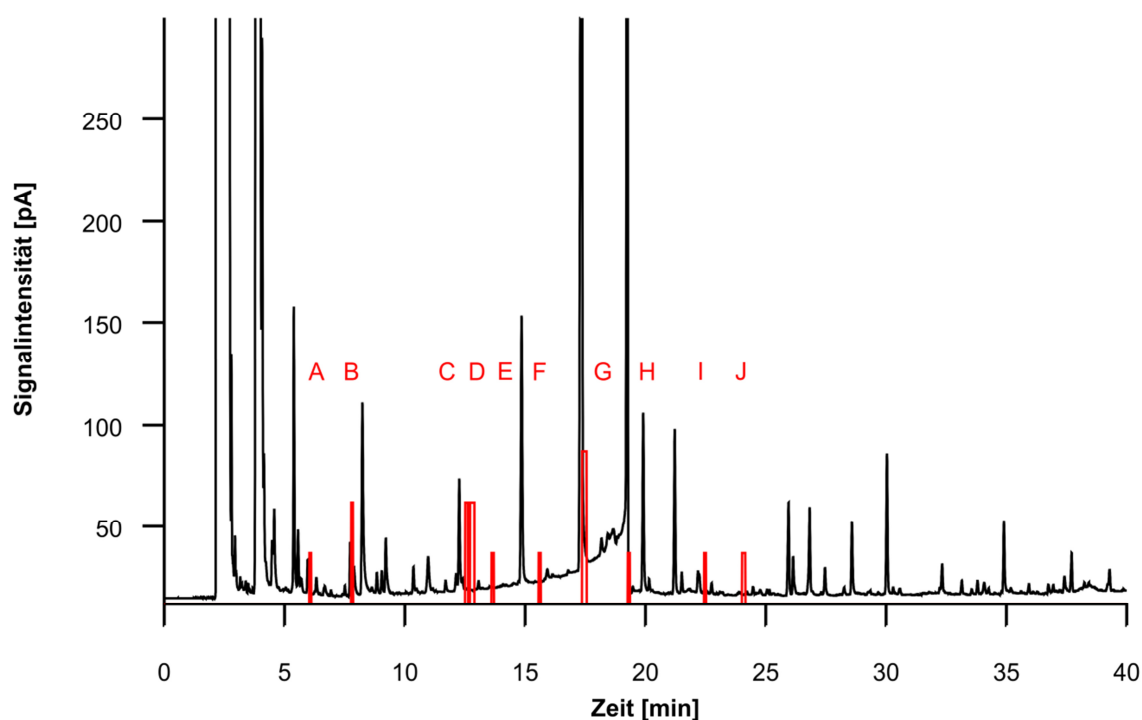


Abb. 3.11: Ausschnitt eines GC-FID-O-Chromatogramms des LLE-Extrakts von unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenen Myzel (rot: ODP-Spur; Zuordnung der Geruchseindrücke s. Tab. 3.4)

Tab. 3.4: Geruchseindrücke im Extrakt des enzymaktivierenden Aufschlusses und Zuordnung zu Substanzvorschlägen

#	Geruchseindruck	KI (GC-FID-O)	KI (GC-MS, polar)	Substanzvorschlag
A	süßlich	986	-	-
B	Gras	1071	1084	Hexanal
C	Knoblauch	1250	1255	Octan-3-on
D	Knoblauch	1255	-	-
E	Pilz	1295	1298	Oct-1-en-3-on
F	muffig	1371	1392	Octan-3-ol
G	Pilz	1447	1452	Oct-1-en-3-ol
H	süßlich, fruchtig	1525	-	-
I	leicht Knoblauch	1655	1658	Nonan-1-ol
J	fettig, muffig, ranzig	1731	-	-

Nachfolgend wurden vier Substanzen durch Abgleich der Kováts-Indices (polare Trennsäule) mit Standards und Literaturwerten sowie durch Vergleich der Geruchseindrücke mit der Literatur vorläufig identifiziert (Tab. 3.5). Bei zwei weiteren Substanzvorschlägen ergaben sich Abweichungen bezüglich der Geruchsqualität. Der Substanzvorschlag Octan-3-on zum Geruchseindruck „C“ (Geruchsqualität: „Knoblauch“) ergab sich als Treffer des Datenbankabgleichs des Massenspektrums. Auch der Abgleich des Retentionsindex mit Standard sowie Literaturdaten bestätigte die Anwesenheit von Octan-3-on, aber der Geruch von Octan-3-on „pilzig, butterig“ (Cho *et al.* 2006) steht nicht mit dem als „Knoblauch“ beschriebenen Geruch in Einklang. Der Geruchseindruck „C“ war demnach nicht zuordenbar. Ebenso ergab sich der Substanzvorschlag Nonan-1-ol zum Geruchseindruck „I“ als Treffer des Datenbankabgleichs des Massenspektrums und zeigte auch beim Abgleich des Retentionsindex mit dem Standard und Literaturdaten eine gute Übereinstimmung. Jedoch stimmt der Geruch von Nonan-1-ol „fettig, grün“ (Jirovetz *et al.* 2002) nicht mit dem als „würzig, leicht Knoblauch“ wahrgenommenen Geruchseindruck überein.

Dem in der Probe wahrgenommenen Geruchseindruck „I“ wurde entsprechend keine Substanz zugeordnet.

Tab. 3.5: Vorläufig identifizierte geruchsaktive Substanzen (KI für GC-MS, polare Trennsäule angegeben)

Substanz	KI Probe	KI Standard	KI Literatur	Geruchseindruck Literatur
Hexanal	1084	1090	1072 ¹	grün ¹
Oct-1-en-3-on	1298	1300	1294 ¹	Pilz, metallisch ²
Octan-3-ol	1392	1388	1391 ¹	pilzig, butterig ³
Oct-1-en-3-ol	1452	1447	1448 ¹	Pilz ¹

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ullrich und Grosch (1987), ³ Cho *et al.* (2006)

Von den vier geruchsaktiven Substanzen wurden drei durch den zusätzlichen Abgleich der Retentionsindices auf unpolarer Trennsäule mit den Retentionsindices von Standards sowie Literaturdaten vollständig identifiziert (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Mittels GC-MS vorläufig und vollständig identifizierte geruchsaktive Substanzen

Substanz	KI polar			KI unpolar		
	Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
Hexanal	1084	1090	1072 ¹	809	802	800 ²
Oct-1-en-3-on	1298	1300	1294 ¹	-	981	979 ²
Octan-3-ol	1392	1388	1391 ¹	999	998	991 ³
Oct-1-en-3-ol	1452	1447	1448 ¹	986	984	982 ²

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ullrich und Grosch (1987), ³ Vardar-Ünlü *et al.* (2003)

Mittels GC-MS wurden weitere Stoffe nachgewiesen, die nicht sensorisch wahrnehmbar waren (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Mittels GC-MS vorläufig und vollständig identifizierte, nicht olfaktorisch detektierte Substanzen

#	Substanz	KI polar			KI unpolar		
		Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
1	Dimethyldisulfid	1074	-	1070 ¹	-	-	-
2	Octan-3-on	1255	1257	1247 ²	989	988	984 ⁹
3	Hexan-1-ol	1354	-	1351 ³	878	-	884 ¹⁰
4	Nonanal	1392	1391	1385 ⁴	1106	1104	1103 ¹⁰
5	Essigsäure	1456	-	1446 ¹	-	-	-
6	Octan-1-ol	1557	1553	1552 ²	1075	1075	1072 ¹¹
7	Oct-2-en-1-ol *	1613	1610	1610 ²	1071	1071	1060 ¹²
8	Buttersäure	1630	1630	1614 ⁵	-	-	-
9	Nonan-1-ol	1658	1659	1663 ⁶	-	-	-
10	2-Phenylethanol	1903	-	1905 ⁷	1113	-	1117 ¹³
11	3-Phenylpropan-1-ol	2038	-	2039 ⁸	1232	-	1232 ¹⁴

* Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangaben Oct-2(*E*)-en-1-ol, ¹ Cho *et al.* (2003), ² Fischer und Grosch (1987), ³ Ruther (2000), ⁴ Schieberle und Grosch (1987), ⁵ Fukami *et al.* (2002), ⁶ Venkateshwarlu *et al.* (1999), ⁷ Ong und Acree (1999), ⁸ Mayorga *et al.* (2001), ⁹ Vardar-Ünlü *et al.* (2003), ¹⁰ Högnadóttir und Rouseff (2003), ¹¹ Choi (2003), ¹² Skaltsa *et al.* (2003), ¹³ Rychlik *et al.* (1998), ¹⁴ Shams-Ardakani *et al.* (2005)

Im Aromaextrakt des unter enzyminhibierenden Bedingungen homogenisierten Myzels wurden drei Geruchseindrücke mittels gaschromatographisch-olfaktometrischer Untersuchung wahrgenommen (Abb. 3.12) und, soweit möglich, einem Peak zugeordnet. Durch GC-MS und Datenbankabgleich der Massenspektren wurde zu einem Peak der Substanzvorschlag Hexanal zugeordnet (Tab. 3.8).

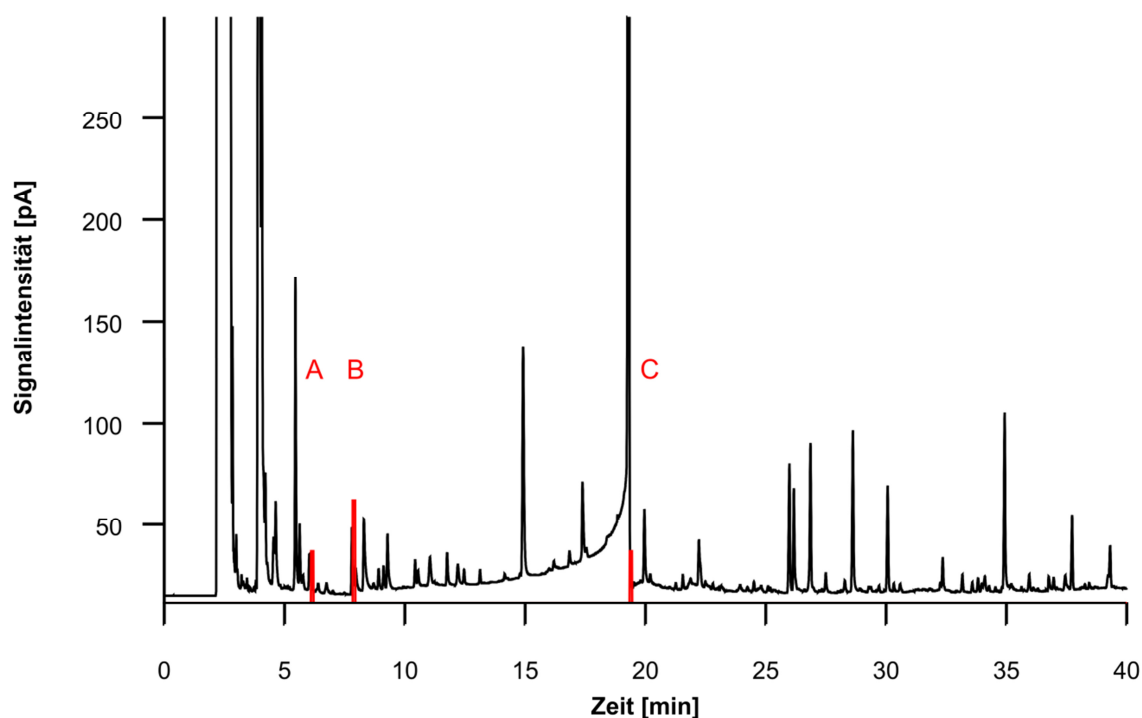


Abb. 3.12: Ausschnitt eines GC-FID-O-Chromatogramms des LLE-Extrakts von unter enzyminhibierenden Bedingungen aufgeschlossenem Myzel (rot: ODP-Spur; Zuordnung der Geruchseindrücke s. Tab. 3.8)

Tab. 3.8: Geruchseindrücke im Extrakt des enzyminhibierenden Aufschlusses und Zuordnung zum Substanzvorschlag

#	Geruchseindruck	KI (GC-FID-O)	KI (GC-MS, polar)	Substanzvorschlag
A	süßlich	989	-	-
B	Gras	1074	1089	Hexanal
C	süßlich, fruchtig	1528	-	-

Die zugeordnete Substanz wurde durch Abgleich des KI mit einem authentischen Standard sowie Literaturangaben für KI und Geruchsqualität zunächst vorläufig als Hexanal identifiziert (Tab. 3.9). Durch Abgleich des Retentionsindex mit dem Retentionsindex des Standards sowie Literaturdaten auf einer unpolaren Trennsäule erfolgte die vollständige Identifizierung (Tab. 3.10).

Tab. 3.9: Vorläufig identifizierte geruchsaktive Substanz (KI für polare Trennsäule angegeben)

Substanz	KI Probe	KI Standard	KI Literatur	Geruchseindruck Literatur
Hexanal	1089	1090	1072 ¹	grün ¹

¹ Fischer und Grosch (1987)

Tab. 3.10: Mittels GC-MS identifizierte geruchsaktive Substanz

Substanz	KI polar			KI unpolar		
	Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
Hexanal	1089	1090	1072 ¹	812	802	800 ²

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ullrich und Grosch (1987)

Mittels GC-MS wurden weitere Stoffe nachgewiesen, die nicht sensorisch wahrnehmbar waren (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Mittels GC-MS vorläufig und vollständig identifizierte, nicht olfaktorisch detektierte Substanzen

#	Substanz	KI polar			KI unpolar		
		Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
1	Octanal	1287	1290	1280 ¹	1007	1005	1004 ⁷
2	Hexan-1-ol	1355	-	1351 ²	879	-	884 ⁷
3	Nonanal	1392	1391	1385 ³	1107	1104	1103 ⁷
4	Oct-2-enal *	1427	1427	1417 ¹	-	-	-
5	Oct-1-en-3-ol	1451	1447	1448 ¹	-	-	-
6	Essigsäure	1456	-	1446 ⁴	-	-	-
7	Octan-1-ol	1557	1553	1552 ¹	1076	1075	1072 ⁸
8	Oct-2-en-1-ol **	1613	1610	1610 ¹	-	-	-
9	Nonan-1-ol	1659	1659	1663 ⁵	1174	1174	1172 ⁷
10	2-Phenylethanol	1903	-	1905 ⁶	1114	-	1117 ⁹
11	3-Phenylpropan-1-ol	-	-	-	1223	-	1232 ¹⁰

* Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangabe Oct-2(*E*)-enal, ** Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangabe Oct-2(*E*)-en-1-ol, ¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ruther (2000), ³ Schieberle und Grosch (1987), ⁴ Cho *et al.* (2003), ⁵ Venkateshwarlu *et al.* (1999), ⁶ Ong und Acree (1999), ⁷ Högnadóttir und Rouseff (2003), ⁸ Choi (2003), ⁹ Rychlik *et al.* (1998), ¹⁰ Shams-Ardakani *et al.* (2005)

3.2.2 Extraktion mittels HS-SPME

Im mittels HS-SPME extrahierten Aromaextrakt aus enzymaktivierend aufgeschlossenem Myzel wurden mittels GC-MS/MS-O vier Geruchseindrücke bestimmt. In einer der Doppelbestimmungen wurden zudem zwei weitere Geruchseindrücke registriert (Abb. 3.13; mit * gekennzeichnet). Durch Abgleich der ODP-Spur mit dem Chromatogramm wurden den vier Geruchseindrücken Peaks zugeordnet und durch Datenbank-Abgleich der zugehörigen Massenspektren Substanzvorschläge erhalten (Tab. 3.12).

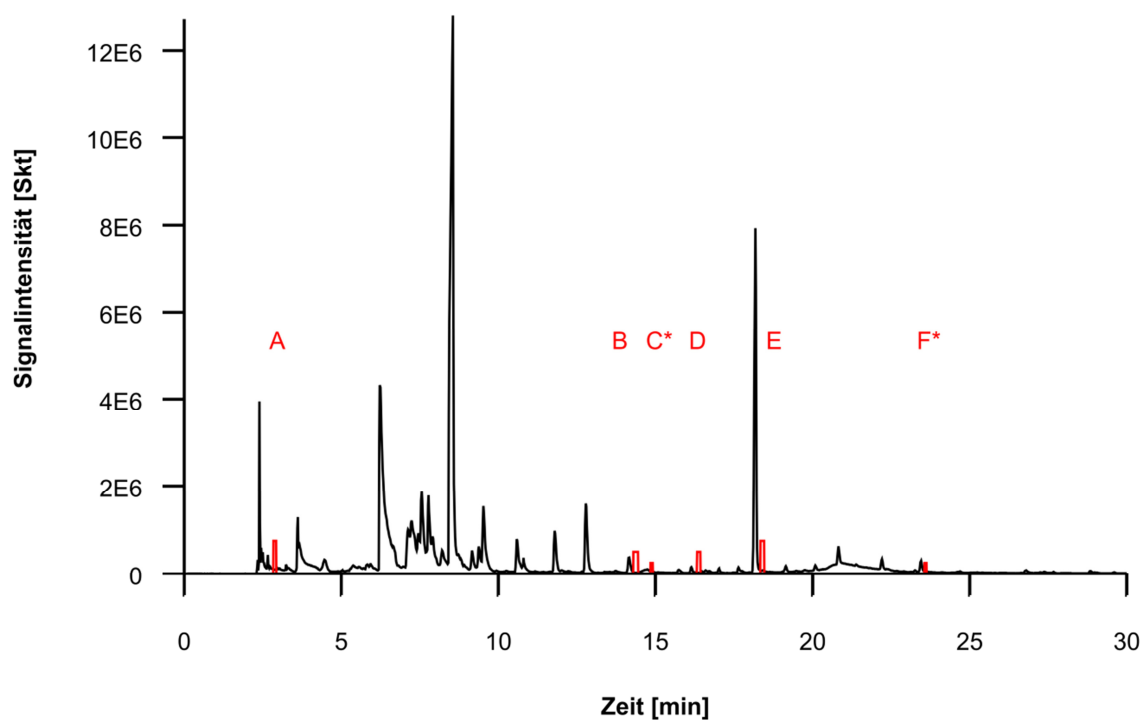


Abb. 3.13: Ausschnitt eines GC-MS/MS-O-Chromatogramms des HS-SPME-Extrakts von unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenem Myzel (rot: ODP-Spur; Zuordnungen der Geruchseindrücke s. Tab. 3.12)

Tab. 3.12: Geruchseindrücke im HS-SPME-Extrakt des enzymaktivierenden Aufschlusses und Zuordnung zu Substanzvorschlägen

#	Geruchseindruck	KI (GC-MS/MS-O)	Substanzvorschlag
A	schweflig, Knoblauch, würzig	672	Methanthiol
B	Pilz	1295	Oct-1-en-3-on
C *	leicht pilzig	1321	-
D	Knoblauch, leicht schweflig	1370	Dimethyltrisulfid
E	Pilz	1446	Oct-1-en-3-ol
F *	leicht Knoblauch	1667	-

* Geruchseindruck nur in einer der Bestimmungen wahrgenommen

Durch Abgleich der KI mit Literaturwerten und, soweit verfügbar, denen von Standards sowie Vergleich der Geruchseindrücke mit den in der Literatur beschriebenen Geruchsqualitäten wurden die Substanzen vorläufig identifiziert (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Vorläufig identifizierte geruchsaktive Substanzen (KI für polare Trennsäule angegeben)

Substanz	KI Probe	KI Standard	KI Literatur	Geruchseindruck Literatur
Methanthiol	672	-	690 ¹	schweflig ⁴
Oct-1-en-3-on	1295	1298	1294 ²	Pilz, metallisch ⁵
Dimethyltrisulfid	1370	-	1377 ³	schweflig ⁴
Oct-1-en-3-ol	1446	1446	1447 ²	Pilz ²

¹ Kumazawa und Masuda (2003), ² Fischer und Grosch (1987), ³ Luning *et al.* (1994),

⁴ Rychlik *et al.* (1998), ⁵ Ullrich und Grosch (1987)

Durch den Abgleich der Retentionsindices mit den Retentionsindices der Standards sowie Literaturdaten auf einer unpolaren Trennsäule wurden zwei geruchsaktive Substanzen vollständig identifiziert (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Mittels GC-MS/MS-O identifizierte geruchsaktive Substanzen

Substanz	KI polar			KI unpolar		
	Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
Oct-1-en-3-on	1295	1298	1294 ¹	981	981	979 ²
Oct-1-en-3-ol	1446	1446	1447 ¹	985	984	982 ²

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ullrich und Grosch (1987)

Im SPME-Extrakt wurden durch gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung weitere Stoffe bestimmt, die nicht sensorisch wahrnehmbar waren (Tab. 3.15).

Tab. 3.15: Mittels GC-MS/MS-O vorläufig und vollständig identifizierte, nicht olfaktorisch detektierte Substanzen

#	Substanz	KI polar			KI unpolar		
		Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
1	Hexanal	1083	1081	1072 ¹	801	802	800 ⁵
2	Octan-3-on	1249	1255	1247 ¹	988	988	984 ⁶
3	Hept-2-enal *	1321	-	1336 ²	963	-	957 ⁵
4	Hexan-1-ol	1336	-	1351 ³	-	-	-
5	Oct-2-enal **	1426	1429	1417 ¹	-	-	-
6	Benzaldehyd	1521	1517	1525 ⁴	-	-	-
7	Oct-2-en-1-ol ***	1608	1606	1610 ¹	1071	1071	1060 ⁷
8	Dimethyldisulfid	-	-	-	745	-	741 ⁸
9	Octanal	-	-	-	1005	1005	1001 ⁹
10	Octan-1-ol	-	-	-	1075	1075	1072 ¹⁰
11	Nonanal	-	-	-	1106	1104	1104 ⁹
12	Dec-2-enal	-	-	-	1265	-	1262 ⁸

* Konfiguration nicht geklärt, Literaturangaben Hept-2(*E*)-enal, ** Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangabe Oct-2(*E*)-enal, *** Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangaben Oct-2(*E*)-en-1-ol, ¹ Fischer und Grosch (1987), ² Le Guen *et al.* (2000), ³ Ruther (2000), ⁴ Valim *et al.* (2003), ⁵ Ullrich und Grosch (1987), ⁶ Vardar-Ünlü *et al.* (2003), ⁷ Skaltsa *et al.* (2003), ⁸ Rychlik *et al.* (1998), ⁹ Bastos *et al.* (2006), ¹⁰ Choi (2003)

Im Aromaextrakt des enzyminhibierend aufgeschlossenen Myzels wurde ein Geruchseindruck wahrgenommen (Abb. 3.14). Diesem wurde durch Abgleich der ODP-Spur mit dem Chromatogramm ein Peak zugeordnet (Tab. 3.16).

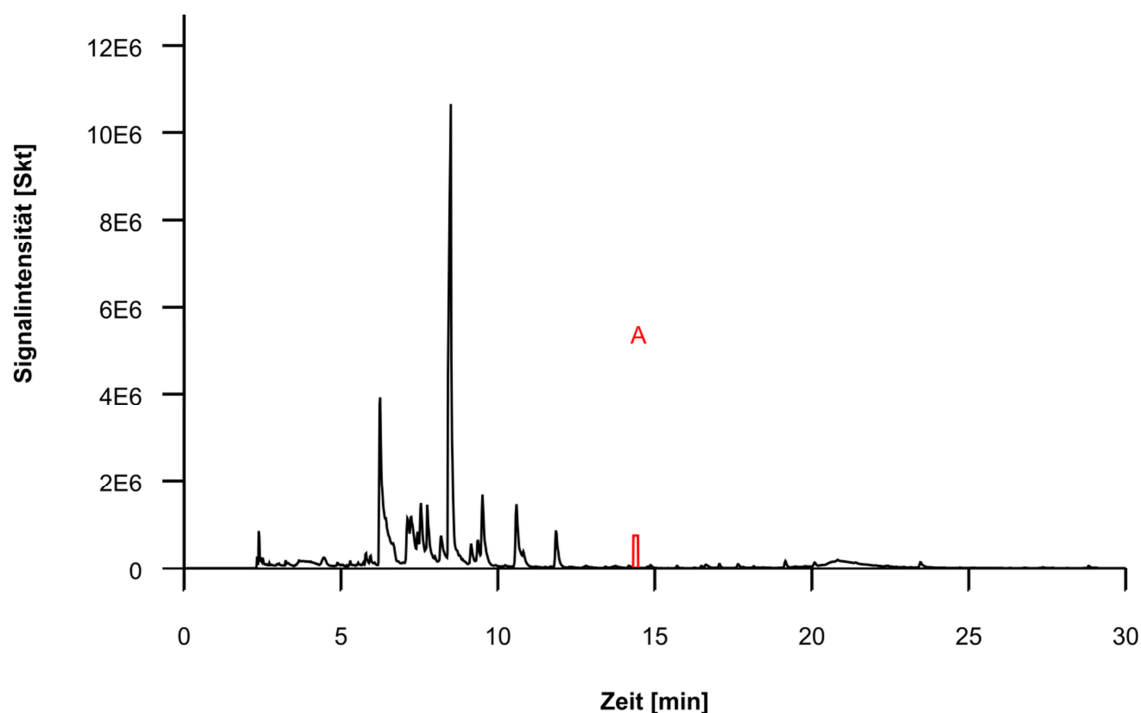


Abb. 3.14: Ausschnitt eines GC-MS/MS-O-Chromatogramms des HS-SPME-Extrakts von unter enzyminhibierenden Bedingungen aufgeschlossenen Myzel (rot: ODP-Spur; Zuordnung des Geruchseindrucks s. Tab. 3.16)

Tab. 3.16: Geruchseindruck im HS-SPME-Extrakt des enzyminhibierenden Aufschlusses und Zuordnung zum Substanzvorschlag

#	Geruchseindruck	KI (GC-MS/MS-O)	Substanzvorschlag
A	Pilz	1288	Octanal

Durch Abgleich des KI mit einem Literaturwert und dem KI des Standards sowie Vergleich des Geruchseindrucks mit der beschriebenen Geruchsqualität wurde die Substanz zunächst vorläufig identifiziert (Tab. 3.17). Aufgrund des zusätzlichen Abgleichs der Retentionsindices von Probe, Standard und Literaturdaten auf einer unpolaren Trennsäule wurde Octanal abschließend identifiziert (Tab. 3.18).

Tab. 3.17: Vorläufig identifizierte geruchsaktive Substanz (KI für polare Trennsäule angegeben)

Substanz	KI Probe	KI Standard	KI Literatur	Geruchseindruck Literatur
Octanal	1288	1288	1280 ¹	fettig ²

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Ullrich und Grosch (1988)

Tab. 3.18: Mittels GC-MS identifizierte geruchsaktive Substanz

Substanz	KI polar			KI unpolar		
	Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
Octanal	1288	1288	1280 ¹	1004	1005	1001 ²

¹ Fischer und Grosch (1987), ² Bastos *et al.* (2006)

Zudem wurden mittels GC-MS weitere Stoffe nachgewiesen, die nicht geruchsaktiv waren (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Mittels GC-MS/MS-O vorläufig und vollständig identifizierte, nicht olfaktorisch detektierte Substanzen

#	Substanz	KI polar			KI unpolar		
		Probe	Standard	Lit.	Probe	Standard	Lit.
1	Hexanal	1082	1081	1072 ¹	800	802	800 ⁷
2	Hept-2-enal *	1323	-	1336 ²	962	-	957 ⁷
3	Hexan-1-ol	1351	-	1351 ³	-	-	-
4	Nonanal	1386	1391	1385 ⁴	1106	1104	1104 ⁸
5	Oct-2-enal **	1429	1429	1417 ¹	-	-	-
6	2-Ethylhexan-1-ol	1485	-	1487 ⁵	-	-	-
7	Benzaldehyd	1523	1517	1525 ⁶	-	-	-
8	Heptanal	-	-	-	903	-	906 ³
9	Dec-2-enal	-	-	-	1265	-	1262 ³

* Konfiguration nicht geklärt, Literaturangaben Hept-2(*E*)-enal, ** Konfiguration nicht geklärt, Standard und Literaturangabe Oct-2(*E*)-enal, ¹ Fischer und Grosch (1987), ² Le Guen *et al.* (2000), ³ Ruther (2000), ⁴ Schieberle und Grosch (1987), ⁵ Lee und Noble (2003), ⁶ Valim *et al.* (2003), ⁷ Ullrich und Grosch (1987), ⁸ Bastos *et al.* (2006)

3.3 Synthese, Charakterisierung und Nachweis von 10-HPOD

3.3.1 Synthese, Isolierung und Analytik

Durch die Photooxygenierung von Linolsäure (2.9.1) wurde ein Gemisch von Linolsäurehydroperoxiden (HPOD) und weiteren Fettsäurederivaten erhalten. Der Verlauf der Synthese wurde mittels DC (2.9.3.1) mit peroxidspezifischer Detektion verfolgt.

Die Reaktionsmischung wurde mittels Säulenchromatographie fraktioniert (2.9.2) und die Fraktionen mittels DC auf Peroxide geprüft (Abb. 3.15). Peroxidhaltige Fraktionen wurden nach Derivatisierung mittels GC-MS auf 10-HPOD analysiert (2.9.3.2; 2.8.5).

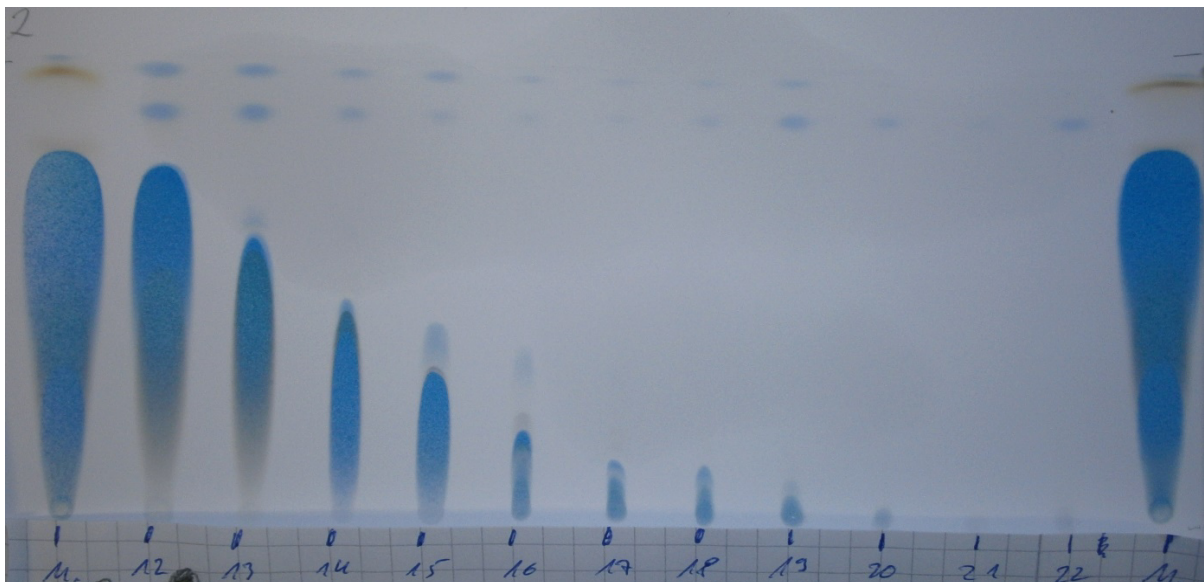


Abb. 3.15: Überprüfung der Fraktionen der Säulenchromatographie auf Peroxide mittels DC (links und rechts außen: Positivkontrollen)

Aus Fraktionen, die 10-HPOD enthielten, wurde dieses mittels präparativer HPLC isoliert (2.9.2). Die 10-HPOD enthaltenden Fraktionen mehrerer Läufe wurden vereint. Sofern notwendig, wurde das Rohprodukt durch einen weiteren HPLC-Lauf erneut gereinigt.

3.3.2 Strukturaufklärung

Mittels GC-MS wurden EI-Massenspektren des Derivates von 10-HPOD (Abb. 3.16) sowie der weiteren Fettsäurehydroperoxide aufgenommen und die KI der jeweiligen Peaks berechnet. Der KI des Derivats von 10-HPOD betrug 2382 (DB5-ms).

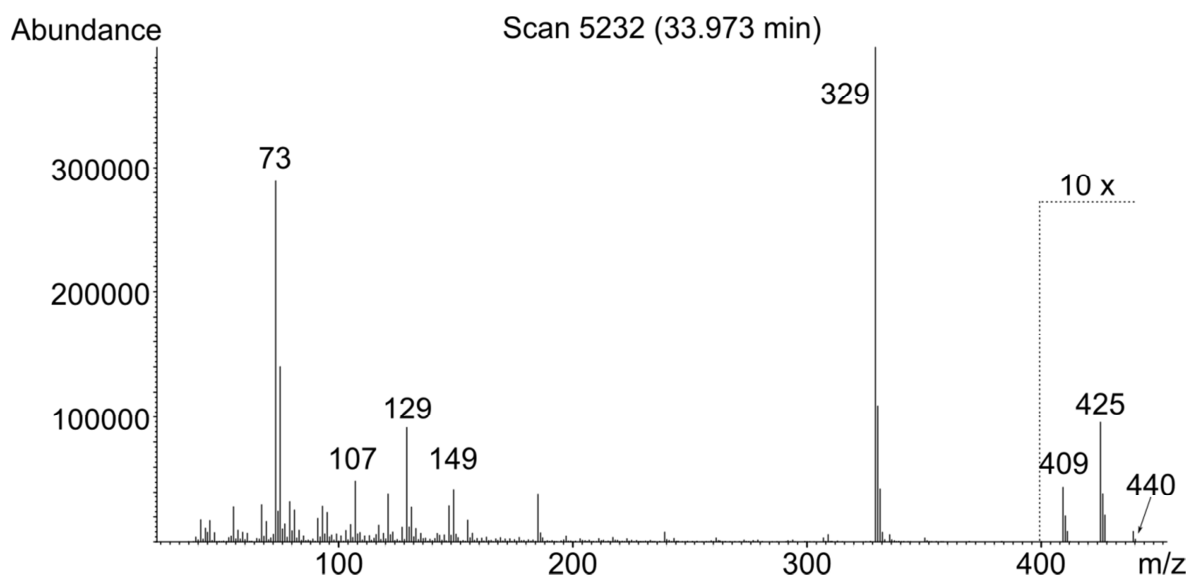


Abb. 3.16: Massenspektrum des Derivats von 10-HPOD; Bereich $m/z > 400$ 10-fach vergrößert dargestellt

Die Untersuchung des gereinigten 10-HPOD mittels NMR-Spektroskopie (2.9.3.3) ergab im $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , Abb. s. 7.1) folgende Signale und Zuordnungen: 5,751 (td, 15,5 Hz ($^3J_{\text{trans}}$ (H-8, H-9), 6,8 Hz, 8-H), 5,451 (m, 13-H), 5,368 (ddt, 15,5 Hz, 8,1 Hz, 1,5 Hz, 9-H), 5,302 (m, 12-H), 4,281 (m, 10-H), 2,412 – 2,227, 11a,b-H), 2,316 (t, 7,4 Hz, 2-H), 2,039 (m, 7-H), 1,999 (m, 14-H), 1,603 (m, 3-H), 1,373 (m, 6-H), 1,305 (m, 5-H, 4-H, 15-H), 1,266 (m, 17-H), 1,239 (m, 16-H), 0,853 (t, 6,9 Hz, 18-H).

Das $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , Abb. s. 7.1) zeigte folgende Signale (Zuordnung): 179,7 (COOH, C-1), 136,7 (CH, C-8), 132,5 (CH, C-13), 128,0 (CH, C-9), 123,9 (CH, C-12), 86,4 (-O-CH<, C-10), 33,9 (CH_2 , C-2), 32,2 (CH_2 , C-7), 31,5 (CH_2 , C-16), 30,6 (CH_2 , C-11), 29,2 (CH_2 , C-15), 28,7 (CH_2 , C-5 oder C-4), 28,62 (CH_2 , C-5 oder C-4), 28,59 (CH_2 , C-6), 27,3 (CH_2 , C-14), 24,6 (CH_2 , C-3), 22,5 (CH_2 , C-17), 14,02 (CH_3 , C-18).

In 2D- $^1\text{H-NOESY}$ -Experimenten wurde die Konfiguration der Doppelbindungen $\text{C}_8=\text{C}_9$ und $\text{C}_{12}=\text{C}_{13}$ untersucht. Zwischen dem Wasserstoff an C-9 und den Wasserstoffen an C-7 besteht eine Kern-Overhauser-Effekt (NOE)-Wechselwirkung, was die (*E*)-Konfiguration der Doppelbindung $\text{C}_8=\text{C}_9$ belegt. Die NOE-Wechselwirkung zwischen den diastereotopen Wasserstoffen an C-11 und den Wasserstoffen an C-14 bedeutet, dass die Doppelbindung $\text{C}_{12}=\text{C}_{13}$ (*Z*)-konfiguriert ist (Abb. 3.17).

A.Heuger 01

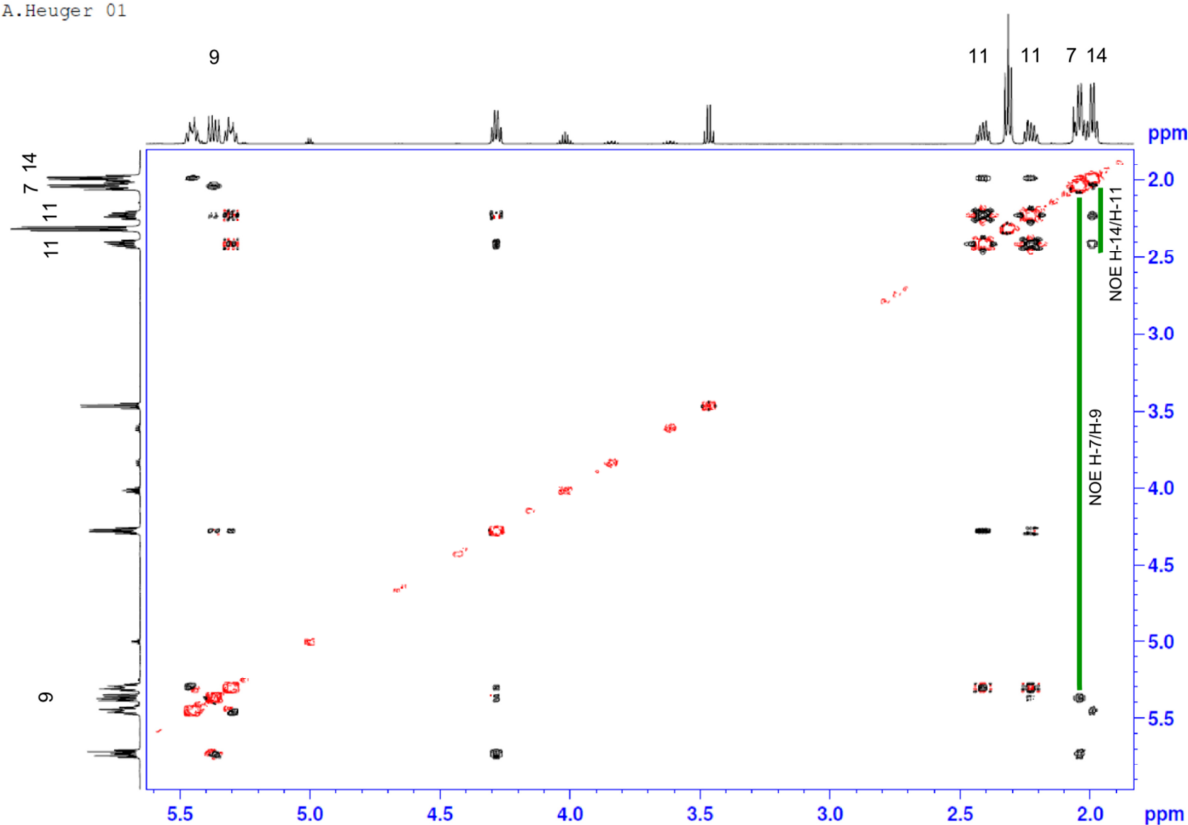


Abb. 3.17: Ausschnitt aus dem 2D-1H-NOESY-Spektrum von 10-HPOD (in CDCl_3)

3.3.3 Nachweis aus Myzel

Submers kultiviertes Myzel wurde ohne und mit Zusatz von Linolsäure analog zu der Untersuchung der Bildung von C_8 -Aromastoffen homogenisiert und extrahiert. Die Extrakte wurden konzentriert (2.10) und derivatisiert (2.9.3.2). 10-HPOD wurde in den derivatisierten Extrakten mittels GC-MS (2.8.5) anhand der Übereinstimmung der KI und der Massenspektren mit dem Derivat des synthetisierten Standards nachgewiesen (Tab. 3.20; Abb. 3.18; vgl. Abb. 3.16 für den Standard). Dabei kam 10-HPOD unabhängig vom Zusatz von Linolsäure in allen unterschiedlichen Proben vor.

Tab. 3.20: Vergleich der Kováts-Indices (KI) des Derivats des synthetisierten Standards 10-HPOD und des derivatisierten 10-HPOD in den Extrakten aus Myzel von *L. edodes*

Probe	KI (DB5-ms)
Derivat des Standards	2382
Myzel ohne Linolsäurezusatz	2383
Myzel mit Linolsäurezusatz (2 mM)	2383
Myzel mit Linolsäurezusatz (4 mM)	2383

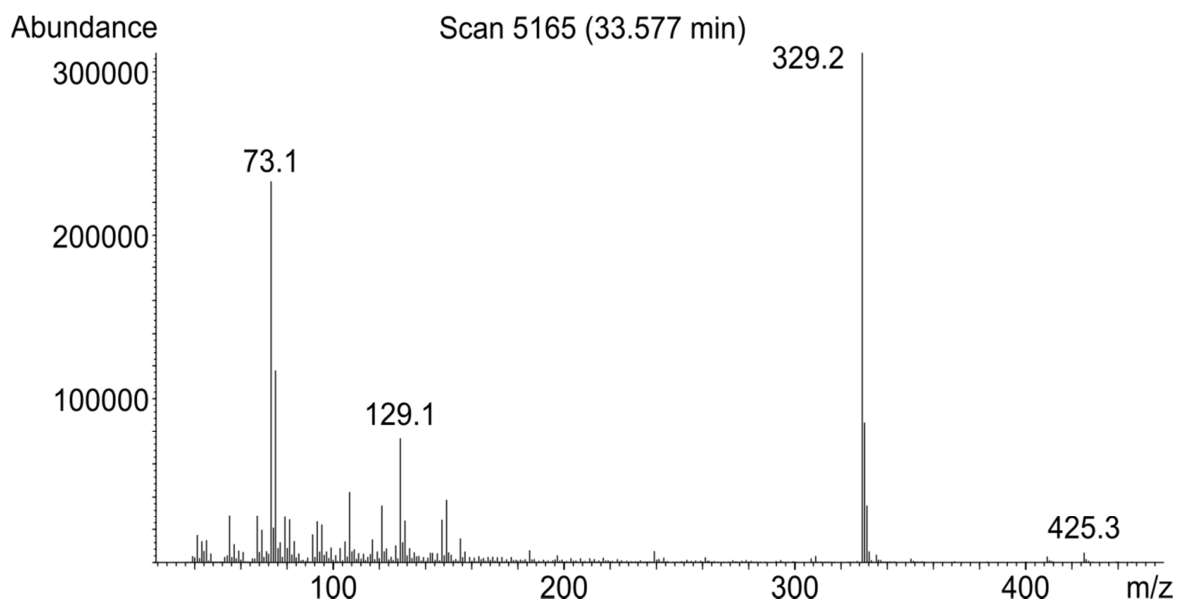


Abb. 3.18: Massenspektrum des Derivats von 10-HPOD aus Myzel (mit 2 mM Linolsäure-zusatz)

3.4 Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase

3.4.1 Überprüfung auf extrazelluläre Hydroperoxidlyase-Aktivität

Der Kulturüberstand einer Submerskultur von *L. edodes* (2.11.1) wurde nach 2.11.8 auf die Bildung von Oct-1-en-3-ol aus 10-HPOD geprüft. In den Ansätzen der Umsetzung wurde ein deutlich geringerer Gehalt an Oct-1-en-3-ol als in den zugehörigen Negativkontrollen festgestellt (Abb. 3.19). Das Enantiomerenverhältnis war in beiden Ansätzen fast ausgeglichen. Ebenso wurde nur ein sehr geringer Grundgehalt an Oct-1-en-3-ol ermittelt.

Der Kulturüberstand besitzt keine Hydroperoxidlyase-Aktivität (HPL-Aktivität).

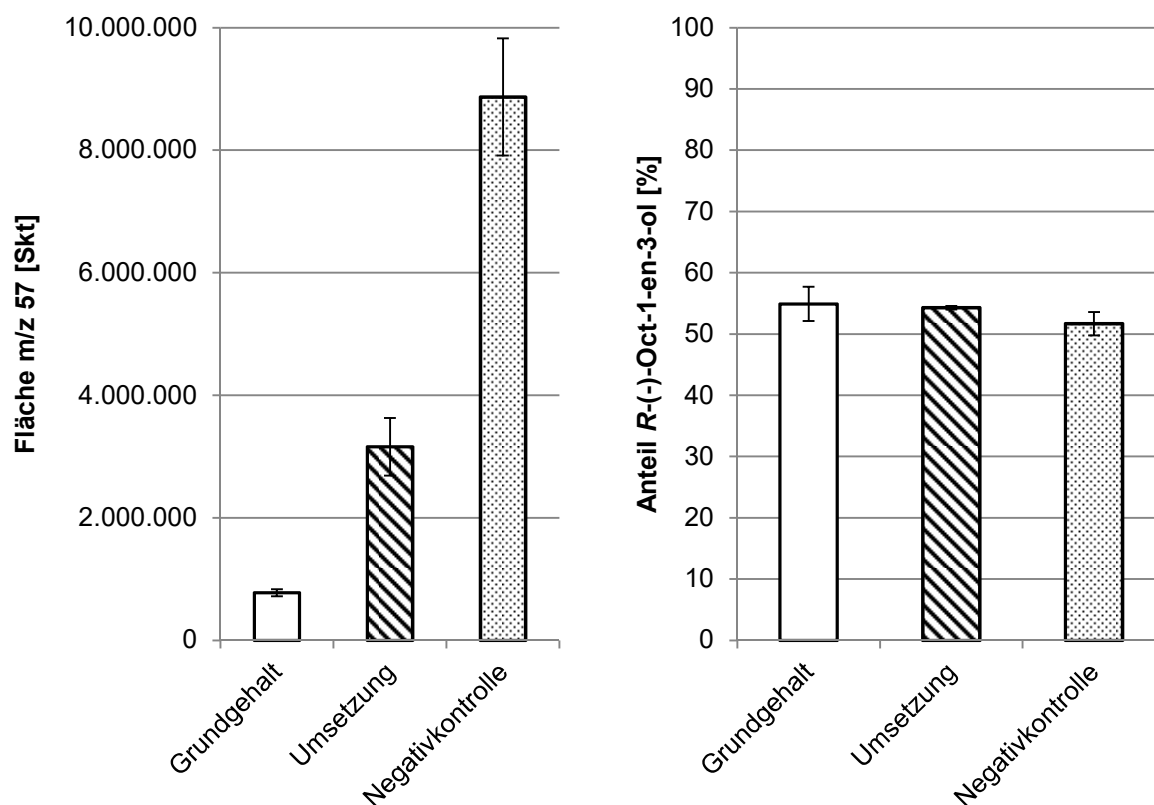


Abb. 3.19: HPL-Aktivität des Kulturüberstands: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

3.4.2 Überstand und Pellet der Ultrazentrifugation

Da im Überstand keine HPL-Aktivität festgestellt wurde (3.4.1), erfolgte ein Zellaufschluss des Myzels (2.11.2), um das gesuchte Enzym freizusetzen. Das Homogenat wurde zur Entfernung grober Partikel zunächst zentrifugiert und der trübe Überstand nachfolgend einer Ultrazentrifugation unterworfen (2.11.3).

Die HPL-Aktivität des Überstandes und des Pellets der Ultrazentrifugation wurde nach 2.11.8 bestimmt.

Bei der Untersuchung des Überstands wurde in allen Ansätzen (Grundgehalt, Umsetzung, Negativkontrolle) ein etwa gleich hoher Gehalt an Oct-1-en-3-ol mit gleichermaßen hohem Überschuss des *R*-(-)-Oct-1-en-3-ols festgestellt (Abb. 3.20).

Im Überstand wurde keine HPL-Aktivität festgestellt.

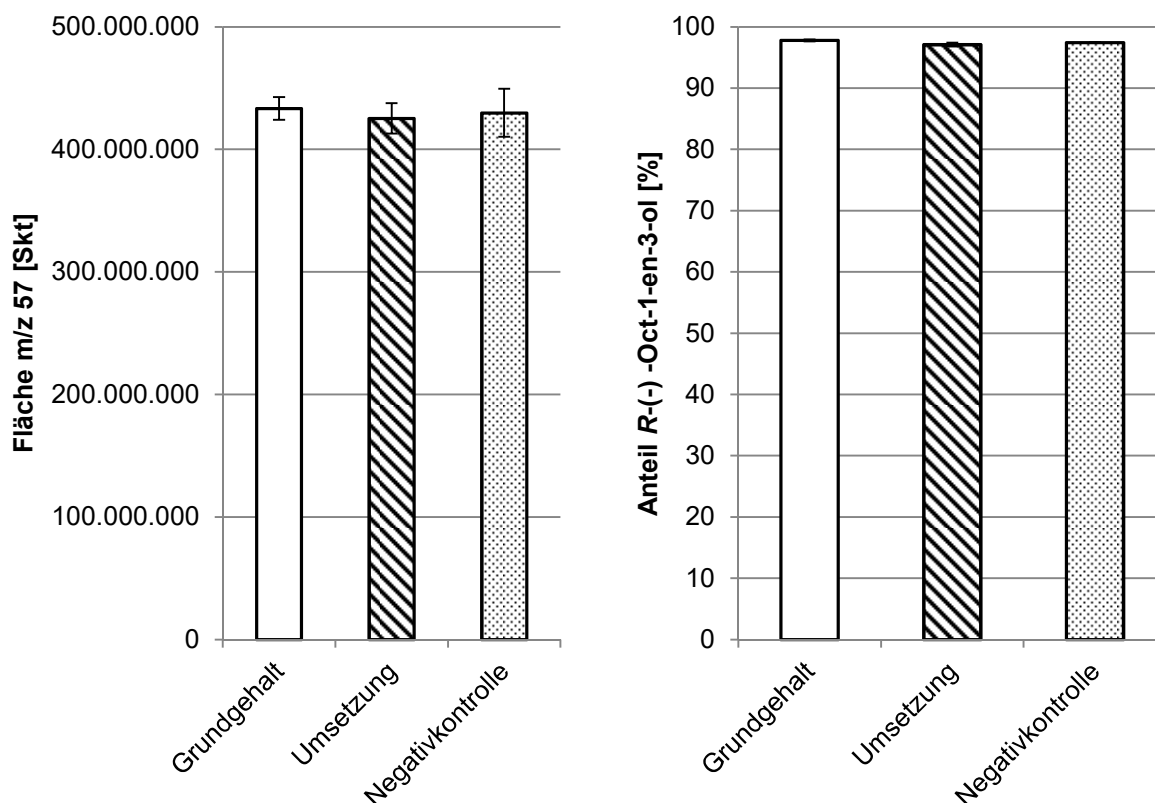


Abb. 3.20: HPL-Aktivität des Überstands der Ultrazentrifugation: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des *R*-(-)-Enantiomers (rechts)

Die Umsetzung von 10-HPOD mit der Suspension des Pellets der Ultrazentrifugation ergab eine sehr starke Bildung von Oct-1-en-3-ol mit einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von über 90% zugunsten des *R*-(-)-Enantiomers (Abb. 3.21). In den Ansätzen von Grundgehalt und Negativkontrolle wurde nur ein Bruchteil des Gehaltes an Oct-1-en-3-ol bestimmt.

Das gesuchte Enzym befindet sich im Pellet der Ultrazentrifugation.

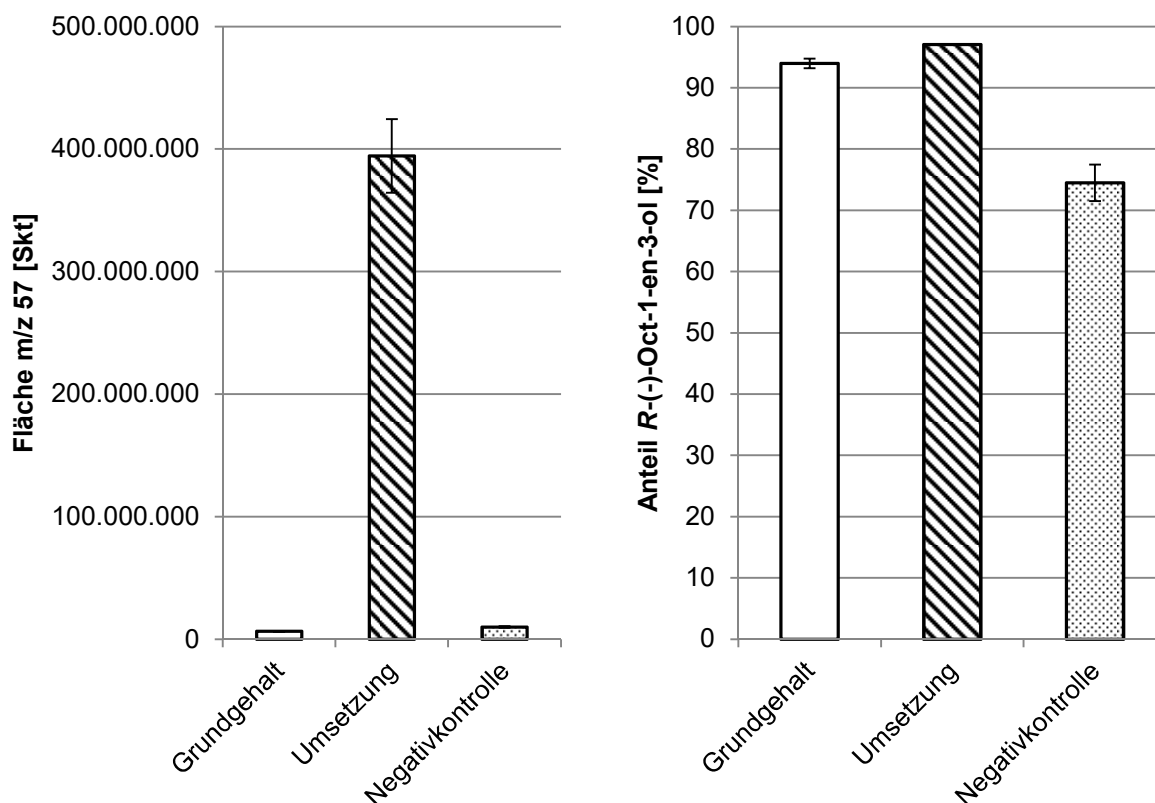


Abb. 3.21: HPL-Aktivität des Pellets der Ultrazentrifugation: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

3.4.3 Extraktion aus dem Pellet

Um das gesuchte Enzym aus dem Pellet der Ultrazentrifugation zu extrahieren und für die weiteren Reinigungsschritte zu solubilisieren, wurde das Pellet mit einem Puffer mit Zusatz des Detergens Saccharosemonolaurat (SML) verrieben (2.11.4). Die erhaltene Suspension wurde ultrazentrifugiert und ein klarer Überstand erhalten. Dieser wurde auf HPL-Aktivität untersucht.

Die Umsetzung mit dem Extrakt des Pellets ergab eine starke Bildung von Oct-1-en-3-ol, welches zu 96% aus dem R(-)-Enantiomer bestand. Die in den Ansätzen der Negativkontrolle und dem Grundgehalt ermittelten Mengen an Oct-1-en-3-ol waren vergleichbar und deutlich geringer als in der Umsetzung. Auch hier bestand ein Enantiomerenverhältnis von etwa 97:3 zugunsten der R(-)-Form (Abb. 3.22).

In dem Extrakt des Pellets wurde starke HPL-Aktivität festgestellt.

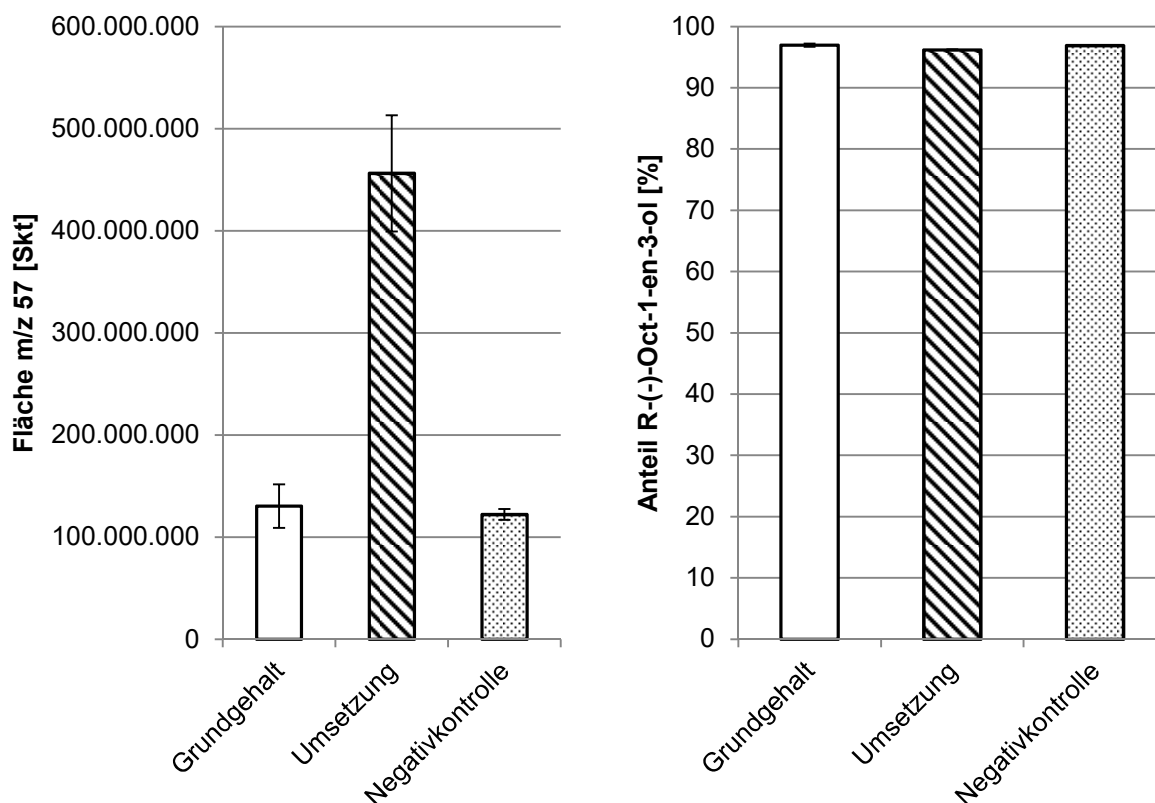


Abb. 3.22: HPL-Aktivität eines Extrakts des Pellets der Ultrazentrifugation: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

3.4.4 Reinigung

3.4.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Der Extrakt der Pellets der Ultrazentrifugation wurde durch Ionenaustauschchromatographie an einem starken Anionenaustauscher (2.11.5.1) aufgetrennt. Das FPLC-Chromatogramm zeigt drei getrennt eluierende Bereiche (Abb. 3.23). Diese entsprechen Proteinen, die nicht am Ionenaustauscher gebunden werden (I) bzw. unterschiedlich stark am Ionenaustauscher binden (II, III). Die zugehörigen Fraktionen der Peaks wurden für die weitere Untersuchung vereinigt (I: Fraktionen 2-4; II: Fraktionen 11-14; III: Fraktionen 18-21). Der Pool mit dem ungebundenen Protein (I) sowie die Pools mit den gebundenen Proteinfractionen (II und III) wurden mittels FTC-Assay (2.11.7) auf den Abbau von 10-HPOD geprüft. Die gebundenen Pools II und III zeigten einen ähnlich starken Abbau während der ungebundene Proteinpeak einen geringeren Abbau von 10-HPOD bewirkte. Der Pool II wurde für die Untersuchung der Bildung von Oct-1-en-3-ol nach 2.11.8 eingesetzt, weil der

zugehörige Peak im Chromatogramm eine diskrete Form aufwies und anhand der UV-Absorption eine größere Proteinmenge als Pool III erwarten ließ.

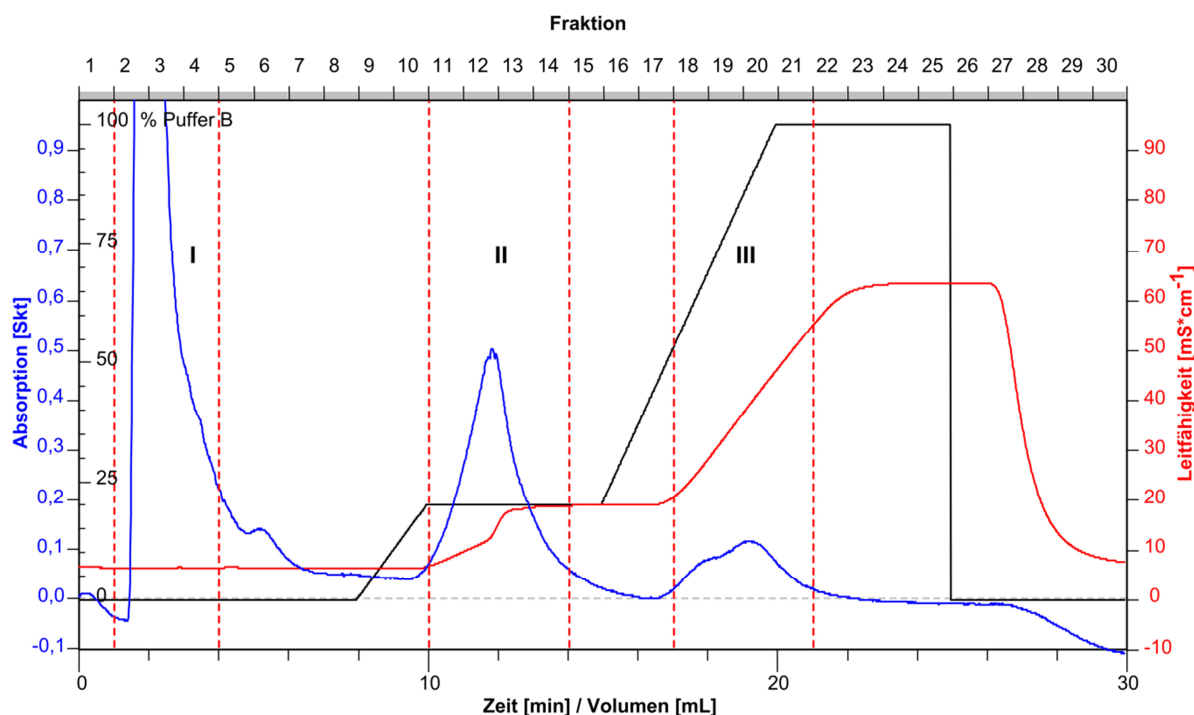


Abb. 3.23: FPLC-Chromatogramm des Extrakts: Ionenaustauschchromatographie an einer Q FF-Anionenaustauschersäule (schwarz: Anteil an Puffer B (%), blau: Absorption bei $\lambda=280$ nm (Skt), rot: Leitfähigkeit (mS cm^{-1}), rot gestrichelt: vereinigte Fraktionen; Pools I-III)

In der Umsetzung von 10-HPOD mit Protein des Pool II zeigte sich eine starke Bildung von Oct-1-en-3-ol mit einem hohen Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers (Abb. 3.24). Dabei wurde in den Proben zur Bestimmung des Grundgehaltes kein Oct-1-en-3-ol festgestellt. In den Negativkontrollen betrug der Gehalt an Oct-1-en-3-ol etwa ein Fünftel des Gehaltes in der Umsetzung und wies eine nahezu racemische Verteilung der Enantiomere auf.

Pool II beinhaltet die gesuchte Hydroperoxidlyase.

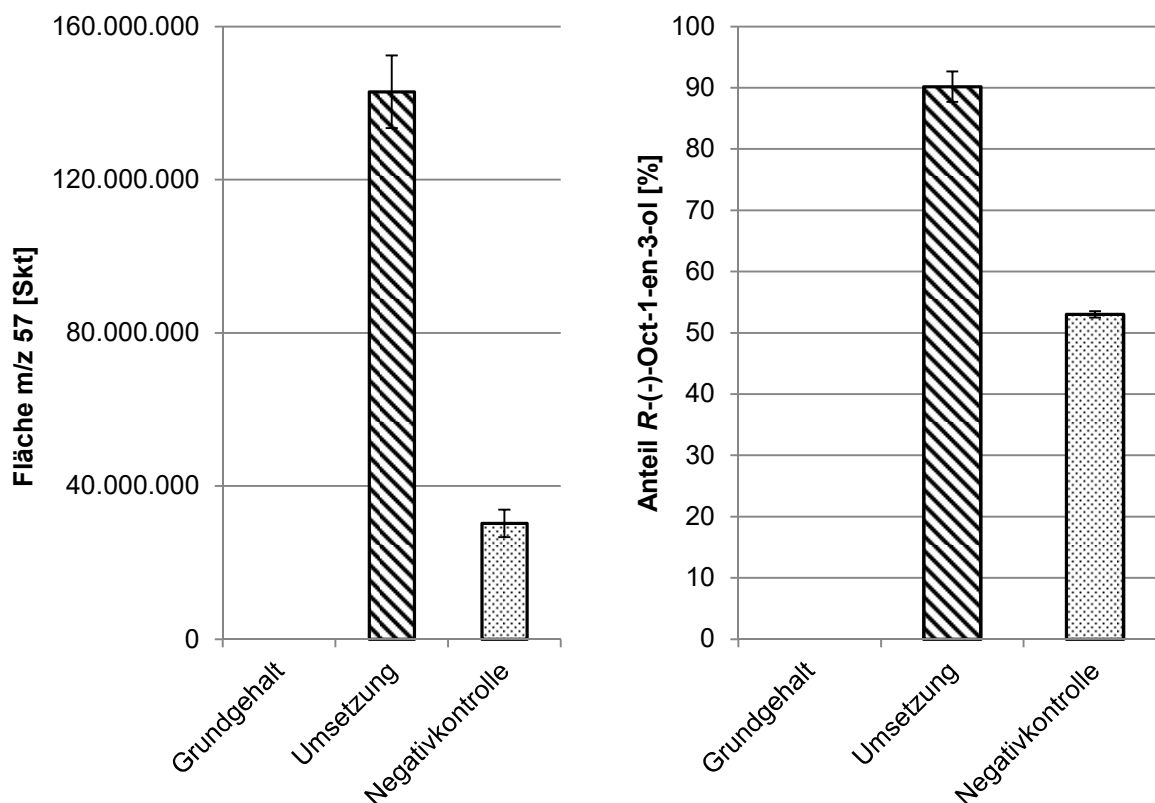


Abb. 3.24: HPL-Aktivität des Pools II der Anionenaustauschchromatographie: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

3.4.4.2 Gelfiltration

Der Extrakt der Pellets der Ultrazentrifugation wurde mittels Gelfiltrationschromatographie (2.11.5.2) aufgetrennt. Zunächst erfolgte eine grobe Einordnung der Aktivität durch Trennung auf einer ENrich 650 SEC-Trennsäule. Aus den Fraktionen wurden vier Pools gebildet (Abb. 3.25). Die Molekulargewichtsbereiche, welche die Pools umfassten, wurden anhand der Kalibrierung (2.11.5.2, Abb. 2.1) berechnet. Pool I umfasste den Bereich größer 76 kDa, Pool II den Größenbereich von 76 kDa bis etwa 37 kDa. Pool III deckt den Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 37 kDa und 9 kDa ab, der vierte Pool den Bereich von 9 kDa bis 2 kDa.

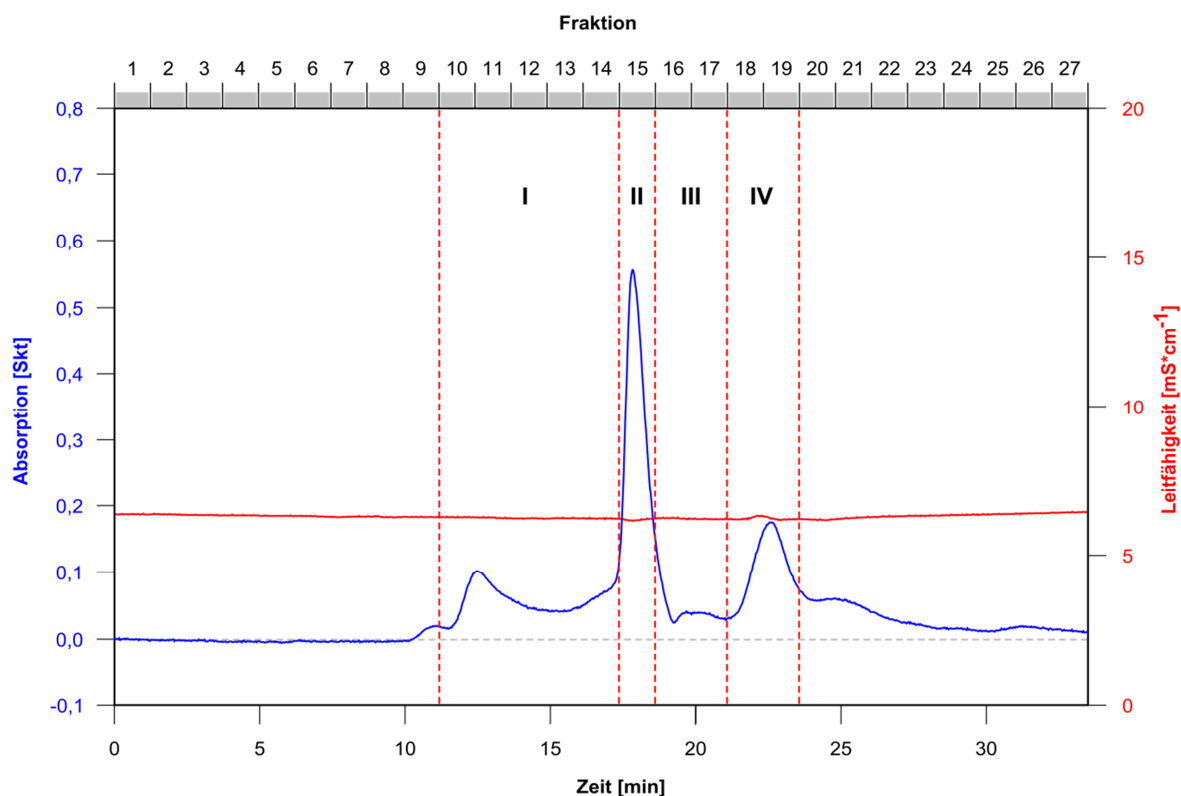


Abb. 3.25: FPLC-Chromatogramm des Extrakts: Gelfiltrationschromatographie auf einer ENrich 650 SEC-Trennsäule (blau: Absorption bei $\lambda=280$ nm (Skt), rot: Leitfähigkeit (mS cm^{-1}), rot gestrichelt: vereinigte Fraktionen; Pools I-IV)

Die HPL-Aktivität der Pools II und III wurde nach 2.11.8 untersucht. Bei der Umsetzung von 10-HPOD mit der Enzymlösung Pool II wurde eine starke Bildung von Oct-1-en-3-ol bei einem gleichzeitig sehr hohen Enantiomerenüberschuss des *R*-(-)-Enantiomers festgestellt (Abb. 3.26). Bei Einsatz der Enzymlösung Pool III war sowohl die Bildung von Oct-1-en-3-ol als auch der Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers deutlich geringer (Abb. 3.27). Der Grundgehalt war bei beiden Pools vernachlässigbar gering. Ebenso war der Gehalt an Oct-1-en-3-ol in den Proben der Negativkontrollen bei beiden Pools vergleichbar hoch und wies nur einen geringen Überschuss des *R*-(-)-Oct-1-en-3-ols auf. Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um Zerfall des 10-HPOD handelt.

Folglich wurde in Pool II starke HPL-Aktivität und in Pool III eine geringfügige HPL-Aktivität nachgewiesen. Das zu erwartende Molekulargewicht des Enzyms liegt damit im Bereich von etwa 76 kDa bis 37 kDa.

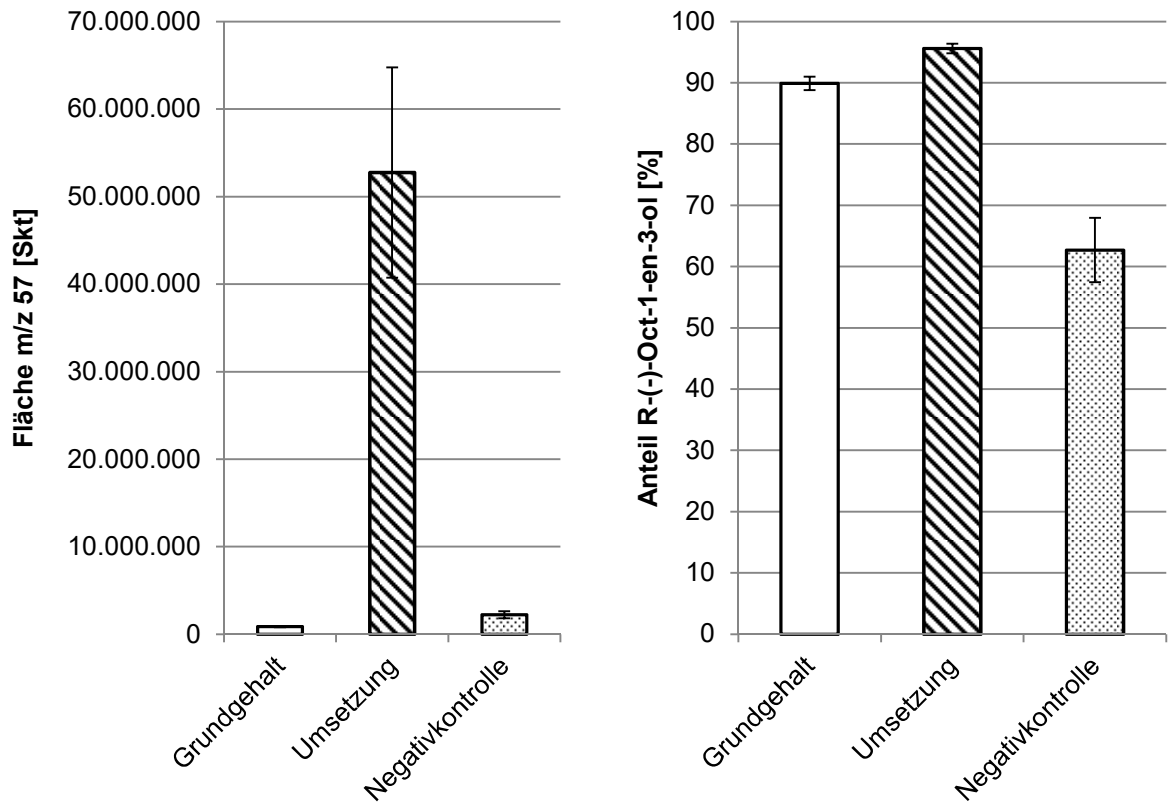


Abb. 3.26: HPL-Aktivität des Pools II der Gelfiltration: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des *R*(-)-Enantiomers (rechts)

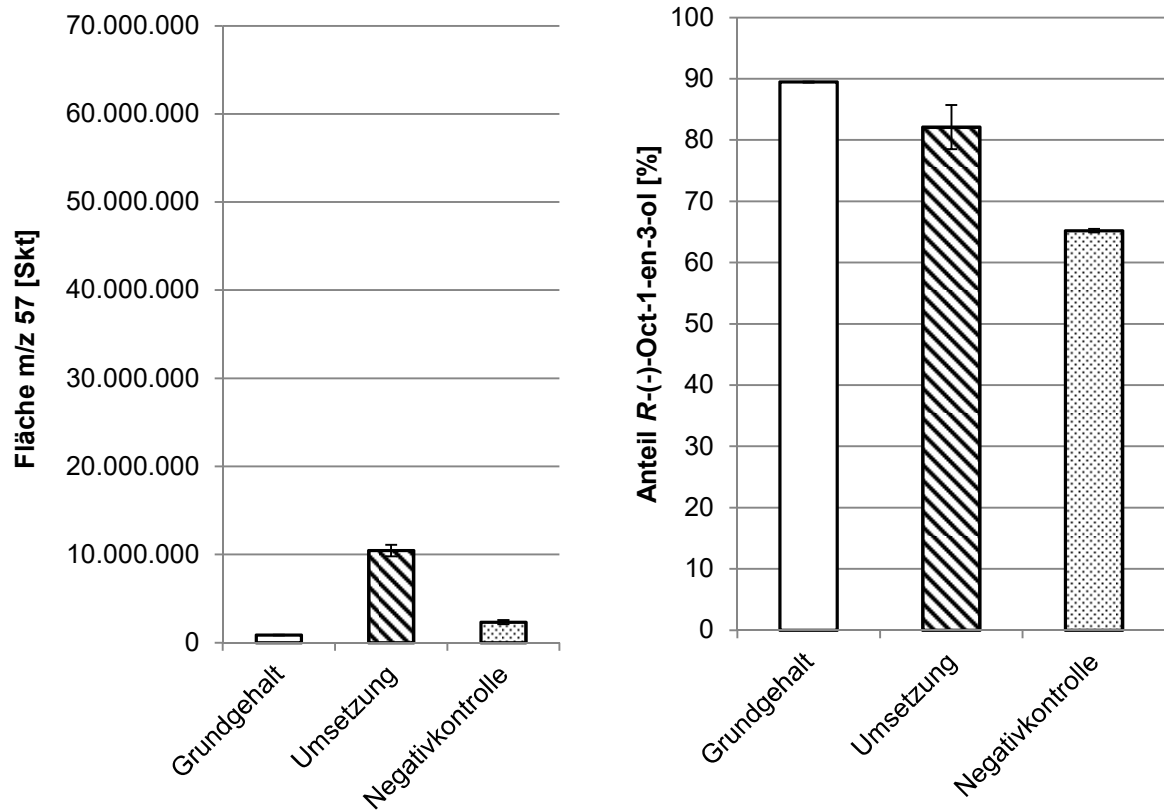


Abb. 3.27: HPL-Aktivität des Pools III der Gelfiltration: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

Aufgrund des erwarteten Molekulargewichts wurde für die weitere Gelfiltrationschromatographie eine Superdex 75-Trennsäule (2.11.5.2) verwendet, um eine bessere Trennung zu erzielen. Abb. 3.28 zeigt die Trennung des Extrakts auf dieser Trennsäule. Die Fraktionen 21 bis 24 wurden jeweils auf ihre HPL-Aktivität geprüft (2.11.8).

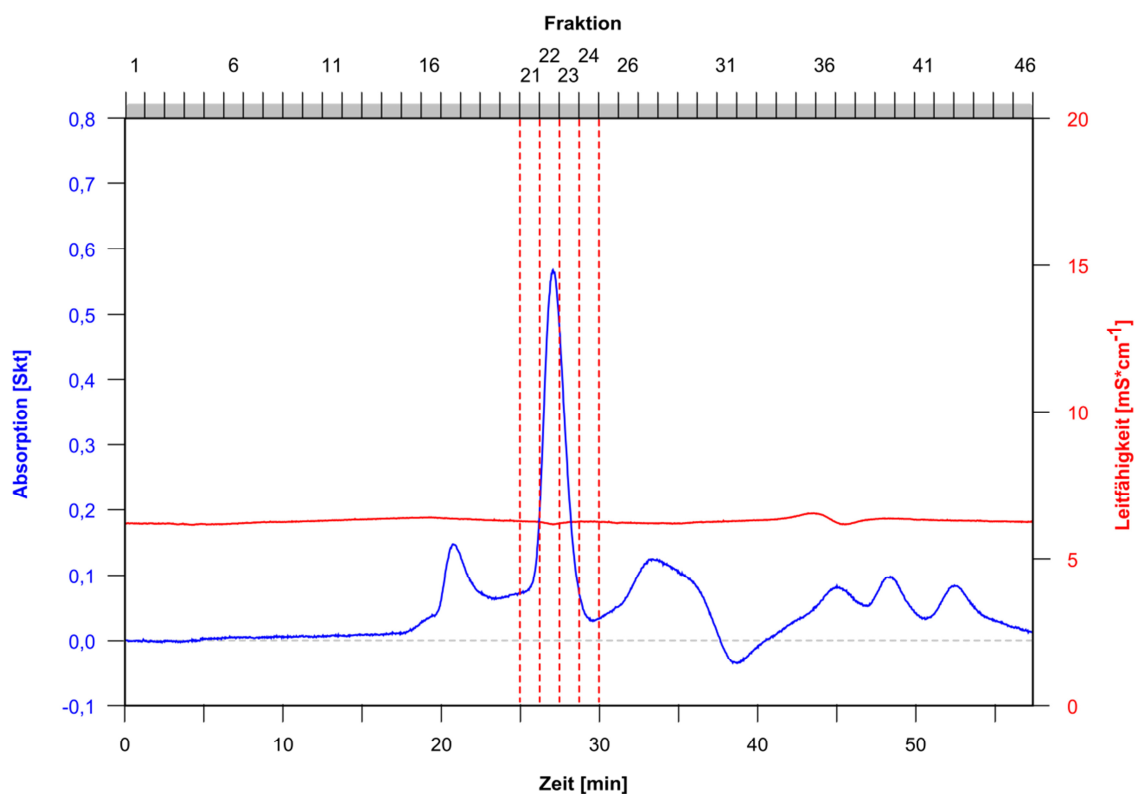


Abb. 3.28: FPLC-Chromatogramm des Extrakts: Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex 75-Trennsäule (blau: Absorption bei $\lambda=280$ nm (Skt), rot: Leitfähigkeit (mS cm^{-1}), rot gestrichelt: untersuchte Fraktionen)

Bei der Untersuchung der Fraktion 21 der Gelfiltrationschromatographie auf der Superdex 75-Trennsäule war der Gehalt an Oct-1-en-3-ol in den Ansätzen der Umsetzung und der Negativkontrolle ähnlich groß (Abb. 3.29). In der Umsetzung wurde nur ein leichter Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers festgestellt. In der Fraktion 21 wurde keine HPL-Aktivität nachgewiesen.

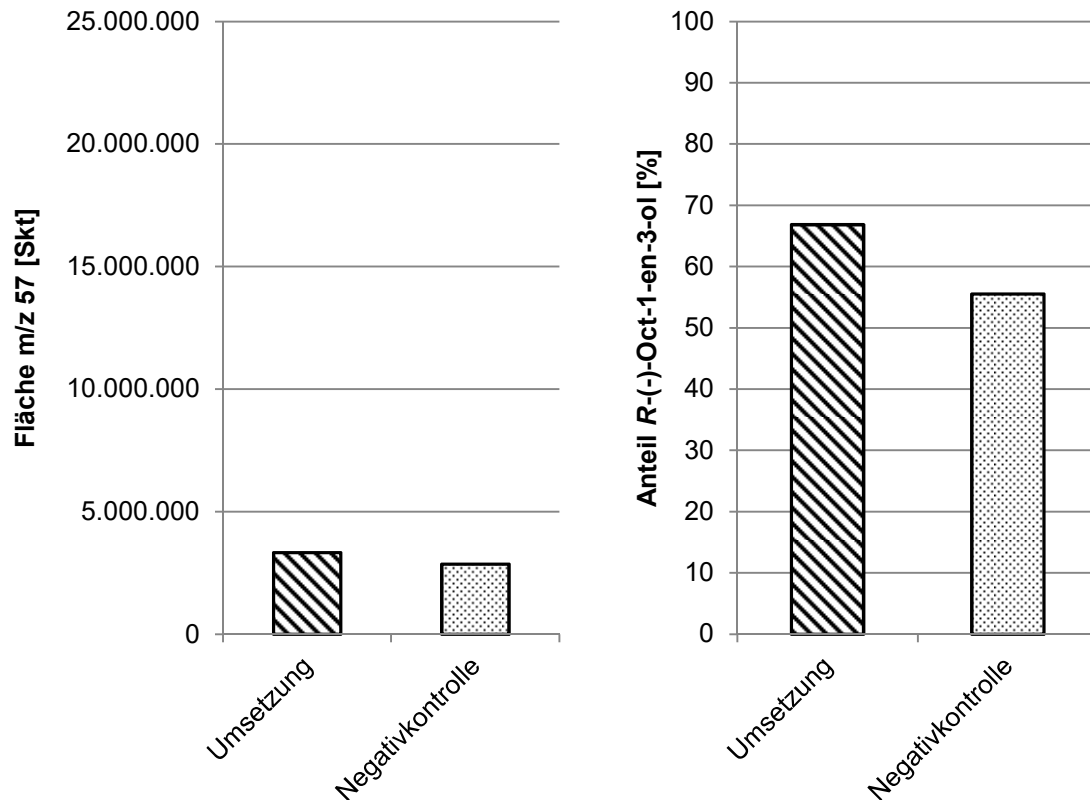


Abb. 3.29: HPL-Aktivität der Fraktion 21 der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75): Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des *R*-(-)-Enantiomers (rechts)

Bei der Umsetzung von 10-HPOD mit der Enzymlösung Fraktion 22 wurde eine starke Bildung von Oct-1-en-3-ol beobachtet. Das Enantiomerenverhältnis betrug etwa 94% zu 6% zu Gunsten der *R*-(-)-konfigurierten Form (Abb. 3.30). In der Negativkontrolle wurde nur eine geringe Menge Oct-1-en-3-ol und ein fast ausgeglichenes Enantiomerenverhältnis festgestellt. Die Enzymlösung zeigt eine starke HPL-Aktivität. Die Fraktion 22 umfasst den Molekulargewichtsbereich von etwa 53 kDa bis 66 kDa.

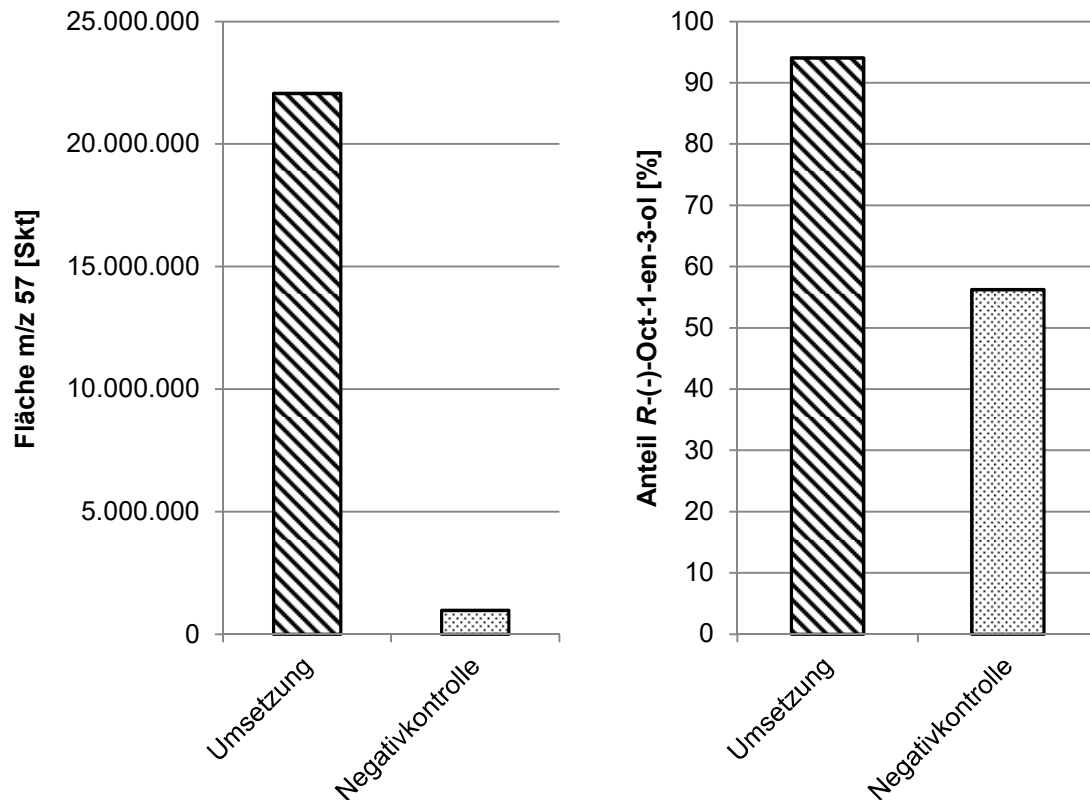


Abb. 3.30: HPL-Aktivität der Fraktion 22 der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75): Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des *R*-(-)-Enantiomers (rechts)

Bei der Untersuchung der HPL-Aktivität von Fraktion 23 wurde in der Umsetzung eine deutliche Bildung von Oct-1-en-3-ol festgestellt. Das Enantiomerenverhältnis wies einen starken Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers auf (Abb. 3.31). In der Negativkontrolle wurde eine deutlich geringere Menge Oct-1-en-3-ol mit einem etwa ausgeglichenen Enantiomerenverhältnis nachgewiesen. Die Fraktion 23 zeigte folglich HPL-Aktivität; dies jedoch in geringerem Maße als Fraktion 22. Die Fraktion 23 beinhaltet Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen ca. 53 kDa und 42 kDa.

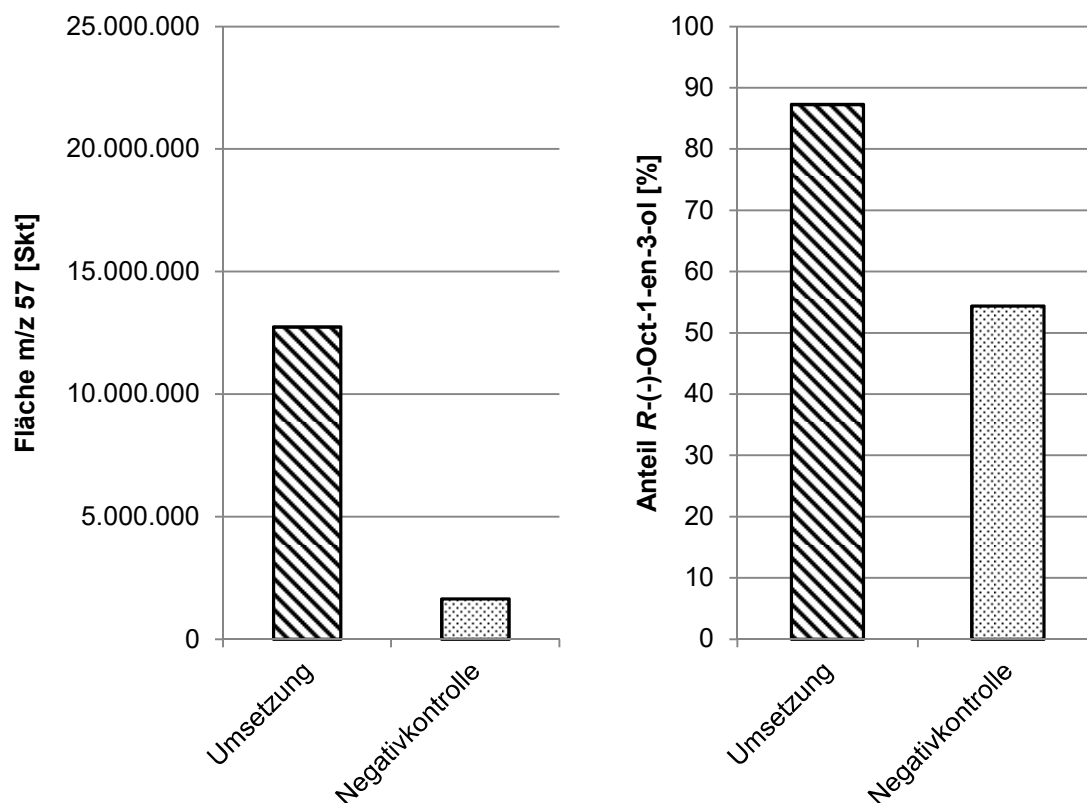


Abb. 3.31: HPL-Aktivität der Fraktion 23 der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75): Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des *R*(-)-Enantiomers (rechts)

Die Umsetzung von 10-HPOD mit der Enzymlösung Fraktion 24 ergab nur geringfügig höhere Gehalte an Oct-1-en-3-ol als in der zugehörigen Negativkontrolle (Abb. 3.32). Dementsprechend war das Enantiomerenverhältnis in der Umsetzung nur geringfügig zu Gunsten der *R*(-)-Form verschoben und in der Negativkontrolle fast racemisch. In der Fraktion 24 wurde folglich keine HPL-Aktivität festgestellt.

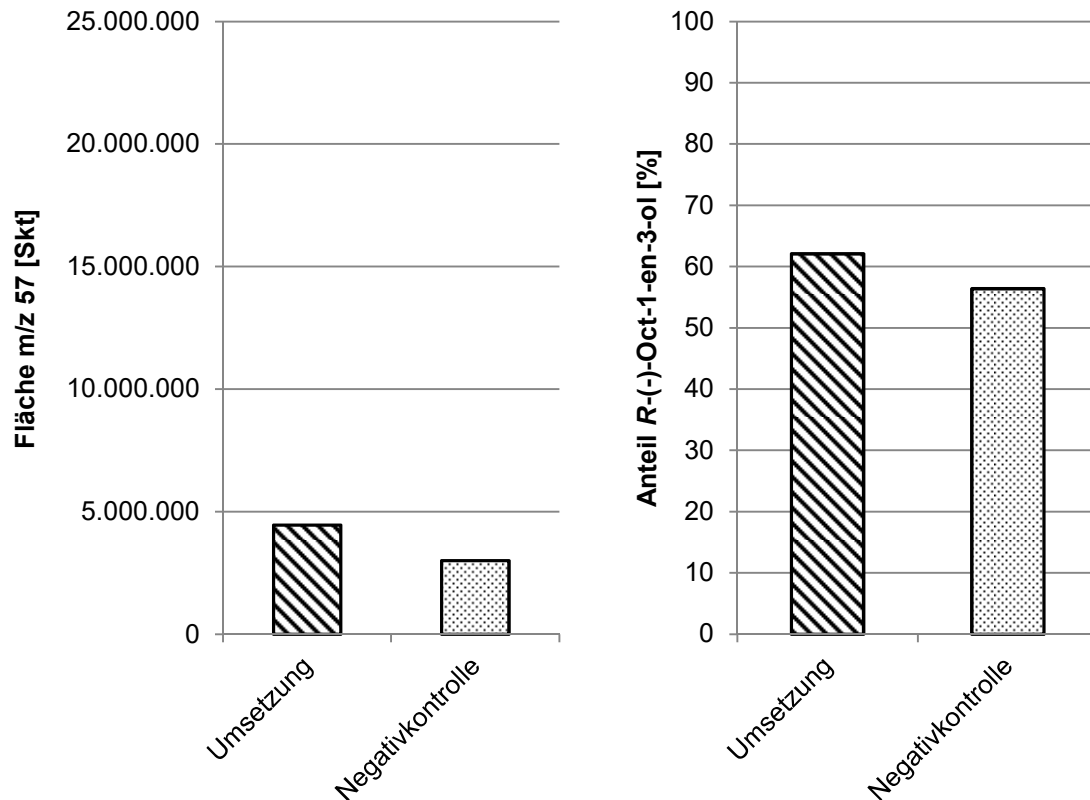


Abb. 3.32: Hydroperoxidlyase-Aktivität der Fraktion 24 der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75): Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R-(-)-Enantiomers (rechts)

Durch die Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex 75-Trennsäule erfolgte eine Auftrennung des Extraktes in engere Größenbereiche. Durch den anschließenden Aktivitätsassay ausgewählter Fraktionen wurde die HPL-Aktivität präziser zugeordnet. Das Molekulargewicht des Zielenzym wurde dabei auf den Größenbereich zwischen 66 kDa und 42 kDa eingegrenzt.

3.4.5 Finale Reinigungsstrategie

Als finale Strategie für die Reinigung des Zielenzym aus dem Extrakt wurde eine Kombination aus der beschriebenen Gelfiltrationschromatographie auf der Superdex 75-Trennsäule und einer nachfolgenden Ionenaustauschchromatographie gewählt (2.11.6). Als Ausgangsmaterial wurden dabei Fruchtkörper von *L. edodes* verwendet.

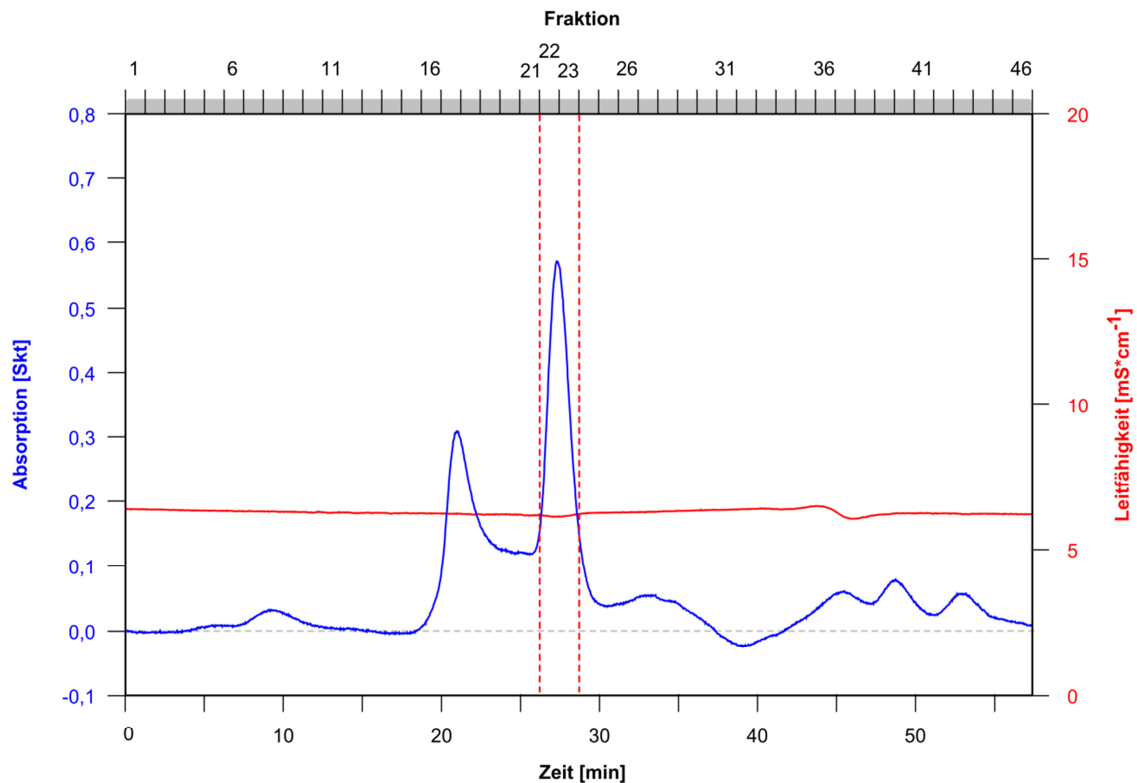


Abb. 3.33: Erste Stufe der Reinigung: Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex 75-Trennsäule (blau: Absorption bei $\lambda=280$ nm (Skt), rot: Leitfähigkeit (mS cm^{-1}), rot gestrichelt: Fraktionen mit Zielenzym)

Die Fraktionen 22 und 23 der Gelfiltrationschromatographie, welche die stärkste HPL-Aktivität enthielten (vgl. 3.4.4.2, Abschnitt Gelfiltrationschromatographie mit der Superdex 75-Trennsäule), wurden direkt zur Ionenaustauschchromatographie eingesetzt (Abb. 3.33).

Bei der Ionenaustauschchromatographie erfolgte eine Trennung in drei Elutionsbereiche (Abb. 3.34). Das gesuchte Enzym ist in dem bei 20% Puffer B eluierenden Peak zu erwarten (vgl. 3.4.4.1). Entsprechend wurden die Fraktionen 28 – 32 vereinigt und nach 2.11.8 auf HPL-Aktivität geprüft.

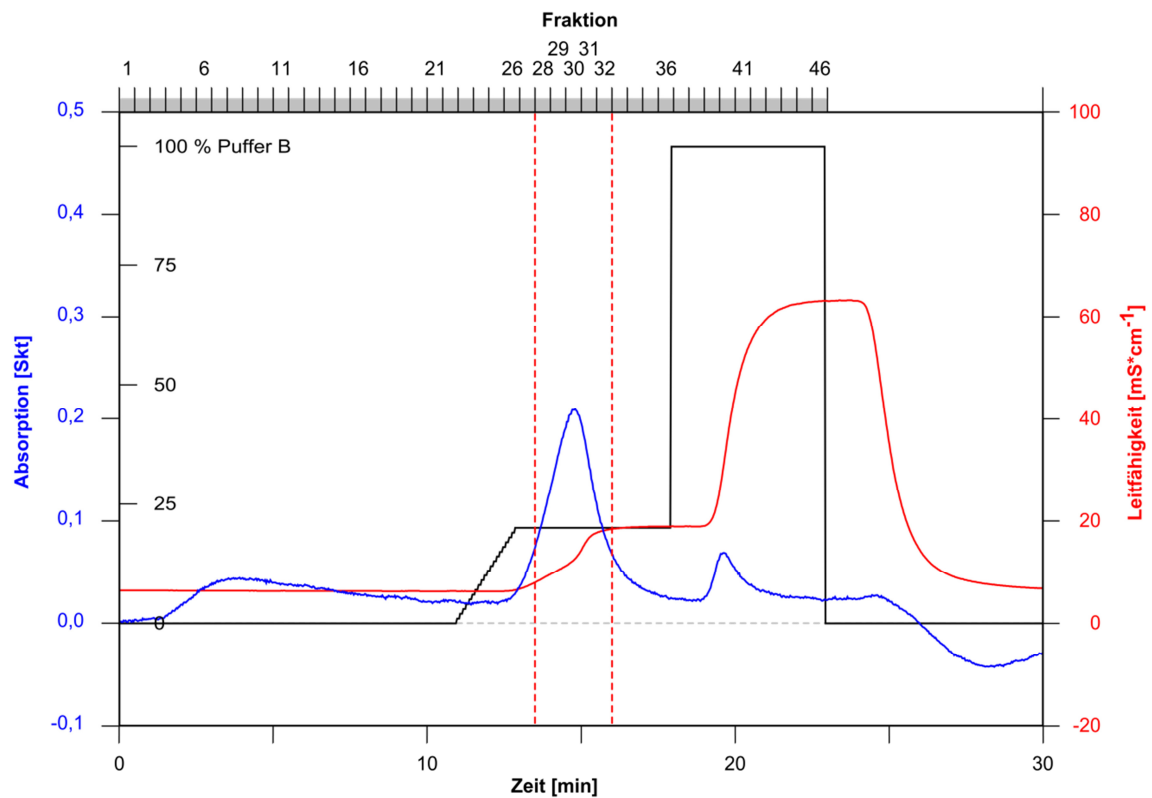


Abb. 3.34: FPLC-Chromatogramm der Fraktion 22: Ionenaustauschchromatographie an einer Q FF-Anionenaustauschersäule (schwarz: Anteil an Puffer B (%), blau: Absorption bei $\lambda=280$ nm (Skt), rot: Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), rot gestrichelt: vereinigte Fraktionen mit Zielenzym)

Bei der Untersuchung der HPL-Aktivität der vereinigten Fraktionen wurde in den Ansätzen der Umsetzung die Bildung von Oct-1-en-3-ol nachgewiesen (Abb. 3.35). Das gebildete Oct-1-en-3-ol wies einen starken Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers auf. Im Gegensatz dazu wurden in den Negativkontrollen mit hitzeinaktivierter Enzymlösung deutlich geringere Mengen Oct-1-en-3-ol mit racemischer Enantiomerenverteilung festgestellt.

Die gereinigte Enzymlösung zeigte leichte HPL-Aktivität und wurde weiter proteinanalytisch untersucht (3.4.6).

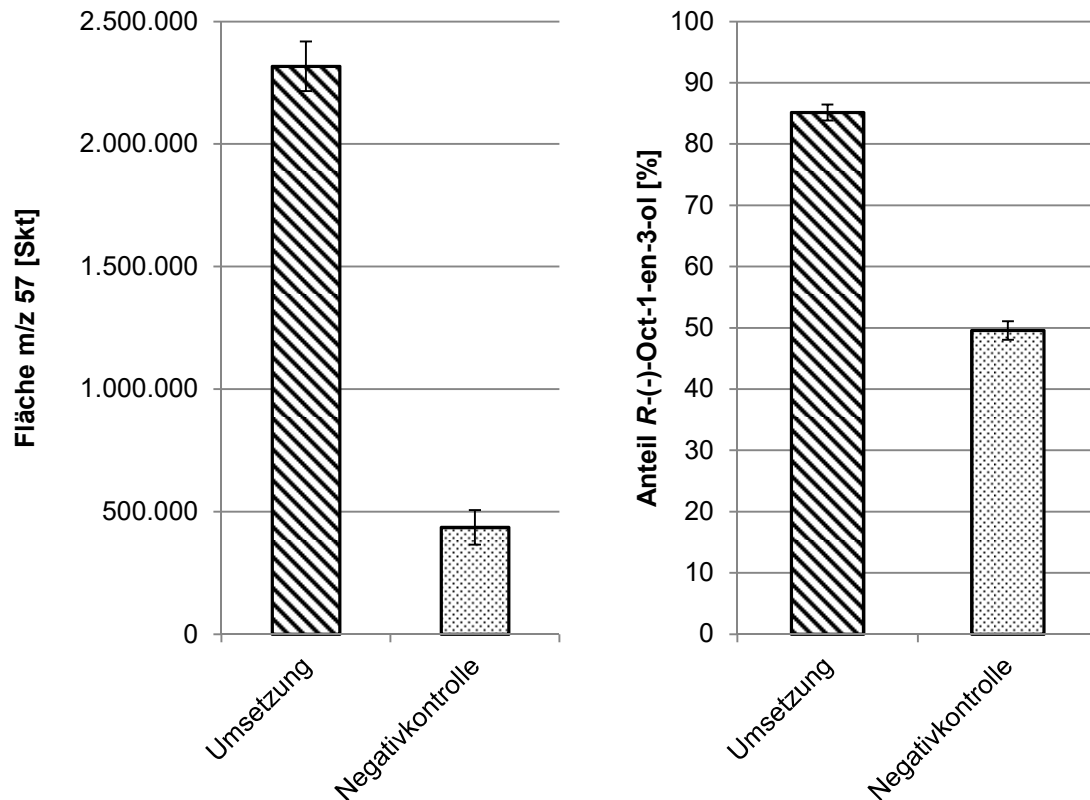


Abb. 3.35: HPL-Aktivität der gereinigten Enzymlösung: Gehalte an Oct-1-en-3-ol (links, dargestellt als Fläche m/z 57 des Oct-1-en-3-ol-Peaks) und Anteil des R(-)-Enantiomers (rechts)

3.4.6 Elektrophorese und Sequenzierung

Die gereinigte Enzymlösung nach 2.11.6 wurde für die weitere Proteinanalytik zunächst durch eine Fällung nach 2.12.1 konzentriert. Das Präzipitat wurde nach dem in 2.12.2 beschriebenen Protokoll mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mittels kolloidalem Coomassie (2.12.3).

In der gereinigten Enzymlösung wurden mittels SDS-PAGE mit kolloidaler Coomassiefärbung zwei schwache Proteinbanden detektiert (Abb. 3.36). Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand der Proteinstandards nach 2.12.4 berechnet und betrug 62 kDa bzw. 55 kDa.

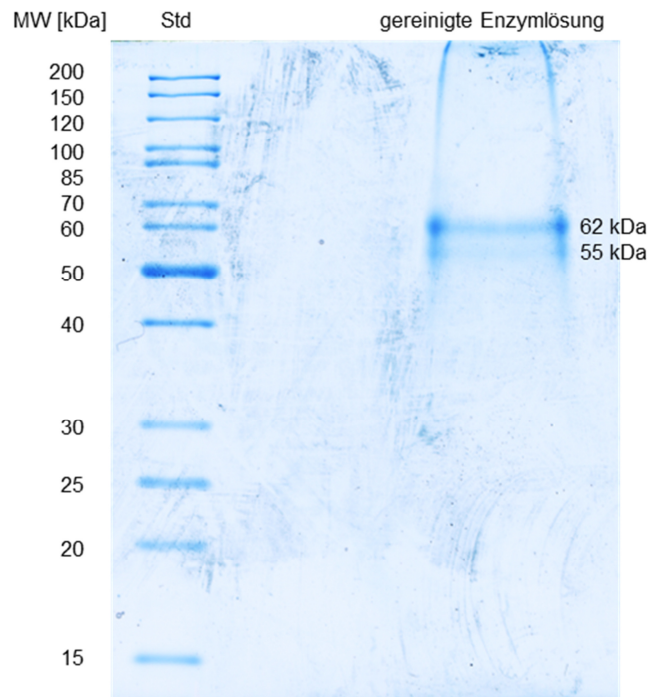


Abb. 3.36: Elektrophoretische Analyse der gereinigten Enzymlösung: SDS-PAGE nach kolloidaler Coomassie-Färbung (MW: Molekulargewicht, Std: Standard)

Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS sowie zur *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS verwendet (2.12.5).

Die Analyse der Peptide des tryptischen Verdau durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lochnit ergab keine Identifikation eines bekannten Proteins aus Pilzen.

Durch tryptischen Verdau der Proteine und anschließende massenspektrometrische Analyse der Peptide mittels ESI-MS/MS wurden bei der *de novo*-Sequenzierung durch Dr. Nimitz Peptidsequenzen generiert. Eine Suche mit den Sequenzen der intensivsten Peptide in den Datenbanken Swiss-Prot (Fungi/Basidiomycota) sowie in veröffentlichten Genomen von Pilzen (JGI/NCBI; Ascomycota und Basidiomycota) ergab keine nennenswerten Homologien.

Durch die Untersuchung der Peptide des tryptischen Verdau mittels massenspektrometrischer Analyse nach flüssigchromatographischer Trennung (HPLC-ESI-MS/MS) wurden weitere Peptidsequenzen generiert. Der Abgleich dieser Sequenzen mit der Datenbank (NCBI-Fungi) ergab Treffer auf eine Reihe von Proteinen und hypothetischen Proteinen. Exemplarisch sind in Tab. 3.21 und Tab. 3.22 jeweils fünf Treffer pro Bande mit hohen *scores* aufgeführt.

Tab. 3.21: Mittels HPLC-ESI-MS/MS generierte Peptidsequenzen aus der 62 kDa großen Bande sowie zugeordnete Treffer des Datenbankabgleichs

Peptide *	Datenbankeintrag (Organismus; NCBI identifier)	score
TIDDPETFNYTR VAFTGSTVVGR VDVQLSSGcLR YALSNYQVK AGNETTYGLAAAVHTTNLNTAIR YGGWADK	<i>aldehyde dehydrogenase</i> (<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT 8656; 378726445)	666,94
AGFAGDDAPR GYSFTTTAER IIAPPER DSYVGDEAQS	<i>actin beta/gamma 1</i> (<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> ; 406601348)	227,32
GNPTVEVELTTEK NVNDVIAPAFVK VNQIGTLSESIK AVDDFLISLDGTANK	<i>chain A, enolase</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; 1065025)	271,66
ALAAQQAAQDAR ELAEEGYSGVEVR GLSAVAQcESLR VTPTVTDIIIR	<i>40S ribosomal protein S3</i> (<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT 8656; 378725981)	387,26
FAADAVTLK LIDPAVEYGK EILQIVPGK YKPQDATTNPSLILAASK	<i>transaldolase</i> (<i>Cladophialophora carrionii</i> CBS 160.54; 565934590)	197,88

* Die Abkürzung der Aminosäuren entspricht dem internationalen Einbuchstabencode.

Tab. 3.22: Mittels HPLC-ESI-MS/MS generierte Peptidsequenzen aus der 55 kDa großen Bande sowie zugeordnete Treffer des Datenbankabgleichs

Peptide *	Datenbankeintrag (Organismus; NCBI identifier)	score
GNPTVEVELTTEK TAGIQIVADDLTVTNPK AVDDFLISLDGTANK VNQIGTLESSEIK SIVPSGASTGVHEALEmR	<i>chain A, enolase</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; 1065025)	351,47
TIDTDPETFNYTR VDVQLSSGcLR VAFTGSTVVGR VTLELGGK YALSNYTQVK	<i>aldehyde dehydrogenase</i> (<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT 8656; 378726445)	490,41
ASPTEVSSILEQR GVQEEAGLAETGR VLSVGDGIAR QSVNQPVTGLK	<i>ATP synthase subunit alpha</i> (<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15; 389630624)	522,70
GELVTDDIcK IGEAVGVK IQASYVGNR	<i>alcohol dehydrogenase 3</i> (<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT 8656; 378728947)	169,78
ALQDGPQVVVGTPGR GSDVIAQAQSGTGK	<i>eukaryotic initiation factor 4A</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i> NAm1; 154279240)	287,01

* Die Abkürzung der Aminosäuren entspricht dem internationalen Einbuchstabencode.

4 Diskussion

4.1 Biotechnologische Produktion von Aromaextrakten

Gemäß Art. 16 (2) VO (EG) 1334/2008 darf der Begriff „natürlich“ „zur Bezeichnung eines Aromas nur verwendet werden, wenn der Aromabestandteil ausschließlich Aromaextrakte und/oder natürliche Aromastoffe enthält.“ Nach Art. 3 (2) lit. c VO (EG) 1334/2008 ist ein natürlicher Aromastoff, ein „Aromastoff, durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen, die als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden“. Ein Aromaextrakt ist gemäß Art. 3 (2) lit. d Ziffer ii VO (EG) 1334/2008 ein „Erzeugnis, das kein Aromastoff ist und gewonnen wird aus Stoffen pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ursprungs, die keine Lebensmittel sind, und zwar durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren, wobei die Stoffe als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren aufbereitet werden“. Die in dieser Arbeit beschriebene submerse Kultivierung von *L. edodes* und der nachfolgende Zellaufschluss sind dabei als „geeignetes mikrobiologisches Verfahren“ anzusehen. Als herkömmliche Lebensmittelzubereitungsverfahren sind weiterhin in Anh. II VO (EG) 1334/2008 u. a. Extraktion, einschließlich Lösemittelextraktion gemäß der Richtlinie 88/344/EWG, sowie „mikrobiologische Prozesse“ genannt. Unter Einhaltung der genannten rechtlichen Anforderungen können der biotechnologisch gewonnene Aromaextrakt bzw. die Aromastoffe als „natürlich“ bezeichnet werden.

Die Bezeichnungen „Aromaextrakt“ bzw. „natürliche Aromastoffe“ werden vom Verbraucher unter anderem im Zutatenverzeichnis von verpackten Lebensmitteln wahrgenommen.

In der Literatur ist bereits die Nutzung verschiedener Basidiomyceten in Biotransformationen zu Aromaextrakten und -stoffen und *de novo*-Biosynthesen von Aromastoffen beschrieben worden. Tab. 4.1 gibt einen Überblick anhand einiger Beispiele.

Tab. 4.1: Beispiele für die Produktion von Aromaextrakten und -stoffen mit submers kultivierten Basidiomyceten

Basidiomycet	Biosyntheseweg	Produkt	Literatur
<i>Tyromyces chioneus</i>	Biotransformation von Apfeltrester (u. a. (<i>E</i>)-Zimtsäure als <i>precursor</i>)	Aromaextrakt mit süßlichem Geruch nach Kompott, Pflaumenmus (u. a. 3-Phenylpropanal, 3-Phenylpropan-1-ol)	Bosse <i>et al.</i> (2013)
<i>Nidula niveotomentosa</i>	<i>De novo</i> -Synthese oder Biotransformation des <i>precursors</i> L-Phenylalanin	4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on (Himbeerketon)	Böker <i>et al.</i> (2001), Zorn <i>et al.</i> (2003)
<i>Pleurotus sapidus</i>	Biotransformation von (+)-Valencen mit lyophilisiertem Myzel	(+)-Nootkaton	Fraatz <i>et al.</i> (2009)

Für die Produktion von C₈-Aromastoffen bzw. Aromaextrakten mit „pilziger“ Geruchsqualität wurden neben dem hier beschriebenen System mit *L. edodes* (vgl. auch Heuger *et al.* 2015) in der Literatur weitere Ansätze mit den Basidiomyceten *Pleurotus pulmonarius* (Belinky *et al.* 1994) und *A. bisporus* (Husson *et al.* 2001, Morawicki und Beelman 2008) sowie den Ascomyceten *Morchella esculenta* (Schindler und Seipenbusch 1990), *Penicillium camemberti* (Husson *et al.* 2005) und *Neurospora* Spezies (de Carvalho *et al.* 2011) beschrieben. Jedoch scheint keiner dieser Prozesse wirtschaftliche Relevanz gewonnen zu haben.

Im Folgenden sollen unter dem Begriff „Aromaextrakt“ neben den Aromaextrakten im Sinne der oben genannten VO (EG) 1334/2008 auch weitere Extrakte wie beispielsweise HS-SPME-Extrakte oder Lösungsmittel-extrakte nach SAFE verstanden werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Herstellung von Aromaextrakten mit „pilziger“ Geruchsqualität erfolgte durch Submerskultur von *L. edodes* und anschließendem Zellaufschluss des Myzels zur Gewinnung der Aromastoffe. Sowohl die Kultivierung

(4.1.1) als auch der Prozess zur Aromabildung (4.1.2) wurden optimiert. Weiterhin werden die Untersuchung des Enantiomerenverhältnisses von Oct-1-en-3-ol (4.1.3) und die Bildung weiterer C₈-Aromastoffe (4.1.4) diskutiert.

4.1.1 Optimierung der Kultivierung

Die Kultivierung von *L. edodes* zur biotechnologischen Herstellung von Aromakomplexen erfolgte in einer zweistufigen Submerskultur in Schüttelkolben. Die Vorkultur diente der Produktion von homogen wachsendem Myzel für die Inokulation des Hauptkulturmediums. Das Ziel der Hauptkultur war das Wachstum von Myzel und die Induktion der an der Aromabildung beteiligten Enzyme. Der Zusatz von Pflanzenölen oder Fettsäuren zum Kulturmedium kann die Aktivität an der Aromabildung beteiligter Enzyme wie Lipoxygenasen und Hydroperoxidlyasen steigern (Husson *et al.* 2002, 2005). Als Ausgangspunkt für die Optimierung wurde daher ein von Belinky *et al.* (1994) für die Produktion von Oct-1-en-3-ol durch *P. pulmonarius* beschriebenes, komplexes Medium mit Sojaöl („Belinky-Medium“) gewählt. Als Vergleich wurde ein einfaches Medium mit Malzextrakt herangezogen und der Einfluss verschiedener Medienbestandteile auf das Wachstum sowie die Bildung von C₈-Aromastoffen untersucht. Die Beurteilung des Wachstums erfolgte über die Trockenmasse. Der Gehalt des Schlüsselaromastoffs Oct-1-en-3-ol nach Aufschluss des Myzels wurde als Maß für die Fähigkeit zur Bildung der Aromastoffe genommen.

Das Wachstum wie auch der Gehalt an Oct-1-en-3-ol fielen beim Vergleichsmedium (Medium I in Tab. 3.1) deutlich geringer aus als beim Belinky-Medium (Medium III). Der Zusatz von Sojaöl zum Vergleichsmedium steigerte sowohl das Wachstum als auch die Fähigkeit zur Bildung von Oct-1-en-3-ol, jedoch wurden die jeweiligen Kennzahlen des Belinky-Mediums (III) nicht übertroffen. Bei Medium III wurde beobachtet, dass die Pellets bei der Ernte des Myzels feste Bestandteile des Mediums enthielten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich das Sojamehl nicht vollständig löste und die Partikel vom Pilz überwachsen wurden. Diese Beobachtung wurde ebenfalls bei den anderen Medien mit Sojamehl (IV-VII) gemacht. Aufgrund der enthaltenen Medienbestandteile suggerieren die Trockenmassen in diesen Medien ein höheres Wachstum des Pilzes als tatsächlich vorhanden war. Daraus

ergibt sich, dass die geringeren Trockenmassen in den Medien VIII – XI (Tab. 3.1) nicht zwingend ein schlechteres Wachstum des Pilzes bedeuten.

Der Zusatz des Emulgators Tween[®] 80 (Medium V) erfolgte mit der Absicht, das Wachstum durch eine bessere Verfügbarkeit des Sojaöls als C-Quelle zu fördern. Mit einer geringfügig höheren Trockenmasse ging allerdings eine geringere Bildung von Oct-1-en-3-ol einher. Ein Ersatz des Sojaöls durch Tween[®] 80 (Medium IV) war ebenso nicht erfolgreich.

In den weiteren Schritten erfolgte eine Vereinfachung des Mediums mit dem Ziel, Kosten zu sparen. Der im Belinky-Medium verwendete Citratpuffer erwies sich als verzichtbar (Medium VI). Die Verringerung des Gehalts an Sojamehl auf zunächst die Hälfte der ursprünglichen Menge (Medium VII) und später der vollständige Verzicht darauf (Medium VIII) bewirkten geringfügig verminderte Trockenmassen. Die Fähigkeit zur Produktion von Oct-1-en-3-ol blieb fast unverändert. Auf die Verwendung von Sojamehl konnte folglich verzichtet werden. Belinky *et al.* (1994) berichten, dass bei der Untersuchung einer Reihe unterschiedlicher Medien für die Kultivierung von *P. pulmonarius* auffällig war, dass in Medien mit Sojabestandteilen (Mehl, Öl, Presskuchen) durchweg höheres Wachstum und stärkere Bildung von Oct-1-en-3-ol als in einem definierten Medium gefunden wurden. Allerdings gehen die Autoren nicht auf mögliche Verfälschungen der als Wachstumsparameter genutzten Trockenmasse durch ungelöste Medienbestandteile ein und differenzieren nicht zwischen dem Einfluss des verwendeten Sojamehls und des Sojaöls.

Eine Verkürzung der Kulturdauer um zwei Tage auf acht Tage bewirkte eine geringfügig verringerte Produktion von Biomasse; diese zeigte jedoch mit im Mittel etwa 900 µg Oct-1-en-3-ol g⁻¹ TM eine deutlich stärkere Aromabildung.

Aus einer weiteren Vereinfachung des Mediums durch Verzicht auf *corn steep liquor* als Medienbestandteil (IX) resultierte deutlich schlechteres Wachstum. Durch den Verzicht auf Sojamehl, Citratpuffer sowie *corn steep liquor* wurde das Angebot an Kohlenstoff und Stickstoff im Medium verringert sowie möglicherweise das C/N-Verhältnis verändert. Ob das schlechtere Wachstum durch einen Mangel an verfügbarem Kohlenstoff bedingt war, wurde überprüft, indem ein Emulgator bzw. mit Glucose eine gut verwertbare Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden. Der erneute Versuch, eine bessere Verfügbarkeit der C-Quelle Sojaöl durch Zusatz von Tween[®] 80 zu erzielen (Medium X), war in Bezug auf das Wachstum erfolgreich. Ebenso wurde im Medium mit Glucose eine stärkere Biomasseproduktion

beobachtet. Gleichzeitig war jedoch die Bildung von Oct-1-en-3-ol im Medium mit Tween[®] 80 stark verringert. Auch das Myzel aus dem Medium mit Glucose (XI) wies eine geringere Bildung an Aromastoffen auf.

Diese Ansätze wurden folglich verworfen und das Medium VIII (Tab. 3.1) und eine Dauer von acht Tagen für die Hauptkultur für die weiteren Experimente gewählt.

Belinky *et al.* (1994) zeigten in ihrer Arbeit zur Kultivierung von *P. pulmonarius* einen Einfluss der Sojabestandteile Sojamehl und Sojaöl auf Wachstum und Bildung von Aromastoffen auf und nahmen eine Induktion von Enzymen des Lipidmetabolismus an. Als Beleg zogen sie die polarographisch gemessene Lipoxygenase-Aktivität heran. Jedoch bleibt unklar, ob ein Zusammenhang der gemessenen Enzymaktivität mit der Bildung von Oct-1-en-3-ol besteht, da in *P. pulmonarius* ebenso eine 13-LOX Aktivität bekannt ist (Assaf *et al.* 1997).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass für eine starke Aromabildung durch *L. edodes* Sojaöl als Mediumbestandteil unverzichtbar war. Das Sojamehl hingegen war nicht notwendig. Sojaöl ist reich an Linolsäure (im Mittel 53% der Fettsäuren (Belitz *et al.* 2008; Kap. 14.1.1, S.671)), welche *precursor* von Oct-1-en-3-ol ist und mit etwa 50% der gesamten Fettsäuren auch die Hauptfettsäure in submers kultiviertem Myzel von *L. edodes* darstellt (Stahl und Klug 1996). Eine Induktion der an der Aromabildung beteiligten Enzyme ist daher durchaus plausibel und steht im Einklang mit vergleichbaren Berichten zur Bildung von Oct-1-en-3-ol durch den Ascomyceten *P. camemberti* (Husson *et al.* 2005, 2002). Interessanterweise fanden Husson *et al.* (2005) eine stärkere Induktion durch einen Zusatz von Sojaöl als durch freie Linolsäure im Medium.

Durch die Vereinfachungen konnte ein kostengünstigeres Medium entwickelt werden. Die Verkürzung der Hauptkulturdauer um zwei Tage auf acht Tage trägt ebenfalls zu einer Kostenverringerung bei, obwohl die Kulturdauer noch vergleichsweise lang ist.

So berichten Belinky *et al.* (1994) für die Kultivierung des Basidiomyceten *P. pulmonarius* von einer deutlich kürzeren Hauptkultur von vier Tagen. Schindler und Seipenbusch (1990) beschreiben für die Kultivierung des Ascomyceten *M. esculenta* im Fermenter eine Kulturdauer von drei Tagen. Lediglich die Submerskultur von *P. camemberti* für die Produktion von Oct-1-en-3-ol benötigte mit zehn Tagen eine vergleichbar lange Zeit für die Erzeugung von Biomasse (Husson *et al.* 2005).

Die Verwendung von *L. edodes* kann auch dadurch vorteilhaft sein, dass der Pilz unter dem Namen Shiitake ein allgemein bekannter Speisepilz ist. Bei der Angabe als Zutat im Zutatenverzeichnis eines Lebensmittels findet eine Formulierung wie „Aromaextrakt aus Shiitake“ vermutlich eine größere Akzeptanz des Verbrauchers als „Aroma“ bzw. „natürliches Aroma“.

4.1.2 Optimierung der Bildung von Oct-1-en-3-ol

Der Prozess zur Bildung der C₈-Aromastoffe wurde in Bezug auf den Einfluss des Zellaufschlusses, den Einfluss der Verfügbarkeit des *precursors* Linolsäure sowie die Auswirkung der Inkubationszeit untersucht. Ferner wurde die Verwendung von lyophilisiertem Myzel als Enzymquelle getestet und der Effekt des Einsatzes von Proteaseinhibitoren geprüft.

Eine Trennung der submersen Kultivierung von *L. edodes* und des Prozesses zur Bildung der Aromastoffe ist sowohl für die Untersuchungen im Labor als auch für eine mögliche spätere industrielle Anwendung des Verfahrens wünschenswert, da so flexiblere Abläufe ermöglicht würden. Dies erfordert jedoch eine Lagerung des geernteten Myzels ohne Verlust an Enzymaktivität. Die Gefriertrocknung stellt ein schonendes Verfahren dar, um biologische Proben lagerfähig zu machen.

Daher wurde Myzel von *L. edodes* lyophilisiert und in Experimenten zur Bildung von C₈-Aromastoffen eingesetzt. Die Ausbeuten an Oct-1-en-3-ol waren dabei auch nach einer 10-minütigen Phase zum Rehydratisieren sehr gering (3.1.2.1), sodass von einem weitgehenden Verlust der Enzymaktivitäten auszugehen ist. Die Lyophilisation stellt daher keinen geeigneten Verfahrensschritt dar und eine Trennung von Kultivierung und Aromabildung war nicht möglich. Die weiteren Untersuchungen erfolgten daher jeweils mit frisch geerntetem Myzel.

Der Einfluss der Zellaufschlusstechnik auf die Produktbildung wurde vergleichend durch die Verwendung von Ultraturrax und Rührwerkskugelmühle an Myzel, welches in Medium III gewachsen war, untersucht (3.1.2.2).

Bei beiden Verfahren handelt es sich um mechanische Aufschlusstechniken, welche die Einwirkung von Scherkräften auf die Zellen ausnutzen. In den meisten publizierten Untersuchungen wurden ebenfalls mechanische Verfahren gewählt (Wurzenberger und Grosch 1982, Belinky *et al.* 1994, Assaf *et al.* 1995).

Ziel des Zellaufschlusses ist die Freisetzung der intrazellulären Enzyme mit möglichst geringen Aktivitätsverlusten. Daher wurde der Aufschluss in einem in der Literatur (Belinky *et al.* 1994) als geeignet beschriebenen Puffer sowie im Falle der Rührwerkskugelmühle unter Kühlung durchgeführt, um Aktivitätsverluste durch Denaturierung zu vermeiden.

Der Vergleich der Aufschlüsse mittels Ultraturrax und Rührwerkskugelmühle ergab keine wesentlichen Unterschiede in den gebildeten Mengen an Oct-1-en-3-ol. Demnach sind beide Techniken gleich gut für die Freisetzung der Enzymaktivitäten geeignet. Für die weiteren Experimente wurde der Aufschluss mittels Ultraturrax genutzt, da dieser für den Labormaßstab in Bezug auf eingesetzte Probenmenge, Zeit sowie Aufwand besser geeignet ist.

Wie oben angeführt wurde auch in publizierten Studien zumeist ein mechanischer Zellaufschluss verwendet. Assaf *et al.* (1997) untersuchten bei ihrer Arbeit zur Bildung von Oct-1-en-3-ol (und 13-HPOD) aus Linolsäure durch submers kultiviertes Myzel von *P. pulmonarius* als Einflussparameter auch die Dauer des Homogenisierens. Bereits 30 s Homogenisieren waren unabhängig vom Zusatz von Linolsäure ausreichend, um die höchsten Gehalte an Oct-1-en-3-ol zu erzielen. Morawicki und Beelman (2008) untersuchten die Bildung von Oct-1-en-3-ol durch Homogenate von Fruchtkörpern bzw. Stümpfen von Fruchtkörpern von *A. bisporus* in einem Bioreaktor. Während die Partikelgröße mit zunehmender Homogenisierungsdauer (0,5 bis 2,0 min) im Standmixer abnahm, blieb die Ausbeute an Oct-1-en-3-ol unverändert. Die Autoren folgerten, dass aufgrund des relativ weichen Pilzgewebes bereits kurze Homogenisierungsdauern zufriedenstellende Aufschlussergebnisse liefern. Da in den oben beschriebenen Experimenten eine Aufschlussdauer von 2 min (Ultraturrax) bzw. 10 min in der Rührwerkskugelmühle verwendet wurde, ist auch hier von einem ausreichenden Aufschluss auszugehen. Die Aufschlussdauer wurde daher nicht optimiert.

Für viele andere Pilze ist bekannt, dass der Zusatz des *precursors* Linolsäure zu Homogenaten zu einer Steigerung der Bildung von Oct-1-en-3-ol führt (so bspw. bei *Agaricus campestris* (Tressl *et al.* 1982), *P. pulmonarius* (Assaf *et al.* 1997) und *A. bisporus* (Morawicki *et al.* 2005b)). Deshalb wurde die Auswirkung einer Supplementierung des Puffers, der für die Homogenisierung verwendet wurde, mit emulgierter Linolsäure untersucht.

Der Zusatz von Linolsäure führte bereits in einer Konzentration von 2 mM im Puffer zu einer deutlichen Steigerung der Bildung von Oct-1-en-3-ol (vgl. Abb. 3.3). Dass bereits eine recht geringe Zugabe von Linolsäure einen so starken Effekt bewirkt, überrascht zunächst, da Linolsäure mit Anteilen von etwa 50% bis zu 60% der Fettsäuren Hauptfettsäure des submers kultivierten Myzels von *L. edodes* ist (Stahl und Klug 1996, Lobanok *et al.* 2003). Jedoch ist der Lipidanteil im Myzel mit 8% bis 9% (Lobanok *et al.* 2003) insgesamt recht gering und es ist davon auszugehen, dass die Linolsäure in Lipiden gebunden vorliegt. Die Untersuchungen von Wurzenberger und Grosch (1982) zeigen, dass die beteiligten Enzyme freie Linolsäure als Substrat umsetzen. Ob auch veresterte Linolsäure als Substrat akzeptiert wird, ist nicht bekannt. Ist dies nicht der Fall, wäre die Verfügbarkeit der endogenen Linolsäure auch von der Freisetzung durch Lipasen oder Phospholipasen abhängig (Combet *et al.* 2006). Daher wird die Verfügbarkeit des Substrates bereits durch einen geringen Zusatz deutlich verbessert, sodass eine gesteigerte Bildung von Oct-1-en-3-ol erfolgte.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit entsprechenden Befunden bei anderen Pilzen. Belinky *et al.* (1994) berichten über eine Steigerung der Ausbeute an Oct-1-en-3-ol in vergleichbaren Experimenten mit Homogenaten von *P. pulmonarius* bei Zusatz von Linolsäure (2 mM) von etwa 500 auf ca. 1.500 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM Myzel. Ein höherer Zusatz von 4 bzw. 8 mM Linolsäure rief eine weitere Steigerung der Gehalte an Oct-1-en-3-ol auf ca. 2.300 bzw. 4.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM hervor.

Morawicki *et al.* (2005b) untersuchten die Bildung von Oct-1-en-3-ol und 10-ODA durch Homogenate von Fruchtkörpern von *A. bisporus* in einem 1 L-Bioreaktor unter Verwendung von statistischer Versuchsplanung. Sie ermittelten eine optimale Linolsäurezugabe von 12 mg g^{-1} Frischgewicht Fruchtkörper und prognostizierten unter optimalen Bedingungen eine Ausbeute an Oct-1-en-3-ol von $2,7 \pm 0,4$ mg g^{-1} Frischgewicht Fruchtkörper.

In den Untersuchungen an *L. edodes* wurde bei einer Supplementierung mit 4 mM Linolsäure im Puffer der Homogenisierung jedoch keine weitere Erhöhung der Produktbildung beobachtet (Abb. 3.3). Daher stellte sich die Frage, welche weiteren Parameter neben der Verfügbarkeit des *precursors* die Bildung der Aromastoffe limitieren und optimiert werden können. In Frage kommen u. a. die Stabilität der beteiligten Enzyme sowie die verfügbare Zeit für die Produktbildung. Diese Einflussfaktoren wurden entsprechend untersucht.

Die an der Aromabildung beteiligten Enzyme können u. a. einer Inaktivierung durch Peptidasen unterliegen. Um das Ziel einer längeren Standzeit des Enzymsystems durch Verhinderung eines proteolytischen Abbaus zu erreichen, wurde der Einsatz von Proteaseinhibitoren untersucht. Die Ansätze enthielten einen Zusatz von 2 mM Linolsäure im Puffer, damit das Substrat nicht limitierend war, und wurden nach 15 min Inkubation sowie ohne Inkubationszeit nach dem Aufschluss untersucht. Der Einsatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails bewirkte keine Veränderung der Ausbeute an C₈-Aromastoffen (vgl. Abb. 3.4). Ähnliche Beobachtungen machten Morawicki *et al.* (2005b), die ebenfalls keine Stabilisierung der Enzyme im Homogenat von *A. bisporus* durch Zusatz verschiedener Stoffe, die als Enzymstabilisatoren bzw. Proteaseinhibitoren bekannt sind, erzielten. Der Verlust an Enzymaktivität ist daher wohl nicht auf einen proteolytischen Abbau zurückzuführen.

Bei den 15 min lang inkubierten Ansätzen wurde eine deutliche Erhöhung der Gehalte an Oct-1-en-3-ol gegenüber den nicht inkubierten Proben beobachtet (s. Abb. 3.4). Dies war ebenso bei den Kontrollen ohne Proteaseinhibitor-Cocktail der Fall. Der Einfluss der verfügbaren Zeit für die Produktbildung nach der Freisetzung der Enzyme wurde nachfolgend bei verschiedenen Mengen zugesetzter Linolsäure untersucht.

In den Ansätzen ohne Zusatz und mit einem Zusatz von 2 mM Linolsäure war keine Auswirkung durch Verlängerung der Inkubationszeit festzustellen: die Gehalte nach 0, 15 bzw. 30 min Inkubation unterschieden sich nicht signifikant (vgl. Abb. 3.5). In den Ansätzen mit einer Linolsäurezugabe von 4 mM im Puffer bewirkte eine Inkubation von 15 min jedoch eine Steigerung um etwa 30%, bei 30-minütiger Inkubation des Homogenats wurden mit etwa 6.200 µg Oct-1-en-3-ol g⁻¹ TM die höchsten Ausbeuten erzielt. Während bei geringer Verfügbarkeit von Linolsäure im Reaktionsansatz die Zeit, welche für die Produktbildung vorhanden ist, nicht begrenzend für die Gehalte ist, ändert sich dies bei höherer Substratzugabe. Die Inkubationsdauer wird bei einem Zusatz von 4 mM Linolsäure im Puffer zu einem limitierenden Faktor, was sich auch daran feststellen lässt, dass die Gehalte ohne Inkubation genauso hoch sind wie in den Ansätzen mit 2 mM Linolsäure. Die Resultate zur Inkubationszeit stehen in gutem Einklang mit Ergebnissen von Husson *et al.* (2001), die bei der Umsetzung von Linolsäure mit Homogenaten von *A. bisporus* einen Anstieg des Gehalts an Oct-1-en-3-ol in den ersten 20 Minuten der

Inkubation feststellten. Die Ergebnisse von Morawicki *et al.* (2005b) zur Stabilität der Enzyme im Homogenat von *A. bisporus* zeigten ebenfalls, dass unter den Bedingungen der Inkubation zwar eine rasche Inaktivierung erfolgte, aber nach 30 min noch Restaktivität festgestellt wurde.

Als weitere Einflussfaktoren wurden in publizierten Arbeiten Parameter wie die Verfügbarkeit von Sauerstoff und die Reaktionstemperatur untersucht. Diese wurden im vorliegenden System nicht untersucht, werden jedoch im Folgenden diskutiert.

Unter den optimierten Bedingungen für die Bildung von C₈-Aromen (Kultivierung von *L. edodes* in Medium VIII für 8 d, Zusatz von 4 mM Linolsäure im Puffer und 30 min Inkubation des Homogenats) wurde eine Ausbeute an Oct-1-en-3-ol von etwa 6.200 µg g⁻¹ TM erzielt. Im Vergleich zu den von Belinky *et al.* (1994) für *P. pulmonarius* berichteten Ausbeuten stellt dies eine 1,5-fache Steigerung dar. Weiterhin ist es nach bestem Wissen die höchste Ausbeute für submers kultiviertes Myzel von Basidiomyceten, die bislang berichtet worden ist. Bezogen auf das Volumen betrug der maximale Gehalt an Oct-1-en-3-ol etwa 35 mg L⁻¹ Transformationsansatz.

In der Literatur sind weitere Systeme zur biotechnologischen Produktion von Pilzaromen beschrieben worden, jedoch sind Vergleiche der Ausbeute aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Bezugsgrößen (TM, Protein, Kulturvolumen) nur begrenzt möglich. Sowohl Morawicki *et al.* (2005a,b) und Morawicki und Beelman (2008) als auch Husson *et al.* (2001) arbeiteten mit Fruchtkörpern bzw. Stümpfen von Fruchtkörpern, also emers gewachsenen Teilen, von *A. bisporus*.

Morawicki *et al.* (2005a,b) setzten in ihren Untersuchungen zunächst Fruchtkörper von *A. bisporus* als Enzymquelle ein. Die Fruchtkörper wurden in Puffer homogenisiert und mit den Homogenaten Linolsäure in Bioreaktoren umgesetzt. Die Stabilität der Enzyme wurde bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Unter Nutzung von *design of experiments*-Methoden wurden auch die Einflüsse der Reaktionstemperatur, der Zugabe von Linolsäure, der Rührgeschwindigkeit und Sauerstoffzufuhr auf die Produktion von Oct-1-en-3-ol analysiert (Morawicki *et al.* 2005b). Die Temperatur beeinflusst wesentlich die Inaktivierung der Enzyme. Während die Reaktionstemperatur sowie die Linolsäuremenge sich stark auf die Bildung von Oct-1-en-3-ol im Fermenter auswirkten, war der Einfluss der Sauerstoff-

sättigung in der Reaktionsbrühe gering. Morawicki *et al.* (2005b) prognostizierten unter optimierten Bedingungen Ausbeuten von bis zu 2,7 mg Oct-1-en-3-ol g⁻¹ Fruchtkörper, aber sie berichteten nicht über eine experimentelle Überprüfung. Beim Scale-up der Reaktion erwies sich jedoch die Verfügbarkeit von Sauerstoff als kritisch für die Ausbeute (Morawicki *et al.* 2005a).

In weiteren Arbeiten untersuchten Morawicki und Beelman (2008) den Zusatz des Emulgators Tween[®] 20 und die Verwendung von Filtraten der Homogenate anstelle der Homogenate. Um Kosten zu sparen, prüften sie zudem die Möglichkeit, Stümpfe, welche als Nebenstrom der Fruchtkörperproduktion anfallen, als Enzymquelle einzusetzen, sowie günstigere, 60% reine Linolsäure zu nutzen. Sowohl die Verwendung von Filtraten als auch die Nutzung von 60% reiner Linolsäure führte jeweils zu etwa halbierten Ausbeuten. Die Verwendung von Stümpfen als Enzymquelle mit 60% reiner Linolsäure bewirkte etwas verringerte Gehalte an Oct-1-en-3-ol im Vergleich zu Fruchtkörpern mit 60% reiner Linolsäure (etwa 0,9 gegenüber 1,2 mg g⁻¹ Frischgewicht, Morawicki und Beelman 2008).

Husson *et al.* (2001) berichteten über die Aromabildung durch Homogenate von *A. bisporus* und präsentierten die Untersuchung der optimalen Menge an Linoläure und Protein im Transformationsansatz, die Effekte einer Begasung mit Sauerstoff sowie des Zusatzes verschiedener stabilisierender Agentien auf die Enzymaktivitäten. Ein Linolsäure-Zusatz von 1,5 mM und eine Proteinkonzentration von ca. 1,5 mg mL⁻¹ wurden als optimal ermittelt. Die effektivste Umsetzung von Linolsäure wurde innerhalb der ersten Minuten nach der Homogenisierung festgestellt, jedoch stiegen die Gehalte noch bis etwa 20 min Inkubationsdauer an. Unter Sauerstoffatmosphäre wurden im Vergleich zu Ansätzen mit Luft größere Mengen an Oct-1-en-3-ol gebildet. Der Zusatz von Reduktionsmitteln oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) führte zu verringerter Produktbildung. Unter den optimalen Bedingungen im 2 L-Bioreaktor wurden Ausbeuten an Oct-1-en-3-ol von 380 µg mg⁻¹ Protein bzw. etwa 60 mg L⁻¹ Transformationsansatz erzielt (Husson *et al.* 2001).

Aromaproduktionssysteme, welche auf Ascomyceten als Enzymquelle basieren, sind u. a. von Schindler und Seipenbusch (1990) und Husson *et al.* (2005) vorgestellt worden.

Schindler und Seipenbusch (1990) kultivierten *M. esculenta* im Fermenter in einem Medium mit Pflanzenölen und schlossen das Myzel anschließend auf. Im Homogenat wurde ein Gehalt von etwa 1.200 µg Oct-1-en-3-ol g⁻¹ (Feststoff) erreicht und durch

entsprechende Trocknung des Homogenats ein Pulver mit einem Gehalt von ca. 2.500 $\mu\text{g Oct-1-en-3-ol g}^{-1}$ erhalten.

Husson *et al.* (2005) untersuchten die Bildung von Oct-1-en-3-ol aus Linolsäure durch Homogenate von *P. camemberti*, der in einem definierten Medium mit Sojaölzusatz kultiviert wurde, und erhielten Ausbeuten von 70 $\mu\text{g Oct-1-en-3-ol mg}^{-1}$ Protein. Da jedoch keine Angaben zum Proteingehalt des Myzels gemacht wurden, ist kein direkter Vergleich der Ausbeute mit dem hier vorgestellten System möglich.

Tab. 4.2 gibt eine Übersicht über die oben diskutierten Systeme anhand einiger Merkmale.

Tab. 4.2: Systeme für die Produktion von Oct-1-en-3-ol bzw. Pilzaromen (angegeben sind jeweils die Gehalte unter optimierten Bedingungen bzw. Höchstgehalte)

Organismus	Abteilung	Eingesetzter Teil	Ausbeute (Oct-1-en-3-ol)	Referenz
<i>L. edodes</i>	Basidiomycota	Myzel ¹	6.200 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM	3.1.2.4 / Heuger <i>et al.</i> (2015)
<i>P. pulmonarius</i>	Basidiomycota	Myzel ¹	4.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM	Belinky <i>et al.</i> (1994)
<i>P. pulmonarius</i>	Basidiomycota	Fruchtkörper	1.200 $\mu\text{g g}^{-1}$ TM	
<i>A. bisporus</i>	Basidiomycota	Fruchtkörper	2.400 $\mu\text{g g}^{-1}$	Morawicki und Beelman (2008)
<i>A. bisporus</i>	Basidiomycota	Stümpfe von Fruchtkörpern	900 $\mu\text{g g}^{-1}$	
<i>A. bisporus</i>	Basidiomycota	Fruchtkörper	380 $\mu\text{g g}^{-1}$ (60.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ Transformationsansatz)	Husson <i>et al.</i> (2001)
<i>M. esculenta</i>	Ascomycota	Myzel ¹	2.500 $\mu\text{g g}^{-1}$	Schindler und Seipenbusch (1990)
<i>P. camemberti</i>	Ascomycota	Myzel ¹	70 $\mu\text{g mg}^{-1}$ Protein	Husson <i>et al.</i> (2005)

¹ submers kultiviert

4.1.3 Enantiomerenverhältnis von Oct-1-en-3-ol

Oct-1-en-3-ol ist vielfach Hauptbestandteil des Pilzaromas und aufgrund des Stereozentrums an C3 chiral. Die beiden Enantiomere *R*-(-)- und *S*-(+)-Oct-1-en-3-ol unterscheiden sich bezüglich ihrer Geruchsqualität. Der Geruch von *S*-(+)-Oct-1-en-3-ol wird als kräuterig, grasig-modrig, leicht an Pilz erinnernd und nicht charakteristisch pilzig beschrieben. Dagegen wird der Geruch von *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol als intensiv pilzig und identisch zu authentischem Pilzaroma beschrieben. *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol ist der Schlüsselaromastoff des Aromas verschiedener Speisepilze (Mosandl *et al.* 1986).

In den Fruchtkörpern essbarer Pilze kommt Oct-1-en-3-ol natürlicherweise mit einem starken Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers vor. Zawirska-Wojtasiak (2004) bestimmte für verschiedene Varietäten von *A. bisporus* (Champignon), *P. ostreatus* (Austernseitling), *L. edodes* (Shiitake) und *Boletus edulis* (Steinpilz) Enantiomerenüberschüsse [*ee R*-(-)-Oct-1-en-3-ol] zwischen 91% und 99% (vgl. Tab. 4.3).

Die Enantiomerenzusammensetzung des biotechnologisch hergestellten Oct-1-en-3-ols ist daher von größter Bedeutung für die Qualität des Aromas und bestimmt folglich auch den Wert des Aromaextraktes bzw. des Aromastoffes.

In den Extrakten aus Myzel wurden, unabhängig vom Zusatz an Linolsäure und der Inkubationszeit der Homogenate, hohe Enantiomerenüberschüsse (*ee*) von über 90% bis zu 93% zugunsten des erwünschten *R*-(-)-Enantiomers detektiert (3.1.3). Diese Werte stimmen gut mit den von Zawirska-Wojtasiak (2004) sowie von Akakabe *et al.* (2005) für Oct-1-en-3-ol aus Fruchtkörpern von *L. edodes* publizierten Enantiomerenverhältnissen von 91% respektive 87% – 90% [*ee R*-(-)-Oct-1-en-3-ol] überein.

Tab. 4.3: Enantiomerenverhältnisse von Oct-1-en-3-ol aus unterschiedlichen Pilzen

Pilz	ee [<i>R</i> -(-)-Oct-1-en-3-ol]	Referenz
<i>L. edodes</i> ¹	> 90% – 93%	s. 3.1.3 / Heuger <i>et al.</i> (2015)
<i>L. edodes</i>	87% – 90%	Akakabe <i>et al.</i> (2005)
<i>L. edodes</i>	91%	Zawirska-Wojtasiak (2004)
<i>A. bisporus</i>	98% – 99%	Zawirska-Wojtasiak (2004)
<i>P. ostreatus</i>	94% – 95%	Zawirska-Wojtasiak (2004)
<i>B. edulis</i>	93%	Zawirska-Wojtasiak (2004)

¹ submers kultiviertes Myzel

4.1.4 Bildung weiterer C₈-Aromastoffe

Neben Oct-1-en-3-ol als Hauptkomponente der flüchtigen Stoffe in den Extrakten aus *L. edodes* Myzel wurden teilweise die C₈-Aromastoffe Octan-1-ol und Oct-2-en-1-ol als Nebenbestandteile gefunden (vgl. 3.1.4, Abb. 3.9). Die Stoffe Octan-1-ol und Oct-2-en-1-ol sind als Bestandteile des Aromas von *L. edodes* bekannt (Cho *et al.* 2003, Spaether 2000) und der Geruch von Oct-2-en-1-ol wird teilweise ebenfalls als „pilz-artig“ beschrieben (Cho *et al.* 2006).

Die Bildung von Oct-2-en-1-ol zeigte dabei eine klare Abhängigkeit sowohl von der Zugabe von Linolsäure als auch von der Inkubation der Homogenate. Die Veränderungen der Gehalte verliefen dabei analog zu denen für Oct-1-en-3-ol, wenngleich sie mit etwa 100 bis 500 µg g⁻¹ TM nur etwa ein Zehntel so hoch wie die Mengen an Oct-1-en-3-ol waren (Abb. 3.10).

Dies könnte auf eine gemeinsame Biosyntheseroute hinweisen. Auch Tressl *et al.* (1982) beobachteten eine Steigerung der Bildung von Oct-2-en-1-ol ((*Z*)-Isomer) bei Zusatz von Linolsäure zu Homogenaten von *A. campestris* und schlossen daher, dass ebenfalls Linolsäure *precursor* dieser C₈-Verbindung ist. Auch in Bezug auf die vorgeschlagenen Mechanismen zur Spaltung von 10-HPOD durch die Hydroperoxidlyase erscheint dies plausibel. Näheres dazu siehe auch bei der Diskussion zur Hydroperoxidlyase und zum Aromaprofil (4.4.3, 4.2).

4.2 Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von *L. edodes*

Methodik

Zur Charakterisierung des Aromas des submers kultivierten Myzels von *L. edodes* wurde das unter optimierten Bedingungen gewachsene Myzel zum einen unter enzymaktivierenden Bedingungen und zum anderen unter enzyminhibierenden Bedingungen homogenisiert. Aus diesen Homogenaten wurden Aromaextrakte gewonnen.

Zentrale Anforderung an Aromaextrakte ist, dass sie so authentisch wie möglich das Aroma der Probe wiedergeben, da dies entscheidend für die nachfolgenden Untersuchungen ist (d'Acampora Zellner *et al.* 2008, Brattoli *et al.* 2013). Extrakte direkt aus der Probe, beispielsweise mittels Lösungsmittlextraktion, stellen dabei im Idealfall die Gesamtheit der flüchtigen Verbindungen in der Probe dar. Dagegen repräsentieren Extrakte aus dem Kopfraum, beispielsweise durch *dynamic headspace* oder Kopfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) gewonnen, den Teil der flüchtigen Stoffe im Kopfraum über der Probe (van Ruth 2001, d'Acampora Zellner *et al.* 2008). Jede Extraktionstechnik weist bedingt durch ihre Grundlagen spezifische Vor- und Nachteile auf, sodass es im Allgemeinen nicht die „eine“ ideale Methode für die Aromaextraktion gibt (Blank 1996). D'Acampora Zellner *et al.* (2008) sehen die Verwendung von mehr als einer Extraktionsmethode als am besten geeignet an, um das Aromaprofil vollständig zu erfassen.

Spaether (2000) nutzte für die Untersuchung der Aromastoffe aus submers kultiviertem Myzel sowie aus Fruchtkörpern von *L. edodes* mit der kontinuierlichen Flüssig-flüssig-Extraktion (*continuous* LLE) und der Soxhlet-Extraktion zwei Lösungsmittlextraktionen. Für die Extraktion des Aromas von frischen, getrockneten bzw. getrockneten und rehydratisierten Fruchtkörpern ist der Einsatz von verschiedensten Techniken wie LLE (Chen und Ho 1986), Simultane Destillation-Extraktion (SDE, Cho *et al.* 2003), HS-SPME (Wu und Wang 2000, Tian *et al.* 2016), *stir bar sorptive extraction* (SBSE, Da Costa und Eri 2006), *supercritical fluid extraction* (SFE) mit überkritischem CO₂ (Charpentier *et al.* 1986) und *dynamic headspace* (DHS) mit Konzentrierung der Analyten an Sorbentien (Tenax, Da Costa und Eri 2006) oder in Kühlfallen (Charpentier *et al.* 1986) berichtet worden.

Charpentier *et al.* (1986) verglichen in ihrer Arbeit den Einfluss der Extraktionsmethoden SDE, SFE und DHS und stellten fest, dass die SDE aufgrund der Bildung von Artefakten nicht geeignet war. Die SFE ergab Extrakte, welche mehr flüchtige

Verbindungen als jeweils die SDE oder HS-SPME beinhalteten; es traten jedoch Verluste von sehr flüchtigen Verbindungen auf. Da Costa und Eri (2006) verwendeten SDE, SBSE und DHS zur Extraktion von getrockneten Shiitake-Pilzen und stellten im SDE-Extrakt die größte Anzahl an flüchtigen Verbindungen fest. Auf die Problematik, ob dieser Extrakt aufgrund der Artefaktbildung noch als authentisch gelten kann, wird jedoch nicht eingegangen. Charpentier *et al.* (1986) empfehlen aufgrund der o. g. Resultate die Nutzung komplementärer Methoden und Da Costa und Eri (2006) schlagen vor, mindestens eine Lösungsmittel-extraktion und eine *headspace*-Technik anzuwenden, um ein Aromaprofil zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Extraktionstechniken die LLE mit nachfolgender *solvent-assisted flavour evaporation* (SAFE) sowie die HS-SPME gewählt, da sie eine Isolierung der flüchtigen Bestandteile ohne thermische Belastung der Probe ermöglichen. Somit wird aufgrund der schonenden Behandlung eine thermische Bildung von Artefakten, welche das Aromaprofil verfälschen könnten, vermieden. Die Vorteile der LLE mit SAFE liegen neben der schonenden Isolierung und der effektiven Abtrennung von Matrixbestandteilen insbesondere in der Handhabung des Extraktes. Nach Bedarf ist eine starke Konzentrierung oder auch Verdünnung möglich und auch die Möglichkeit, den Extrakt mehrfach zu untersuchen, besteht. Bei dieser Methodik ist nachteilig, dass sie zeitaufwändig ist und recht große Mengen an Probe und an sehr reinen Lösungsmitteln benötigt werden. Als Lösungsmittel-basierte Probenvorbereitung kann es zudem beispielsweise bei der Konzentrierung zu einem Verlust an hochflüchtigen Aromastoffen kommen oder diese können bei der gaschromatographischen Analyse im Lösungsmittelpeak eluieren und somit nicht detektierbar sein (Delahunty *et al.* 2006).

Die HS-SPME ist eine Lösungsmittel-freie Extraktionstechnik und vermeidet dadurch diese Probleme. Weiterhin werden für die Extraktion nur geringe Mengen an Probenmaterial benötigt und sie kann in recht kurzer Zeit (etwa 1 h) durchgeführt werden. Die extrahierten Mengen an Analyten sind bei *headspace*-Techniken in der Regel jedoch geringer, sodass die Identifizierung der geruchsaktiven Substanzen erschwert sein kann. Die HS-SPME kompensiert dies partiell dadurch, dass eine Anreicherung auf dem Adsorbens der Faser erfolgt (Delahunty *et al.* 2006). Ein weiterer Nachteil ist, dass aufgrund der Thermodesorption im Injektor des Gaschromatographen pro Extrakt nur eine Messung möglich ist bzw. für jede Messung eine Extraktion erforderlich ist. Zudem wird die Zusammensetzung des

Extraktes, bedingt durch die unterschiedliche Flüchtigkeit und Struktur der Analyten, von Typ und Volumen der verwendeten Faser und der Extraktionstemperatur und -dauer beeinflusst. Dadurch kann es passieren, dass die Zusammensetzung des SPME-Extraktes nicht identisch zur Zusammensetzung des Kopfraums ist (d'Acampora Zellner *et al.* 2008).

Die geruchsaktiven Verbindungen in den Extrakten wurden durch Untersuchung mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) ermittelt. Bei dieser Technik wird der Trägergasstrom nach der Trennsäule geteilt. Ein Teil wird zur instrumentellen Detektion mittels Flammenionisationsdetektor (FID) oder Massenspektrometer (MS) geleitet und der andere Teil durch eine beheizte, unbelegte Kapillare zum Olfaktometrie Detektor Port geführt, wo der Gasstrom mit der Nase „abgerochen“ wird (Delahunty *et al.* 2006). Die GC-O ermöglicht dadurch die parallele Bestimmung der Retentionszeit und der Geruchsqualität (d'Acampora Zellner *et al.* 2008). Schwierigkeiten und Limitierungen dieser Methodik ergeben sich u. a. daraus, dass Aromastoffe mit niedrigen Geruchsschwellenwerten schon bei geringen Konzentrationen aromaaktiv sein können, jedoch instrumentell, insbesondere mittels FID, nur schwach oder nicht mehr erfasst werden. Blank (1996) gibt hierzu als Orientierung an, dass Aromastoffe mit einem Geruchsschwellenwert von unter 1 ng L^{-1} (Luft) typischerweise nicht mehr mittels FID erfasst werden. Daneben kann es zur Koelution von Aromastoffen mit nicht geruchsaktiven Substanzen kommen. Folglich spiegelt das im Chromatogramm aufgezeichnete Peakprofil nicht zwingend das Aromaprofil einer Probe wider. Dies bewirkt Probleme bei der Zuordnung der Geruchseindrücke zu Peaks und erschwert dadurch die Identifizierung der geruchsaktiven Substanzen (van Ruth 2001, Blank 1996).

So konnten bei der Untersuchung (GC-FID-O) des mittels LLE und SAFE gewonnenen Extraktes aus enzymaktivierend aufgeschlossenem Myzel von zehn Geruchseindrücken sechs einem Peak zugeordnet werden (3.2.1). Bei zwei dieser Peaks stellte sich jedoch bei der Identifizierung heraus, dass es sich um Koelutionen handelt, sodass die aromaaktive Substanz nicht identifiziert wurde (vgl. übernächste Seite).

Die Identifizierung der aromaaktiven Substanzen erfolgte mittels GC-MS durch Abgleich der Massenspektren mit einer Datenbank und authentischen Standards sowie der Kováts-Indices auf zwei Trennsäulen unterschiedlicher Polarität mit

Literaturangaben und Standards. Zudem wurde die Geruchsqualität mit der von Standards und Angaben in der Literatur verglichen.

Neben den aromaaktiven Stoffen wurden olfaktorisch nicht wahrgenommene Verbindungen identifiziert, wobei der Fokus auf C₈-Aromastoffen und S-haltigen Verbindungen lag.

Vergleich der Extrakte und Biogenese ausgewählter Aromastoffe

Der Vergleich der Extrakte ermöglicht es, Aussagen darüber zu treffen, welche Aromastoffe enzymatisch nach Zellaufschluss gebildet werden und diese von bereits zuvor vorhandenen sowie nicht enzymatisch gebildeten zu unterscheiden. Dies soll hier zunächst besprochen werden, später wird auf die Biosynthese ausgewählter relevanter Aromastoffe eingegangen.

Bei der Untersuchung des unter enzyminhibierenden Bedingungen mittels LLE und SAFE gewonnenen Aromaextraktes wurden lediglich drei Geruchseindrücke wahrgenommen. Dagegen wurden im Aromaextrakt des unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenen Myzels zehn Geruchseindrücke festgestellt. Darunter waren auch die drei zuvor gefundenen Gerüche (Abb. 4.1).

Folglich wurden sieben geruchsaktive Substanzen enzymatisch nach Zellaufschluss in Konzentrationen gebildet, die eine Detektion mittels GC-O erlauben.

Von den zehn Geruchseindrücken des unter enzymaktivierenden Bedingungen gewonnenen Extraktes wurde bei dreien die zugehörige Substanz eindeutig identifiziert. Es handelte sich neben Hexanal („Gras“), welches ebenfalls unter inaktivierenden Bedingungen wahrgenommen wurde, um Octan-3-ol („muffig“) und Oct-1-en-3-ol („Pilz“). Als weitere Substanz wurde Oct-1-en-3-on aufgrund der Übereinstimmung des KI auf der polaren Trennsäule mit dem Standard und Literaturangaben, der Massenspektren mit Datenbank sowie Standard und der Geruchsqualität mit Literaturangaben und Standard einem Geruchseindruck („Pilz“) zugeordnet. Auf der unpolaren Trennsäule wurde Oct-1-en-3-on jedoch nicht nachgewiesen. Dies ist auf eine Koelution mit dem in wesentlich höherer Konzentration vorliegenden Oct-1-en-3-ol zurückzuführen, die sich anhand der KI der Standards belegen ließ (vgl. Tab. 3.6).

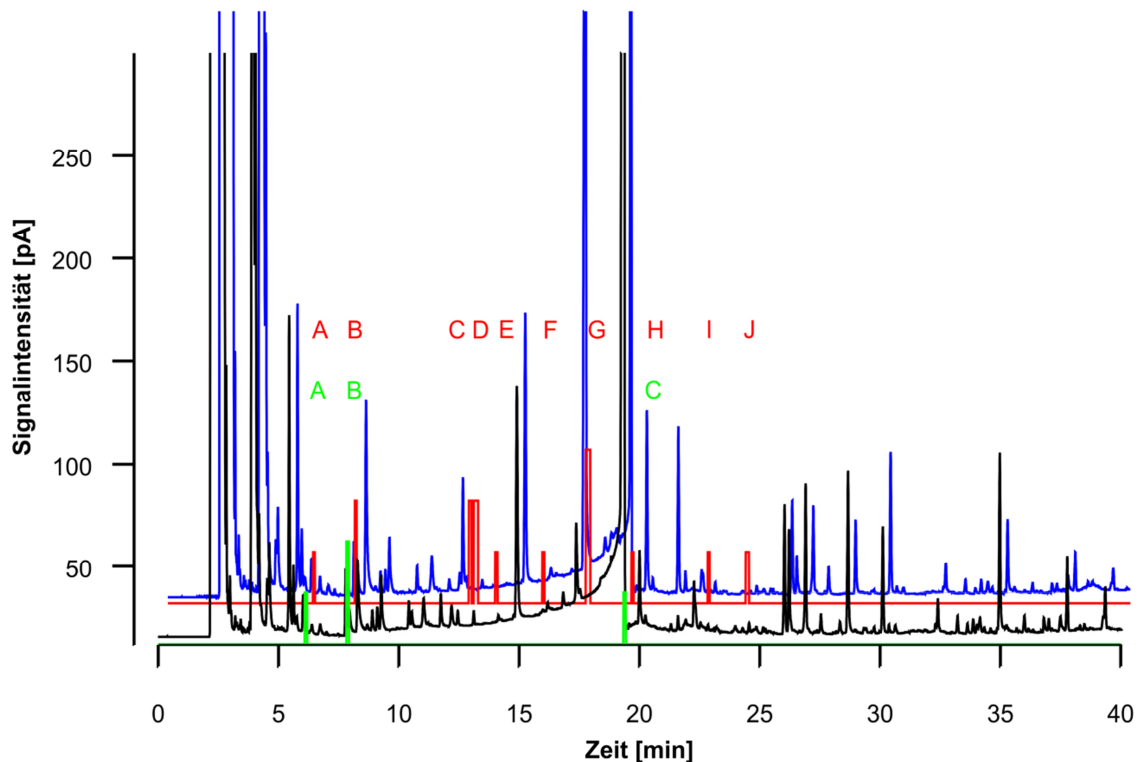


Abb. 4.1: GC-FID-O-Chromatogramme der SAFE-Extrakte von enzyminhibierend (schwarz, grün: zugehörige ODP-Spur) und enzymaktivierend (blau, rot: zugehörige ODP-Spur) aufgeschlossenem Myzel

Weiterhin wurden für zwei Geruchseindrücke durch Abgleich der Massenspektren mit der Datenbank Substanzvorschläge erhalten, von denen eine Substanz (Octan-3-on) über die Übereinstimmung der KI mit Standards und Literaturdaten gesichert identifiziert wurde. Jedoch war die am GC-O wahrgenommene Geruchsqualität jeweils eine andere als beim entsprechenden Standard und den Beschreibungen in der Literatur. Folgerichtig wurden diese Substanzen nicht den Geruchseindrücken zugeordnet. In diesen Fällen ist von einer Koelution des instrumentell nachgewiesenen Stoffes mit einer Substanz, die aromaaktiv ist, auszugehen.

Neben den Substanzvorschlägen, die Geruchseindrücken zugeordnet wurden, wurden mittels GC-MS olfaktorisch nicht wahrgenommene Substanzen identifiziert. In den unter enzyminhibierenden Bedingungen hergestellten Extrakten wurden elf Verbindungen gefunden. Davon wurden unter anderem Octanal und Octan-1-ol identifiziert.

Im Extrakt des unter enzymaktivierend aufgeschlossenen Myzels wurden elf Verbindungen vorläufig identifiziert. Darunter befanden sich Dimethyldisulfid sowie die eindeutig identifizierten C₈-Aromen Octan-3-on, Octan-1-ol und Oct-2-en-1-ol. Sieben Verbindungen waren auch im anderen Extrakt aufgetreten.

Bei der Untersuchung des HS-SPME-Extraktes des unter inaktivierenden Bedingungen homogenisierten Myzels wurde nur ein Geruchseindruck festgestellt und als Octanal identifiziert. Unter enzymaktivierenden Bedingungen aufgeschlossenes Myzel ergab einen Extrakt, in dem vier Geruchseindrücke wahrgenommen und Substanzvorschlägen zugeordnet wurden (Abb. 4.2). Da diese Geruchseindrücke nicht im unter inaktivierenden Bedingungen hergestellten Homogenat ermittelt wurden, handelt es sich um enzymatisch gebildete Aromastoffe. Als Substanzvorschläge wurden für die pilzigen Geruchseindrücke Oct-1-en-3-on und Oct-1-en-3-ol erhalten und die Substanzen durch Übereinstimmung der Massenspektren mit Standards, der Retentionsindices auf zwei Säulen mit Standards sowie Literaturdaten und der Geruchsqualität mit Standards und Literaturangaben identifiziert. Für die Geruchseindrücke „schweflig, Knoblauch, würzig“ und „Knoblauch, leicht schweflig“ wurden aufgrund des Abgleichs der Massenspektren die schwefelhaltigen Aromastoffe Methanthiol bzw. Dimethyltrisulfid vorgeschlagen. Der Abgleich der KI auf der polaren Trennsäule zeigte ebenso gute Übereinstimmungen zu Literaturangaben wie die in der Literatur beschriebenen Geruchseindrücke. Auf der unpolaren Säule wurden die Substanzen jedoch nicht detektiert. Ein Abgleich mit Standards war nicht möglich, da Methanthiol und Dimethyltrisulfid nicht als Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

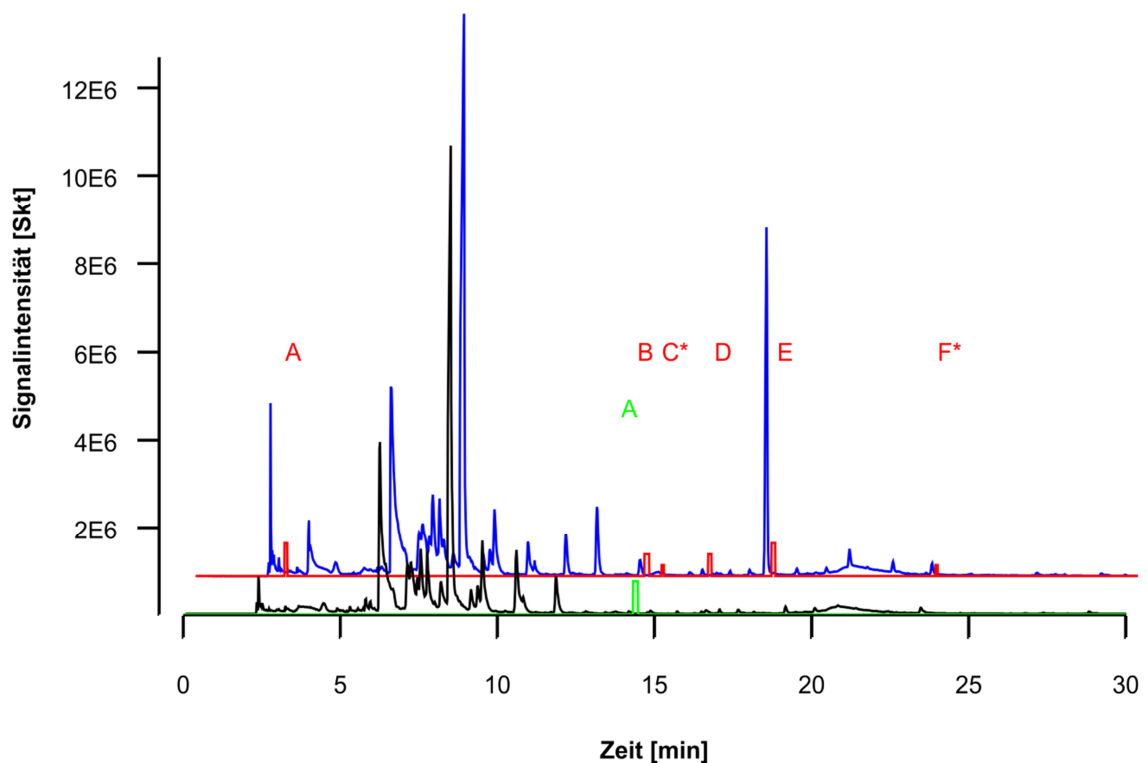


Abb. 4.2: GC-MS/MS-O-Chromatogramme der HS-SPME-Extrakte von enzyminhibierend (schwarz, grün: zugehörige ODP-Spur) und enzymaktivierend (blau, rot: zugehörige ODP-Spur) aufgeschlossenem Myzel

Im Extrakt des enzyminhibierend aufgeschlossenen Myzels von *L. edodes* wurden daneben neun nicht olfaktorisch detektierte Substanzen gefunden und zwei davon (Hexanal und Nonanal) eindeutig identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden im HS-SPME-Extrakt des enzymaktivierend homogenisierten Myzels zwölf olfaktorisch nicht wahrgenommene Substanzen detektiert, von denen u. a. Octan-3-ol und Oct-2-en-1-ol sowie Hexanal identifiziert wurden.

Die GC-O ermöglichte aus der Vielzahl der flüchtigen Stoffe die Ermittlung der aromaaktiven Stoffe, welche zum Geruch der Probe beitragen. Die im Extrakt des enzymaktivierend aufgeschlossenen Myzels festgestellten Geruchsqualitäten gehörten mehrheitlich zu den Richtungen „pilzig“ und „schweflig“ und entsprachen somit dem typischen Geruch der Probe.

Die Extrakte deckten den gesamten Bereich geruchsaktiver Stoffe vom sehr flüchtigen Methanthiol, welches nur mittels HS-SPME erfasst wurde, bis hin zu weniger flüchtigen Verbindungen wie Octan-3-ol, welches nur im LLE/SAFE-Extrakt

detektiert wurde, ab. Die verwendeten Extraktionstechniken ergänzen sich also wie beabsichtigt und erfüllen die Anforderung von Da Costa und Eri (2006) nach mindestens einer Lösungsmittelextraktion und einer *headspace*-Technik. Die Vorgehensweise ermöglicht so einen qualitativen Überblick über das Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von *L. edodes*. Eine quantitative Bestimmung der sensorischen Beiträge der einzelnen Aromastoffe durch Ermittlung der Hauptaromakomponenten und der zugehörigen *odour activity values* (OAV) erfolgte nicht. Die Bestimmung der Hauptaromakomponenten bei der gaschromatographisch-olfaktorischen Untersuchung von Aromaextrakten könnte u. a. mittels Verdünnungstechniken wie der von Ullrich und Grosch entwickelten Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA, Ullrich und Grosch 1987) oder der von Acree *et al.* entwickelten *combined hedonic aroma response method* (CHARM, Acree *et al.* 1984) erfolgen.

Die wesentlichen Unterschiede zwischen den enzymaktivierend und enzyminhibierend gewonnenen Aromaextrakten ergaben sich sowohl bei der olfaktorischen Detektion als auch bei der instrumentell-analytischen Untersuchung durch die schwefelhaltigen Aromastoffe und die C₈-Aromastoffe.

In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass die schwefelhaltigen Aromastoffe, unabhängig davon ob in sensorisch wahrnehmbaren Mengen vorkommend oder nicht, ausschließlich unter enzymaktivierenden Bedingungen gebildet wurden. Auch die Geruchseindrücke mit schwefeliger Geruchsqualität, welche keiner Substanz zugeordnet werden konnten, traten nur nach enzymaktivierendem Aufschluss des Myzels auf. Da unter den enzyminhibierenden Bedingungen des Aufschlusses in Methanol keine S-haltigen Verbindungen beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass in submers kultiviertem Myzel von *L. edodes* Enzym-katalysierte Schritte entscheidend für die Bildung sind. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chen *et al.* (1986), welche bei der Untersuchung von Fruchtkörpern von *L. edodes* unter inaktivierenden Bedingungen deutlich niedrigere Gehalte an S-haltigen Aromastoffen als bei Aufschluss in Puffer fanden. Der Aufschluss in Chloroform bewirkte eine effektive Inhibierung der

beteiligten Enzyme, sodass nur Spuren der schwefelhaltigen Verbindungen vorhanden waren.

Die hier vorläufig identifizierten schwefelhaltigen Verbindungen Methanthiol, Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid wurden in Extrakten aus Fruchtkörpern von *L. edodes* bereits nachgewiesen (Chen und Ho 1986, Cho *et al.* 2003). Berichte über das Aroma des submers kultivierten Myzels sind jedoch rar.

Spaether (2000) untersuchte das Aromaprofil des submers kultivierten Myzels im Vergleich zu Fruchtkörpern von *L. edodes* mit einem Fokus auf schwefelhaltigen Aromastoffen. Mittels Flüssig-flüssig-Extraktion und Soxhlet-Extraktion gewonnene Extrakte wurden mittels Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektor (GC-AED) und GC-MS untersucht. Dabei wurden in den Extrakten des Myzels lediglich die drei schwefelhaltigen Verbindungen 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian und Lenthionin nachgewiesen. Diese Verbindungen waren im Extrakt der Fruchtkörper die Hauptpeaks bei der Untersuchung mittels GC-AED im schwefelsensitiven Modus. Daneben wurde eine Vielzahl weiterer cyclischer S-haltiger Verbindungen sowie nicht cyclische S-haltige Stoffe identifiziert. Die hier beschriebenen Methanthiol und Dimethyldisulfid wurden dabei jedoch weder im submers kultivierten Myzel noch in Fruchtkörpern nachgewiesen. Die Abwesenheit von Methanthiol könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese sehr flüchtige Verbindung bei der lösungsmittelbasierten Probenvorbereitung verloren gegangen ist oder bei der Gaschromatographie während des Lösungsmittelpeaks eluiert. In dieser Arbeit wurde Methanthiol nur in den HS-SPME-Extrakten detektiert.

Als Erklärung für die insgesamt geringere Anzahl nachgewiesener Verbindungen und die geringeren Gehalte in den Extrakten aus submers kultiviertem Myzel im Vergleich zu Fruchtkörpern vermutete Spaether (2000) eine geringere Stoffwechselaktivität im Myzel. Die Autorin schätzt, dass die Gehalte aus dem Myzel nur etwa 10% der Gehalte aus Fruchtkörpern ausmachen, was auch mit den unterschiedlichen Gehalten an Lentinsäure korrelierte.

Eine Untersuchung von Extrakten aus submers kultiviertem Myzel von *L. edodes* mittels GC-O ist bislang nicht berichtet worden.

Wie bereits in der Einleitung (1.1) behandelt, ist die Biosynthese des Lenthionins als *impact compound* des Aromas von *L. edodes* intensiv untersucht worden. An der

Bildung von Lenthionin und weiteren schwefelhaltigen Aromastoffen beteiligte Enzyme und Zwischenprodukte wurden charakterisiert (vgl. Abb. 1.3). Trotzdem sind bislang nicht alle Schritte der Bildung dieser Stoffe aufgeklärt und verstanden. Abb. 4.3 gibt auf Basis der Kenntnisse für Fruchtkörper eine Übersicht über einen plausiblen Weg für die Bildung von Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid sowie Methanthiol ausgehend von Lentinsäure.

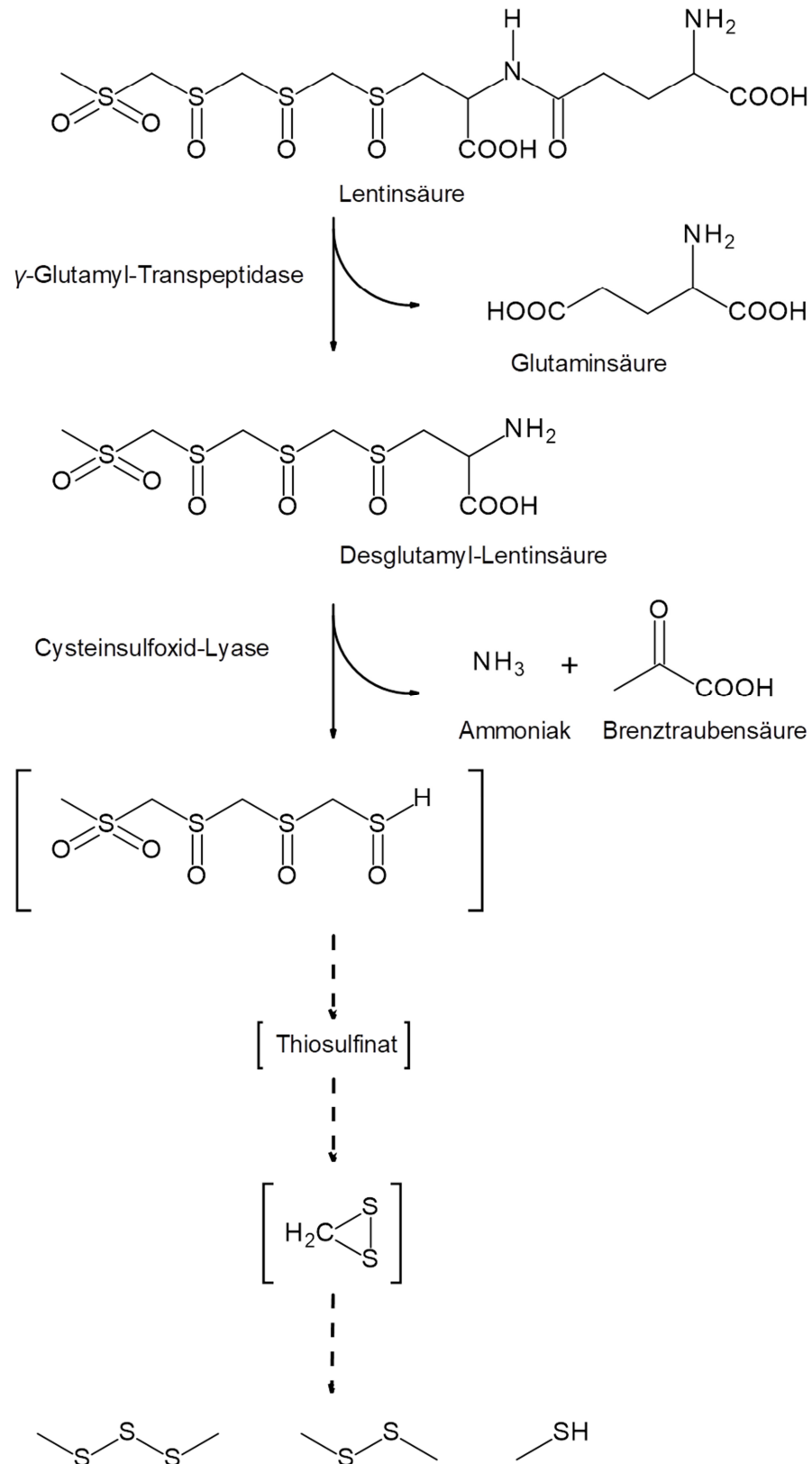


Abb. 4.3: Hypothetischer Biosyntheseweg für die Bildung von Methanthiol, Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid in Myzel von *L. edodes* (modifiziert nach Yasumoto *et al.* 1976, Iwami *et al.* 1975a)

Zur Erläuterung: Im ersten Schritt wird durch γ -Glutamyltransferase Glutaminsäure aus der Lentinsäure abgespalten bzw. an eine andere Aminosäure peptidisch gebunden und als weiteres Produkt Desglutamyl-Lentinsäure erhalten (Yasumoto *et al.* 1971, Iwami *et al.* 1975c). Aus Desglutamyl-Lentinsäure, welche auch als ein S-substituiertes Cysteinsulfoxid aufgefasst werden kann, werden durch die Einwirkung einer Cysteinsulfoxid-Lyase Brenztraubensäure und Ammoniak freigesetzt (Iwami *et al.* 1975a). Bei der Cysteinsulfoxid-Lyase aus *L. edodes* handelt es sich um ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym (Yasumoto *et al.* 1971).

Der Rest aus drei methylverbrückten Sulfoxiden und der endständigen Methylsulfongruppe kann in nicht-enzymatischen Reaktionen u. a. zu Verbindungen wie Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid und Methanthiol reagieren. Als intermediär auftretende Zwischenprodukte dieser Reaktionen werden ein Thiosulfinat sowie Dithiiran (Methylensulfid) angenommen (Yasumoto *et al.* 1976), aber die Reaktionen und insbesondere der Verlust des Sauerstoffs sind bislang nicht aufgeklärt (Block und Deorazio 1994).

Daneben ist ein weiterer Biosyntheseweg ausgehend von der Aminosäure L-Methionin beschrieben, welcher die Bildung nicht-cyclischer schwefelhaltiger Verbindungen erklären kann. Das ubiquitär in Mikroorganismen vorkommende Enzym L-Methioninase katalysiert bei diesem die Umsetzung von L-Methionin zu α -Ketobuttersäure, Ammoniak und Methanthiol (El-Sayed 2010, Abb. 4.4). Im Modellsystem wurde Methanthiol in weiteren Reaktionen auch zu Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid oxidiert (Chin und Lindsay 1994).

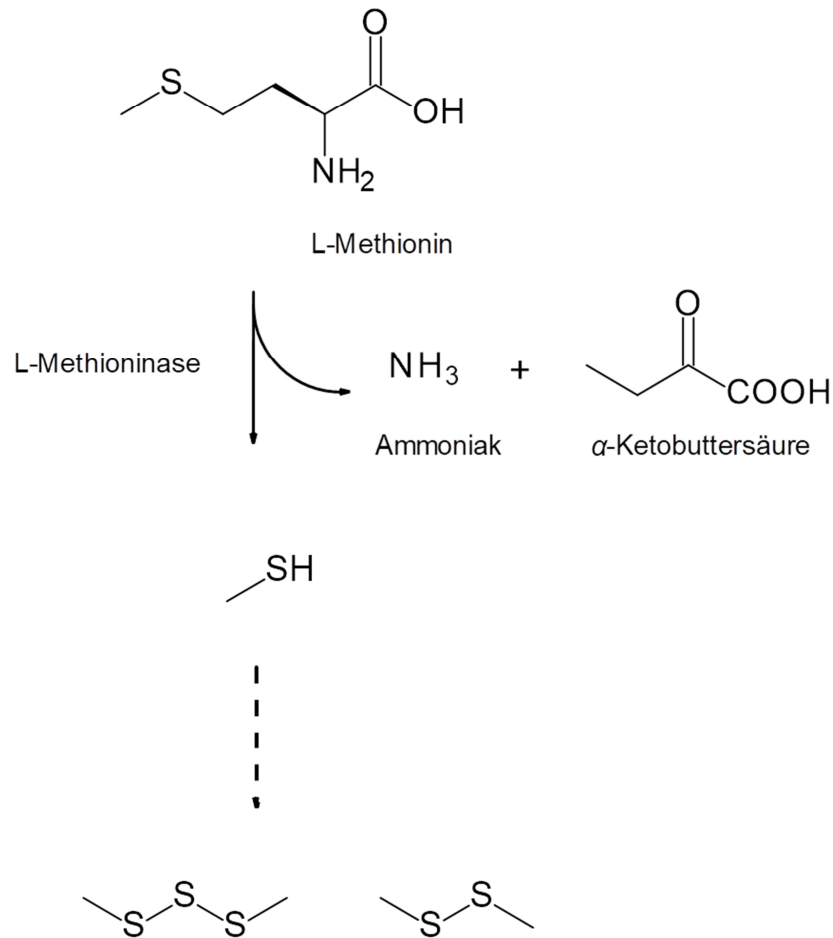


Abb. 4.4: Möglicher Bildungsweg von Methanthiol, Dimethyldisulfid und Dimethyltrisulfid von L-Methionin ausgehend und durch L-Methioninase katalysiert (nach El-Sayed 2010, Chin und Lindsay 1994)

In den Chromatogrammen fällt am stärksten die Zunahme des Peaks von Oct-1-en-3-ol (in Abb. 4.1 bei ca. 17,5 min bzw. in Abb. 4.2 bei ca. 19 min) im Extrakt des enzymaktivierend aufgeschlossenen Myzels im Vergleich zum Extrakt des enzyminhibierend behandelten Myzels auf. Bezogen auf die Peakfläche stellt Oct-1-en-3-ol in den Chromatogrammen die Haupt-C₈-Verbindung dar. Die Zunahme findet auch ihre Entsprechung bei der olfaktorischen Untersuchung. Während in den Extrakten des inaktivierend behandelten Myzels Oct-1-en-3-ol sensorisch nicht wahrgenommen wurde, wurden in den enzymaktivierenden Extrakten zu dieser Retentionszeit intensive Geruchseindrücke wahrgenommen, die als „Pilz“ beschrieben wurden (Geruchseindrücke G und E in Abb. 4.1 bzw. Abb. 4.2). Daneben wurden noch weitere pilzartige Geruchseindrücke bei der olfaktorischen Untersuchung des enzymaktivierend behandelten Myzels festgestellt, die im anderen

Extrakt nicht detektiert wurden. Diese wurden den zugehörigen C₈-Aromastoffen Oct-1-en-3-on und Octan-3-ol zugeordnet.

Zudem wurde mittels GC-FID bzw. GC-MS u. a. eine Zunahme der Peaks für Octan-3-on (in Abb. 4.1 bei ca. 12 min bzw. in Abb. 4.2 bei ca. 13 min) und Oct-2-en-1-ol (in Abb. 4.1 bei ca. 21,5 min bzw. in Abb. 4.2 bei ca. 22,5 min) in den Chromatogrammen des enzymaktivierend aufgeschlossenen Myzels gegenüber den entsprechenden Chromatogrammen des enzyminhibierend behandelten Myzels beobachtet.

Oct-1-en-3-ol wurde auch von Spaether (2000) als Hauptverbindung unter den C₈-Aromastoffen im submers kultivierten Myzel von *L. edodes* genannt. Oct-1-en-3-on wurde in deutlich geringerer Menge nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmen zudem gut mit den Erkenntnissen für das Aroma von Fruchtkörpern überein (Chen *et al.* 1986, Cho *et al.* 2003). Dass Oct-1-en-3-on trotz des Vorkommens in Spuren sensorisch wahrnehmbar war, ist auf den niedrigen Geruchsschwellenwert von 0,04 ng L⁻¹ Luft (Lorber *et al.* 2014, mittels GC-O bestimmt) zurückzuführen. Dieser ist um ein Vielfaches geringer als der Geruchsschwellenwert von Oct-1-en-3-ol, welcher mit 1,4 ng L⁻¹ Luft (Lorber *et al.* 2014) angegeben wird.

Über das Vorkommen der weiteren hier nachgewiesenen C₈-Aromastoffe wie Octan-3-ol, Octan-3-on, Oct-2-en-1-ol und Octan-1-ol im submers kultivierten Myzel sind keine aussagekräftigen Berichte vorhanden. Die Verbindungen sind jedoch in Aromaextrakten aus Fruchtkörpern beschrieben worden (Cho *et al.* 2003).

Die Biogenese des *character impact compound* Oct-1-en-3-ol unter Beteiligung einer Oxygenase und Hydroperoxidlyase wurde bereits in der Einleitung beschrieben (1.1, Abb. 1.4). Zur Umsetzung des Intermediats 10-HPOD durch eine Hydroperoxidlyase siehe auch 4.4.

In erhitzten Pilzen (u. a. *A. bisporus*) wurde Oct-1-en-3-on nachgewiesen; daher wird die thermische Oxidation von Oct-1-en-3-ol als eine Bildungsmöglichkeit angesehen (Picardi und Issenberg 1973, Grosshauser und Schieberle 2013). Daneben ist das Vorkommen von Oct-1-en-3-on aber auch in schonend, d. h. ohne thermische Belastung, gewonnenen Aromaextrakten aus rohen Pilzen bekannt (Fischer und Grosch 1987, Wu und Wang 2000). Einen naheliegenden und plausibel

erscheinenden Weg stellt die Oxidation von Oct-1-en-3-ol durch eine Oxidoreduktase dar. In der Literatur ist dies bislang aber nicht beschrieben.

Als *precursor* von Oct-2-en-1-ol ist von Tressl *et al.* (1982) ebenfalls Linolsäure vorgeschlagen worden. Dies deckt sich mit hier erzielten Ergebnissen zur Abhängigkeit der Bildung von der Verfügbarkeit von Linolsäure (vgl. 4.1.4). Zu einem Bildungsweg oder Intermediat ist bislang nichts berichtet worden. Jedoch erscheint 10-HPOD auch unter Bezug auf die bislang vorgeschlagenen Mechanismen zur Katalyse der Hydroperoxidlyase in Pilzen als Intermediat möglich (vgl. 4.4.3). Zudem wurde Oct-2-en-1-ol als dessen Zersetzungsprodukt in einem Modellsystem nachgewiesen (Labeque und Marnett 1988).

Tressl *et al.* (1981) schlugen als Teil der Biosynthese von Oct-1-en-3-ol die Reduktion von Oct-1-en-3-on durch eine Alkohol-Oxidoreduktase vor. Um die Hypothese von Tressl *et al.* zu prüfen, untersuchten Chen und Wu (1984) die Reduktion von zugesetztem Oct-1-en-3-on durch ein Homogenat von *A. bisporus*. Chen und Wu (1984) bewiesen eine Reduktion von Oct-1-en-3-on zu Oct-1-en-3-ol und Octan-3-on, wobei der pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 9,0 keine Auswirkung auf die Reduktion der Ketofunktion zum Alkohol hatte. Dagegen war die Reduktion der Doppelbindung abhängig vom pH-Wert und wies ein Maximum im Bereich von 8,0 bis 9,0 auf. In Kontrollexperimenten ohne Zusatz von Oct-1-en-3-on zum Homogenat zeigte sich zudem für die Bildung von Oct-1-en-3-ol ein pH-Optimum von 6,0 bis 7,0. Chen und Wu (1984) folgerten aus diesen Resultaten, dass zwei verschiedene Reduktasen vorkommen und die Reduktion von Oct-1-en-3-on nur eine untergeordnete Rolle bei der Bildung von Oct-1-en-3-ol spielt.

Als Vorläuferstoff von Octan-3-ol wird Linolsäure vermutet (Tressl *et al.* 1982). Erkenntnisse über Zwischenprodukte oder an der Bildung beteiligte Enzyme sind bislang nicht berichtet worden. Denkbar scheinen jedoch die Reduktion von Octan-3-on oder Oct-1-en-3-ol.

Abb. 4.5 gibt eine schematische Übersicht über die hier diskutierten Biogenesewege dieser C8-Aromastoffe.

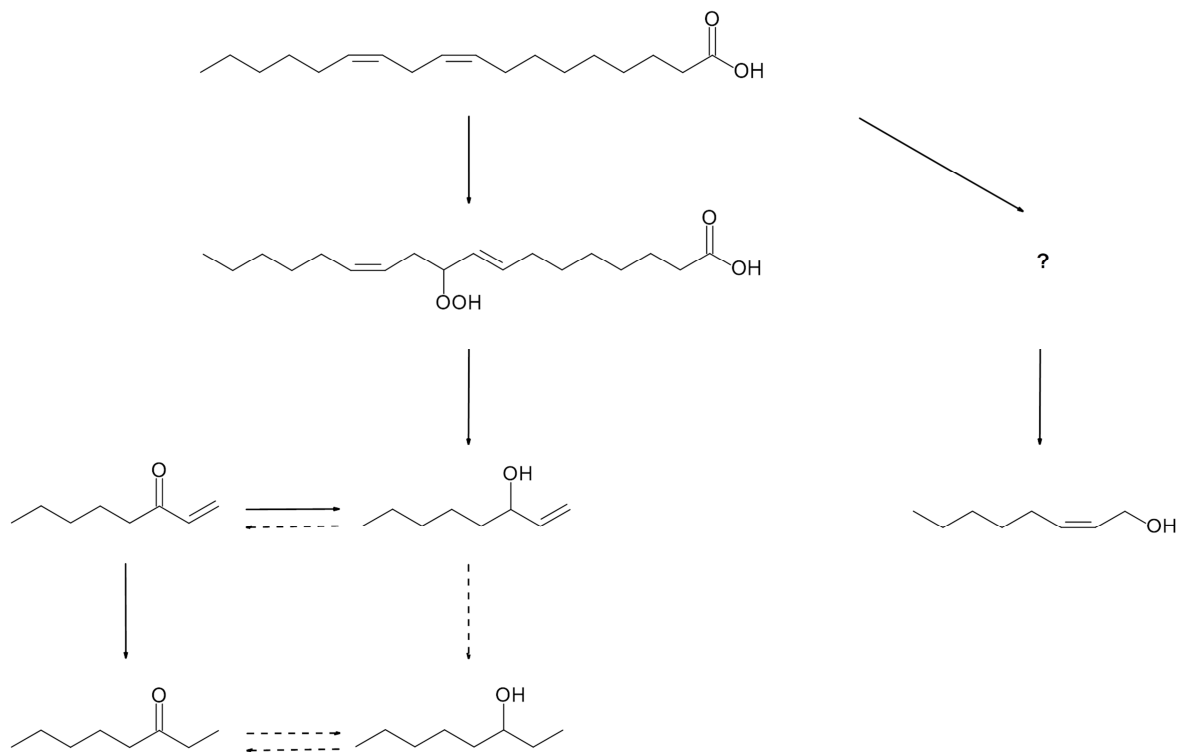


Abb. 4.5: Biosynthesewege einiger C₈-Aromastoffe in Basidiomyceten ausgehend von Linolsäure als *precursor* (nach Tressl *et al.* 1982, Wurzenberger und Grosch 1982, 1984c, Matsui *et al.* 2003, Chen und Wu 1984; gestrichelte Pfeile: postulierte Wege)

Als einzige sensorisch detektierte C₈-Verbindung in enzyminhibierend aufgeschlossenem Myzel wurde Octanal identifiziert. Die Bildung von Octanal als Produkt der Autoxidation von Ölsäure ist aus der Literatur bekannt (Forss 1973). Ölsäure ist mit einem Anteil von etwa 23% der Fettsäuren nach Linolsäure die zweithäufigste Fettsäure im Myzel von *L. edodes* (Stahl und Klug 1996) und daher als Vorläufer verfügbar. Die Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren kann auch die Bildung weiterer Aldehyde wie Oct-2-enal, Nonanal oder Hexanal, welches ebenfalls olfaktorisch detektiert wurde, erklären (Ullrich und Grosch 1987, Frankel 1983). So wurden beispielsweise sowohl das (*Z*)- als auch das (*E*)-Isomer von Oct-2-enal von Ullrich und Grosch (1987) bei der Autoxidation von Linolsäure beobachtet. Bei Hexanal ist neben der Entstehung durch Autoxidation in Pflanzen auch die enzymatische Bildung unter Beteiligung von 13-Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase aus Linolsäure möglich. 13-Lipoxygenasen sind im Genus *Pleurotus* bekannt (Kuribayashi *et al.* 2002, Leonhardt *et al.* 2013). Eine BLAST-Suche mit der Nucleotidsequenz der 13-LOX aus *P. sapidus* ergab im Genom von *L. edodes* einen

Treffer, welcher im Alignment eine gute Übereinstimmung zeigt¹. Die Beteiligung einer 13-LOX an der Bildung des Hexanal ist also denkbar, wenngleich nicht geklärt ist, ob die 13-LOX in *L. edodes* auch exprimiert wird. Eine Hydroperoxidlyase mit Spezifität für 13-Hydroperoxide ist aus Basidiomyceten bislang noch nicht berichtet worden.

Hexanal, Octanal und Oct-2(*E*)-enal sind im Aromaextrakt von Fruchtkörpern von *L. edodes* (Cho *et al.* 2003) und auch in anderen Pilzen bereits nachgewiesen worden (bspw. in *A. bisporus*, Fischer und Grosch 1987).

Warum in den Aromaextrakten des enzyminhibierend aufgeschlossenen Myzels in geringem Maß auch Aromastoffe wie Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol nachgewiesen wurden, obwohl deren Bildung eigentlich enzymatisch erfolgt, ist nicht abschließend zu klären. Eine mögliche Erklärung kann aber sein, dass die Inhibierung nicht sofort oder vollständig stattfand, sodass geringe Mengen dieser Stoffe gebildet werden konnten.

¹ Die Datenbanksuche (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit dem Algorithmus BLASTX (2.8.1, Altschul *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2000, Morgulis *et al.* 2008) und der in Leonhardt *et al.* (2013) berichteten Sequenz der 13-LOX aus *P. sapidus* (ENA HF913621.1) ergab im Genom von *L. edodes* (Shim *et al.* 2016, Park *et al.* 2017) einen Treffer (GAW09948.1; score 548 bits, *E value* 0.0, 49% identity, 65% positives, 86% query cover).

4.3 Synthese, Charakterisierung und Nachweis von 10-HPOD

4.3.1 Synthese und Charakterisierung

10-HPOD wurde aus Linolsäure in einer leicht modifizierten Synthese nach Wurzenberger und Grosch (1984c) dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine Photooxygenierung. Durch Bestrahlung mit einem Mitteldruck-Quecksilber-Strahler und den Typ II Photoinitiator *m*-Tetraphenylporphyrin wird Singulett-Sauerstoff generiert. In einer Schenck-En-Reaktion addiert der Singulett-Sauerstoff dann formal an die Linolsäure und als eines von mehreren Produkten wird racemisches 10-HPOD erhalten (Abb. 4.6, vgl. zum Mechanismus: Schirmeister *et al.* 2016, S. 711 f).

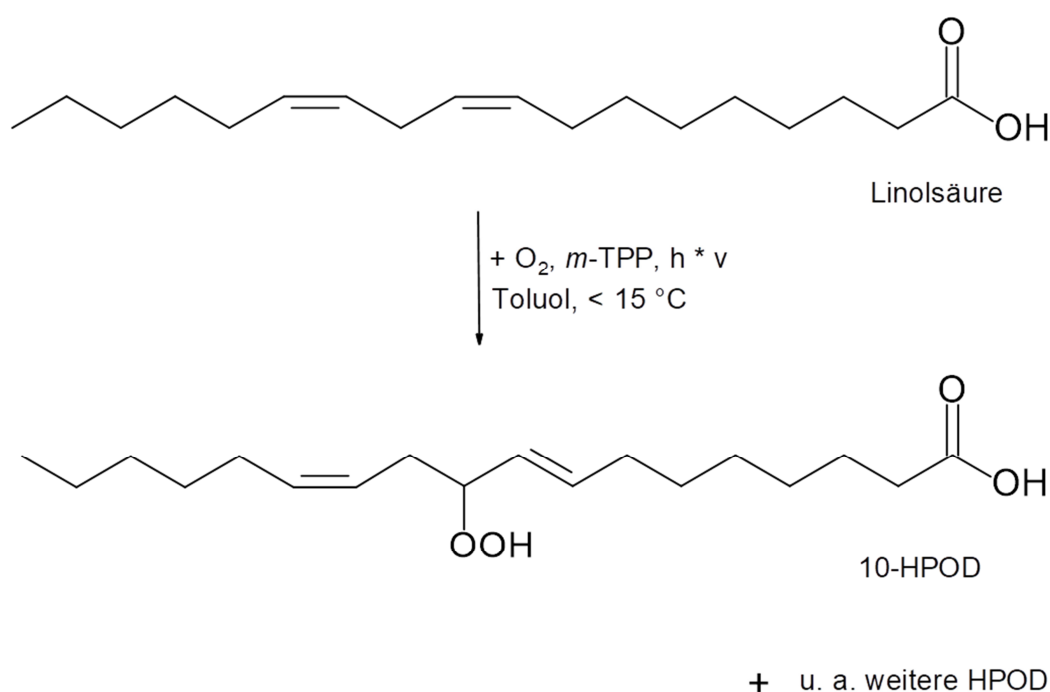


Abb. 4.6: Synthese von 10-HPOD mittels Photooxygenierung

Aus der Reaktionsmischung wurde die hydroperoxidhaltige Fraktion säulen-chromatographisch abgetrennt und aus dieser Fraktion mittels präparativer HPLC 10-HPOD isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels GC-MS nach Derivatisierung. Bei der Derivatisierung wurde zunächst die Hydroperoxid-Funktion mittels Natriumborhydrid zum korrespondierenden Alkohol reduziert und im zweiten Schritt die erhaltene Hydroxycarbonsäure mit MSTFA zum Trimethylsilylether bzw. -ester silyliert. Das EI-Massenspektrum wurde anschließend u. a. anhand der Spektren

analoger Verbindungen bzw. von ähnlich derivatisiertem 10-HPOD interpretiert. Vergleichsspektren in Datenbanken waren nicht verfügbar.

Charakteristisch für die EI-Massenspektren der Trimethylsilylderivate von Hydroxycarbonsäuren ist eine ausgeprägte α -Spaltung benachbart zum Trimethylsilylether (Rontani und Aubert 2008), welche sich zur Bestimmung der Position der Hydroperoxidgruppe nutzen lässt. Beim Derivat von 10-HPOD tritt von den zwei denkbaren α -Spaltungen nur die in Abb. 4.7 gezeigte auf. Die andere α -Spaltung würde ein instabiles Vinylradikal ergeben, was ungünstig ist (Rontani und Aubert 2008). Die bevorzugte Spaltung ergibt das Ion m/z 329, welches Basepeak des Massenspektrums ist. Das Spaltstück der Masse 111 wird als Neutralverlust nicht detektiert. Die analoge Spaltung beschrieben auch Wurzenberger und Grosch (1984c) für das Massenspektrum des Methylester-TMS-Ether-Derivats von 10-HPOD.

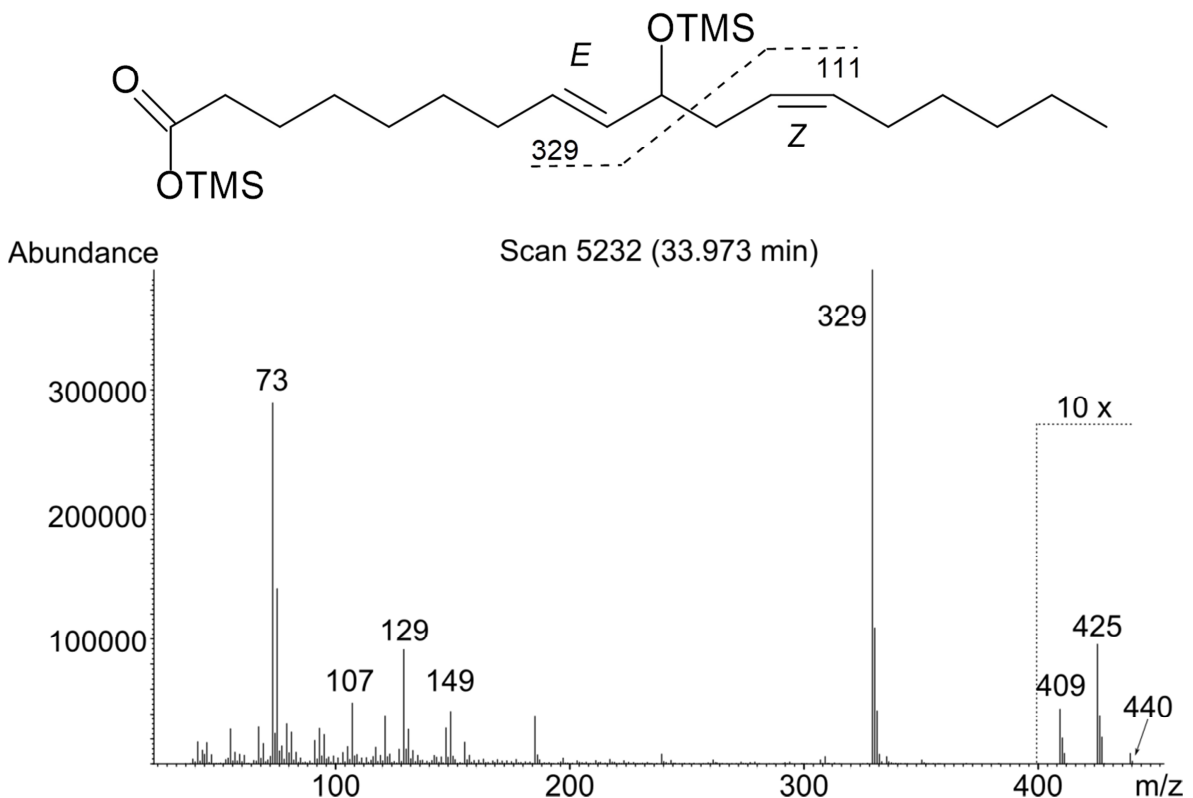


Abb. 4.7: Struktur des 10-HPOD Derivats (gestrichelt: α -Spaltung) und zugehöriges Massenspektrum (EI, Bereich $m/z > 400$ 10-fach vergrößert dargestellt)

Das Massenspektrum zeigt als intensive Signale daneben u. a. die Ionen m/z 73 und m/z 75. Diese sind charakteristisch für Trimethylsilylether und -ester und sind auf

eine ionisierte TMS-Gruppe $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$ bzw. ein Dimethylsiloxy-Fragment $[(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{OH}]^+$ zurückzuführen (Poole 2013).

Weiterhin treten mit geringer Intensität das Molekülion $[\text{M}^{++}]$ (m/z 440) und die daraus gebildeten Ionen m/z 425 sowie m/z 409 auf. Der Verlust einer Methylgruppe aus TMS-Gruppen $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ist ausführlich in der Literatur beschrieben (Rontani und Aubert 2008, Poole 2013) und ergibt hier das Ion m/z 425. In Trimethylsilylether- und Trimethylsilylester-Derivaten von Hydroxycarbonsäuren tritt neben dem Verlust einer Methylgruppe auch der Neutralverlust von Methan nach Umlagerung auf $[\text{M}-31]^+$, Rontani und Aubert 2008). $[\text{M}-31]^+$ erklärt hier das Auftreten von m/z 409.

Durch die gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung des Derivats von 10-HPOD wurde die isolierte Verbindung als 10-Hydroperoxid der Linolsäure bestätigt.

Während in der Literatur zur Identifizierung von 10-HPOD zumeist eine drei- oder vierstufige Derivatisierung aus Reduktion des Hydroperoxids, Methylierung der Carboxylgruppe und Silylierung der Hydroxygruppe sowie gegebenenfalls noch einer zusätzlichen Hydrierung der Doppelbindungen (bspw. Wurzenberger und Grosch 1984c, Kermasha *et al.* 2002) genutzt wurde, erlaubte die angewandte Derivatisierung die gaschromatographische Untersuchung nach nur zwei Schritten (Reduktion, Silylierung).

Eine Untersuchung der Konfiguration der Doppelbindungen ist mittels GC-MS des 10-HPOD-Derivats nicht möglich. Insbesondere zu diesem Zweck, aber auch zur generellen Bestätigung der Identität, wurde das isolierte 10-HPOD mittels NMR untersucht.

Die Ergebnisse im ^1H -NMR und ^{13}C -NMR bestätigten die Identität des 10-HPOD. In den 2D- ^1H -NOESY-Experimenten wurden Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffen an C-9 und C-7 sowie zwischen den Wasserstoffen an C-11 und C-14 festgestellt (vgl. Abb. 3.17). Aus dem Auftreten dieser Kern-Overhauser-Effekte folgt, dass die Doppelbindung $\text{C}_8=\text{C}_9$ (*E*)-konfiguriert und die Doppelbindung $\text{C}_{12}=\text{C}_{13}$ (*Z*)-konfiguriert ist. Bei dem isolierten Syntheseprodukt handelt es sich damit zweifelsfrei um das gewünschte 10-HPOD (10-Hydroperoxy-octadeca-8(*E*),12(*Z*)-diensäure).

4.3.2 Nachweis von 10-HPOD in Myzel

Anhand der Übereinstimmung von KI und Massenspektren mit dem Derivat des synthetisierten Standards wurde 10-HPOD in Extrakten von Homogenaten des Myzels von *L. edodes* mittels GC-MS nach Derivatisierung nachgewiesen. 10-HPOD kam dabei unabhängig vom Zusatz von Linolsäure in den Extrakten vor.

Wurzenberger und Grosch (1984c) postulierten 10-HPOD als Intermediat für die Bildung von Oct-1-en-3-ol aus Linolsäure nachdem sie zeigen konnten, dass 10-HPOD durch die Hydroperoxidlyase-Aktivität von *A. bisporus* in Oct-1-en-3-ol gespalten wird. Ein Nachweis von 10-HPOD in Pilzen wurde allerdings nicht berichtet.

Wesentlich später wiesen Matsui *et al.* (2003) und Akakabe *et al.* (2005) in ihren Untersuchungen 10-HPOD in Homogenaten von *L. decadetes* bzw. in *L. edodes* und *T. matsutake* nach, indem sie es *in situ* mit Glutathionperoxidase reduzierten. Im Vergleich zu Kontrollexperimenten verringerte sich dabei die Bildung von Oct-1-en-3-ol stark und die Menge an reduziertem 10-HPOD stieg in gleichem Maße an. Akakabe *et al.* (2005) bestimmten für das 10-HPOD in *L. edodes* einen Enantiomerenüberschuss ee von 88% – 92% zugunsten der (S)-Form.

Über den Nachweis von 10-HPOD in submers kultiviertem Myzel von Basidiomyceten lagen bislang keine Berichte vor. Das Vorkommen von 10-HPOD in Homogenaten von submers kultiviertem Myzel von *L. edodes* liefert damit einen Beleg, dass die Bildung von Oct-1-en-3-ol dort analog zu der Biosynthese in Fruchtkörpern abläuft.

4.4 Untersuchung und Isolierung der Hydroperoxidlyase

Wurzenberger und Grosch (1984b,c) zeigten in ihren Arbeiten die stereospezifische Spaltung von 10(S)-HPOD zu *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol durch die Hydroperoxidlyase-Aktivität aus *A. bisporus*. Für die Bildung von Oct-1-en-3-ol in Pilzen gehen die Autoren daher von zwei Enzymen aus: einer Lipoxygenase bzw. Dioxygenase, welche Linolsäure zu 10-HPOD umsetzt, und der genannten Hydroperoxidlyase, welche das 10-HPOD spaltet (vgl. Abb. 1.4). Ob es sich um zwei getrennte Enzyme oder einen Enzymkomplex oder ein Fusionsprotein mit zwei Aktivitäten handelt, ist bislang nicht geklärt worden.

Hiervon unabhängig und weiterhin davon unabhängig, dass möglicherweise weitere Hydroperoxidlyasen mit anderer Spezifität in Basidiomyceten vorkommen, soll im Folgenden unter Hydroperoxidlyase (HPL) die Enzymaktivität verstanden werden, welche die Spaltung von 10-HPOD zu Oct-1-en-3-ol und 10-ODA katalysiert.

4.4.1 Assay

Assays für die Bestimmung der Hydroperoxidlyase-Aktivität können entweder auf der Messung des Verbrauchs an Substrat oder der Bestimmung der Mengen an gebildeten Produkten basieren. Zur Messung der Aktivität von Hydroperoxidlyasen aus Pflanzen werden häufig photometrische Assays genutzt, welche zumeist auf der Abnahme der Absorption durch den Verbrauch der Fettsäurehydroperoxide ($\lambda_{\max} = 232 - 234$ nm für konjugierte Diene; bspw. Fauconnier *et al.* 1997, Long *et al.* 2010, Shibata *et al.* 1995) oder auf der Extinktionsabnahme bei $\lambda = 340$ nm, die durch die Oxidation von NADH in einer gekoppelten Umsetzung der entstandenen Aldehyde durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) verursacht wird, beruhen (Vick 1991, Itoh und Vick 1999).

Für die Messung der Hydroperoxidlyase-Aktivität in Pilzen sind beide Ansätze nicht anwendbar, da zum einen das Substrat 10-HPOD kein konjugiertes Dien ist und folglich keine Absorption bei 232 – 234 nm aufweist und zum anderen die Produkte keine geeigneten Aldehyde für die Umsetzung mittels ADH sind. Entsprechend mussten für die Messung andere Assays gefunden werden. In der Literatur sind verschiedene Methoden für die Bestimmung von Hydroperoxiden beschrieben, welche auf der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch die Hydroperoxide und der anschließenden Bildung eines farbigen Fe(III)-Komplexes beruhen (z. B. als *ferrous*

oxidation-xylene orange (FOX)-Assay, Bou *et al.* 2008, Gay und Gebicki 2002). Gemeinsam ist diesen Assays, dass bei der Reaktion sämtliche oxidierenden Bestandteile erfasst werden und aufgrund der Bedingungen keine kinetische Messung, sondern nur eine Endpunktbestimmung möglich ist. Hier wurde ein von Wurzenberger (1986) beschriebenes Protokoll, bei welchem der Eisen(III)-Thiocyanat-Komplex photometrisch bestimmt wird, nach Modifizierung genutzt. Dieser Assay (FTC-Assay, vgl. 2.11.7) ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Menge an 10-HPOD, jedoch ist keine Unterscheidung zwischen der gesuchten HPL-Aktivität und anderen Einflüssen wie Zerfall oder Reduktion des 10-HPOD möglich. Daher wurde der Assay lediglich als Vorauswahl bei der Prüfung auf HPL-Aktivität genutzt und als spezifischerer Assay die Bestimmung des Produktes Oct-1-en-3-ol mittels GC verwendet.

Insbesondere der Zerfall des Hydroperoxids kann die Messung der Enzymaktivität stören, denn 10-HPOD ist ein recht instabiles Fettsäurehydroperoxid und kann bereits durch Spuren von Fe^{2+} -Ionen oder Hämatin gespalten werden (Labeque und Marnett 1987). Als Produkt der β -Spaltung ist dabei als C_{10} -Spaltstück 10-ODA nachgewiesen worden (Labeque und Marnett 1988). Als zweites Spaltstück wurde ein Oct-2-enylradikal postuliert (Labeque und Marnett 1988) und nachgewiesen (Natrajan und Hecht 1991), welches zu Oct-2-en-1-ol und Oct-2-enal sowie durch Mesomeriestabilisierung auch zu Oct-1-en-3-ol als Endprodukten führen kann (vgl. Abb. 4.8). Sowohl Oct-2-en-1-ol und Oct-2-enal als auch Oct-1-en-3-ol wurden in den Umsetzungen nachgewiesen (Labeque und Marnett 1987, Natrajan und Hecht 1991). Folglich wäre auch die Bestimmung des Produktes Oct-1-en-3-ol allein als Maß für die HPL-Aktivität anfällig für eine Verfälschung durch den Zerfall. Entsprechend erfordert die Messung geeignete (Negativ)-Kontrollen.

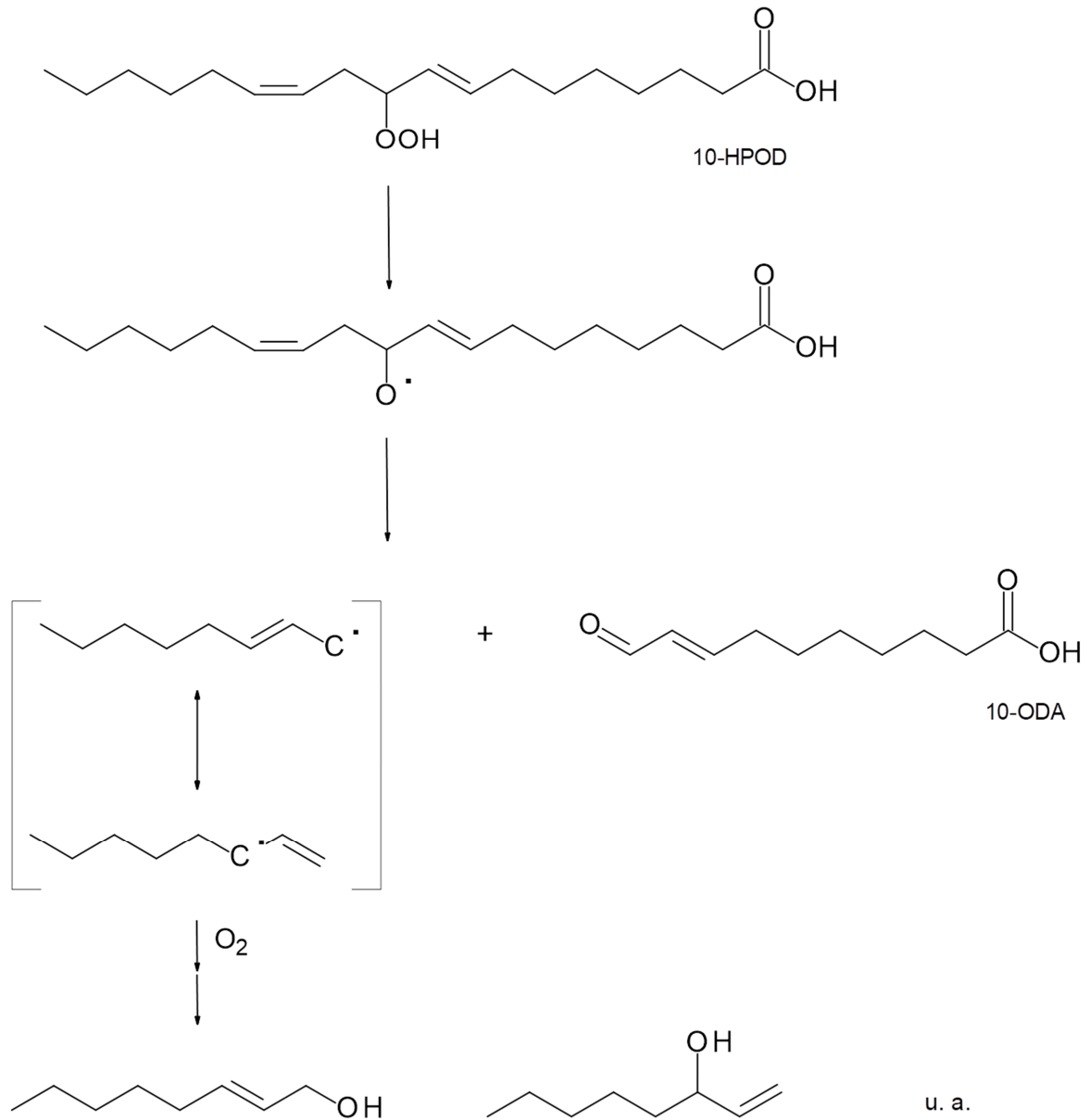


Abb. 4.8: Zerfall von 10-HPOD (modifiziert nach Labeque und Marnett 1988, Natrajan und Hecht 1991)

Brash *et al.* (2014) zeigten, dass die Spaltung von 10(S)-HPOD durch Hämatin oder Eisen(II)-Ionen zu racemischem Oct-1-en-3-ol führt. Entsprechend ist beim Zerfall von racemischem 10-HPOD, wie es in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzt wurde, ebenfalls racemisches Oct-1-en-3-ol zu erwarten. Dagegen liefert die HPL-katalysierte Spaltung von 10-HPOD *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol mit hohem Enantiomerenüberschuss (Wurzenberger und Grosch 1984b).

Die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses bietet daher die Möglichkeit, zwischen enzymatisch gebildetem und durch Zerfall entstandenem Oct-1-en-3-ol zu

differenzieren. Hierzu wurde die enantio-GC-Methode, welche zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses des biotechnologisch hergestellten Oct-1-en-3-ols verwendet wurde (2.8.6, 3.1.3), vom GC-FID-System auf ein GC-System mit massenspektrometrischer Detektion übertragen. Zudem wurde als Extraktionsverfahren die HS-SPME verwendet (2.11.8, Tab. 2.22), da diese eine schonende Extraktion ermöglicht, nicht umgesetztes 10-HPOD nicht extrahiert wird und somit ein Zerfall des überschüssigen Substrats soweit wie möglich vermieden wird.

4.4.2 Isolierung der Hydroperoxidlyase

Im Kulturüberstand einer Submerskultur von *L. edodes* wurde keine HPL-Aktivität festgestellt (3.4.1). Eine Sekretion der gesuchten HPL in das Medium der Submerskultur kann somit ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit dem allgemeinen Kenntnisstand (u. a. Wurzenberger und Grosch 1984a, Morawicki und Beelman 2008) wie auch mit den Ergebnissen zur biotechnologischen Herstellung von Oct-1-en-3-ol (3.1.2, 4.1.2). Die Bildung von Oct-1-en-3-ol erfolgt im Wesentlichen nach Zellaufschluss, wenn die Kompartimentierung von Enzymen und Substrat aufgehoben wird. Demnach stellen Homogenate von Myzel oder Fruchtkörpern von *L. edodes* geeignete Ausgangsmaterialien für die Isolierung des intrazellulären Enzyms dar.

Das Homogenat von Myzel bzw. Fruchtkörpern wurde nicht mit dem oben beschriebenen Assay (4.4.1) auf HPL-Aktivität geprüft, da aufgrund der Ergebnisse zur Bildung von Oct-1-en-3-ol zum einen klar war, dass HPL-Aktivität vorhanden ist. Zum anderen ist aufgrund der Biosynthese aus der endogenen Linolsäure bereits ein hoher Gehalt an Oct-1-en-3-ol vorhanden, sodass eine Steigerung durch Zusatz von 10-HPOD vermutlich nur gering ausfällt. Da die Bildung von Oct-1-en-3-ol auf diesem Weg nicht zu vermeiden ist, ohne einen Verlust an gesuchter Enzymaktivität zu riskieren, ergibt sich folglich ein gewisser Grundgehalt an Oct-1-en-3-ol in allen Ansätzen des Assays. Dieser nimmt mit fortschreitender Isolierung der HPL jedoch ab und war nach den Reinigungsschritten mittels FPLC vernachlässigbar gering gegenüber der Umsetzung bzw. dem in den Negativkontrollen festgestellten Zerfall (3.4.4).

Das aus der endogenen Linolsäure gebildete Oct-1-en-3-ol weist naturgemäß einen hohen Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers auf (siehe bspw. Abb. 3.20). Infolgedessen liegt auch in den Negativkontrollen kein Racemat vor; der Anteil an

R-(-)-Oct-1-en-3-ol überwiegt in Abhängigkeit des Ausmaßes von Grundgehalt und Zerfall unterschiedlich stark (vgl. bspw. Abb. 3.21).

Das Homogenat wurde mittels Ultrazentrifugation separiert und zunächst der Überstand auf HPL-Aktivität geprüft (3.4.2). Im Überstand wurde keine Aktivität festgestellt, somit liegt die gesuchte HPL in den Zellen nicht als gelöstes Protein vor (Abb. 3.20). In Suspensionen des Pellets wurde die HPL-Aktivität nachgewiesen (Abb. 3.21). Im Pellet der Ultrazentrifugation befindet sich die Mikrosomenfraktion der Zellen. Diese enthält u. a. Bruchstücke der Membranen mit den zugehörigen membrangebundenen Proteinen. Dass sich die gesuchte HPL-Aktivität in der Mikrosomenfraktionen befindet, steht in Einklang mit Resultaten von Wurzenberger (1986), welche herausfand, dass eine Mikrosomenfraktion von *A. bisporus* in der Lage ist, Oct-1-en-3-ol aus Linolsäure zu bilden.

Um die gesuchte HPL isolieren und charakterisieren zu können, musste das Protein unter Verwendung eines Detergens aus dem Pellet extrahiert werden.

In der Biochemie verwendete Detergentien bestehen aus einem hydrophoben Kohlenwasserstoff-Teil sowie einer polaren Kopfgruppe und können nach der Struktur der hydrophilen Kopfgruppe in kationische, anionische, zwitterionische und nichtionische Detergentien eingeteilt werden (Linke 2009). Nichtionische Detergentien wie Alkylglycoside oder Triton X-100 wirken in der Regel recht mild, da eher Lipid-Lipid bzw. Lipid-Protein-Wechselwirkungen als Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgebrochen werden. Sie sind daher besonders zur nicht-denaturierenden Solubilisierung von Membranproteinen geeignet, obgleich ein gewisser Aktivitätsverlust durch die Solubilisierung selbst zu erwarten ist (Seddon *et al.* 2004, Lin und Guidotti 2009). Weiterhin sind nichtionische Detergentien kompatibel mit verschiedenen Trennprinzipien wie Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltrationschromatographie, die bei der FPLC angewendet werden (Lin und Guidotti 2009, Seddon *et al.* 2004). Die Auswahl eines für die Reinigung des Zielproteins geeigneten Detergens bleibt trotz zu beachtender Kriterien wie der Kompatibilität mit Methoden und verfügbaren Parametern wie der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) ein Stück weit ein *trial and error*-Verfahren (Linke 2009).

Wurzenberger (1986) untersuchte an dem Überstand eines Homogenats von *A. bisporus* den Einfluss der Detergentien Triton X-100, Saccharosemonostearat und

Saccharosemonolaurat (SML) in Konzentrationen von 0,25% bis 1,0% auf die Aktivität zur Bildung von Oct-1-en-3-ol aus Linolsäure. Als am besten geeignet erwies sich SML, welches auch in späteren Experimenten zur Extraktion der Aktivität aus der Mikrosomenfraktion verwendet wurde. Zudem untersuchte Wurzenberger (1986) die Lagerstabilität dieser Enzymaktivität in einem durch Fällung mit Polyethylenglykol gewonnenen Enzympräparat in Abhängigkeit des Zusatzes verschiedener Glykole. Aus der Auswahl Glycerin, Methylglykol, Ethylenglykol, Polyethylenglykol (400) und Glycerolpolypropoxylat („TG 300“) bewirkte letzteres die beste Stabilisierung der Enzyme.

Aufgrund der Ergebnisse von Wurzenberger (1986) wurde SML als nichtionisches Detergens für die Solubilisierung der HPL aus der Mikrosomenfraktion von *L. edodes* gewählt. Zudem wurde dem Puffer 10% Glycerolpolypropoxylat zur Stabilisierung der HPL-Aktivität zugesetzt. Ein weiterer Vorteil von SML ist, dass es im Gegensatz zu Detergentien mit aromatischen Strukturelementen keine Absorption bei 280 nm aufweist und somit die UV-Detektion der Proteine bei der FPLC nicht stört.

Die Extraktion der Mikrosomenfraktion bewirkte die beabsichtigte schonende Solubilisierung der HPL, denn im Überstand der Ultrazentrifugation wurde starke HPL-Aktivität nachgewiesen (3.4.3). Ein Protein gilt als gelöst, wenn es nach einer Ultrazentrifugation (105.000 x g, 1 h) im Überstand verbleibt (Lin und Guidotti 2009). Wurzenberger (1986) hatte die Anwendung des verwendeten Puffers und Detergens für die Untersuchung der Bildung von Oct-1-en-3-ol aus Linolsäure durch die Mikrosomenfraktion aus *A. bisporus* beschrieben. Dabei blieb jedoch unklar, ob die gesuchten Enzyme nach der Behandlung tatsächlich gelöst vorlagen, da anschließend nur eine Zentrifugation mit 10.000 x g durchgeführt wurde.

Das Enzympräparat mit gelöster HPL-Aktivität wurde verwendet, um zu prüfen, welche Trenntechniken für die Reinigung mittels FPLC anwendbar sind.

Zunächst wurde die Enzymlösung mittels Ionenaustauschchromatographie an dem starken Anionenaustauscher Q FF getrennt (3.4.4.1). Die Trennung erfolgte in drei Bereiche (nicht gebundenes, schwach gebundenes und stark gebundenes Protein). Die gesuchte Aktivität wurde zunächst mittels FTC-Assay und nachfolgend auch durch den Assay der Oct-1-en-3-ol-Bildung im Pool des schwach gebundenen Proteins nachgewiesen (Abb. 3.24). Die Anionenaustauschchromatographie stellt ein

geeignetes Verfahren für die Isolierung der HPL dar, da das gesuchte Enzym nicht denaturiert wird und weitere Proteine teilweise abgetrennt werden.

Weiterhin wurde als Trennverfahren die Gelfiltrationschromatographie unter Verwendung von zwei verschiedenen Trennsäulen getestet (3.4.4.2). Diese liefert neben der Reinigung der HPL-Aktivität durch Kalibrierung mit Proteinstandards bekannten Molekulargewichts auch eine Information über das apparente Molekulargewicht des gesuchten Enzyms.

Aufgrund der anfangs unbekanntem molekularen Masse des Zielproteins wurde zunächst eine Gelfiltration auf einer ENrich 650 SEC-Trennsäule, welche für die Trennung in einem weitem Molekulargewichtsbereich geeignet ist (5 kDa bis 650 kDa, Herstellerangabe Bio-Rad), durchgeführt. Die Fraktionen wurden in vier Pools zusammengefasst. Die stärkste HPL-Aktivität wurde im Molekulargewichtsbereich von 76 bis etwa 37 kDa detektiert (3.4.4.2; Abb. 3.25, Abb. 3.26).

Auf Basis dieses Ergebnisses wurde eine weitere Gelfiltration mit einer Superdex 75-Trennsäule durchgeführt, welche einen optimalen Trennbereich von 3 kDa bis 70 kDa besitzt und somit eine bessere Auflösung verspricht (Herstellerangabe GE Healthcare, Abb. 3.28). Die HPL-Aktivität wurde mittels des gaschromatographischen Assays (2.11.8) in den Fraktionen im Molekulargewichtsbereich von 66 kDa bis 42 kDa nachgewiesen (Abb. 3.30, Abb. 3.31).

Die Gelfiltrationschromatographie erwies sich als geeigneter Schritt zur Reinigung, denn sie führte aufgrund der Elution des aktiven Enzyms in einem diskreten Peak zu einer partiellen Reinigung der gesuchten HPL. Die gesuchte HPL besitzt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 42 kDa bis 66 kDa.

Für die finale Reinigung des Zielenzym wurden Fruchtkörper als Ausgangsmaterial verwendet und für die chromatographische Reinigung des solubilisierten Enzyms wurde eine Kombination aus den oben beschriebenen FPLC-Techniken in der Reihenfolge Gelfiltrationschromatographie auf der Superdex 75-Trennsäule und nachfolgender Anionenaustauschchromatographie gewählt. Bei der Gelfiltration begrenzt das recht geringe injizierbare Probenvolumen die Leistungsfähigkeit des Trennschrittes. Zusätzlich kommt es bei der Chromatographie zu einer Verdünnung der Enzymaktivität (Pingoud und Urbanke 1997; Abschnitt 4.1.2.2 S. 72 ff). Dagegen ist bei der Ionenaustauschchromatographie die Bindungskapazität der Austauschersäule limitierend und das Injektionsvolumen kann beliebig groß sein. Da die

Proteinlösung der Solubilisierung die höchste Konzentration an Protein aufweist, ist es zweckmäßig, sie zunächst zur Gelfiltration einzusetzen. Bei der Ionenaustauschchromatographie kann entsprechend mehr Volumen der Fraktionen der Gelfiltration eingesetzt werden und durch das Beladen der Trennsäule möglicherweise sogar eine gewisse Konzentrierung der Aktivität erfolgen (Pingoud und Urbanke 1997; Abschnitt 4.1.2.2 S. 78 ff).

Weiterhin erfordert diese Kombination der Reinigungsschritte keine Umpufferung. Da bei Umpufferungen die Gefahr besteht, dass das gelöste Enzym ausfällt oder an Membranen adsorbiert wird, ist dies besonders vorteilhaft.

Die zweistufige Reinigung (3.4.5) ergab eine Enzymlösung mit leichter HPL-Aktivität im Assay, wobei das gebildete Oct-1-en-3-ol einen starken Überschuss des *R*-(-)-Enantiomers aufwies (Abb. 3.35). Die Überprüfung der Reinheit erfolgte nach Konzentrierung mittels SDS-PAGE mit Färbung mit kolloidalem Coomassie und ergab zwei schwache Proteinbanden (3.4.6, Abb. 3.36). Das Molekulargewicht der Banden von 62 kDa bzw. 55 kDa weist eine gute Übereinstimmung mit dem durch Gelfiltration abgeschätzten apparenten Molekulargewicht des Zielenzym auf.

Die Banden wurden zur Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS sowie zur *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS untersucht und die gewonnenen Daten bioinformatisch ausgewertet (3.4.6)². Zusätzlich zu den Datenbankvergleichen wurden für die Proteinidentifizierung insbesondere auch die Sequenzen von Enzymen, die als sehr ähnlich bzw. gleich in ihren Reaktionen beschrieben sind, herangezogen und Alignments erstellt. In einem Patent von Kim *et al.* (2012) wird postuliert, die DNA-Sequenzen der an der Oct-1-en-3-ol-Biosynthese beteiligten Enzyme (Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase) aus *T. matsutake* zu nennen. Senger *et al.* (2005) berichten über eine Lipoxygenase aus dem Moos *Physcomitrella patens*, welche auch Hydroperoxidlyase-Aktivität besitzt und als Produkte u. a. Oct-1-en-3-ol sowie Oct-2-en-1-ol bildete. Brash *et al.* (2014) berichten über ein Paar assoziierter Proteine bestehend aus einer 10(S)-Dioxygenase und einer Katalase-verwandten 10(S)-Hydroperoxidlyase aus dem Cyanobakterium *Nostoc punctiforme*, welche auch in Bezug auf die Stereochemie die identische Reaktion von Linolsäure zu Oct-1-en-3-ol wie in Basidiomyceten beschrieben, katalysieren (vgl. 4.4.3).

² Die Analysen und Auswertungen wurden durch Prof. Dr. G. Lochnit (Institut für Biochemie, Fachbereich Medizin JLU Gießen; Proteinidentifizierung) und durch Dr. M. Nimtz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig; *de novo*-Sequenzierung) durchgeführt.

Die Proteinidentifizierung ergab weder nennenswerten Homologien zu bekannten oder hypothetischen Proteinen aus Pilzen noch zu den oben genannten Enzymen. Ebenso lieferte die Datenbanksuche mit den Sequenzabschnitten der *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS keine aussagekräftigen Treffer.

Mittels *de novo*-Sequenzierung nach flüssigchromatographischer Trennung der tryptischen Peptide (LC-ESI-MS/MS) wurden weitere Peptidsequenzen generiert, welche beim Datenbankabgleich zu Treffern führten (Tab. 3.21 und Tab. 3.22). Bei den Treffern der Datenbanksuche handelt es sich um verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Organismen. Auffällig ist, dass einige Peptide und damit auch die Treffer der Datenbanksuche in beiden Banden nachgewiesen wurden.

Die Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS basiert auf dem Abgleich der experimentell ermittelten Peptidmassen mit berechneten Peptidmassen aus Datenbanken (sog. *peptide mapping* oder *peptide-mass fingerprinting*, Aebersold und Mann 2003). Ein positiver Abgleich erfordert daher eine Homologie zwischen dem untersuchten Protein und Datenbankeinträgen. Bislang ist kein Enzym mit Hydroperoxidlyase-Aktivität aus Pilzen beschrieben worden und die oben genannten Enzyme mit Hydroperoxidlyase-Aktivität stammen zum Teil aus phylogenetisch weit entfernten Organismen. Daher ist die ausbleibende Identifikation des Proteins mittels MALDI-TOF-MS vermutlich auf die zu geringe Ähnlichkeit mit bekannten Proteinen zurückzuführen.

Bei der *de novo*-Sequenzierung werden die durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptide in der Regel mittels ESI ionisiert und im ersten Massenanalysator intensive Ionen für eine Fragmentierung ausgewählt. In der zweiten MS-Stufe werden die durch Fragmentierung entstandenen Tochterionen analysiert. Aus den gemessenen Spektren kann anhand von Ionenserien die Struktur des Peptides abgeleitet werden (Domon und Aebersold 2006, Standing 2003). Die *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS ist daher für die Auswertung nicht zwingend auf Datenbanken von Proteinen oder Genomsequenzen angewiesen. Sie findet u. a. Anwendung bei der Analyse von Proteinen aus Organismen deren Genomsequenz nicht verfügbar ist und bei der Untersuchung von Proteinen, die durch *splicing* in verschiedenen Isoformen vorkommen oder posttranslational modifiziert wurden (Seidler *et al.* 2010, Standing 2003).

Die *de novo*-Sequenzierung erfasst nur einen kleinen Teil der vorhandenen Peptide, da die intensivsten Peptide für die weitere Fragmentierung gewählt werden und

damit ausschließlich deren Peptidsequenzen ermittelt werden. Dieses Problem wird durch eine flüssigchromatographische Trennung der tryptischen Peptide vor der massenspektrometrischen Untersuchung gemildert, was zu mehr sequenzierten Peptiden und einer höheren Sensitivität der Technik führt. Schlussendlich können somit deutlich mehr Proteine in der Probe nachgewiesen werden (Karpievitch *et al.* 2010). Die *de novo*-Sequenzierung mittels LC-ESI-MS/MS wird daher auch bei Proteom-Studien genutzt (Hughes *et al.* 2010).

Die gesuchte Hydroperoxidlyase wurde über zwei Schritte gereinigt und mittels SDS-PAGE wurden zwei Banden detektiert (Abb. 3.36). Dennoch können die Banden neben dem Zielprotein andere Proteine gleicher Größe als Verunreinigung enthalten. Weisen diese eine große Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in Datenbanken oder hypothetischen Proteinen aus sequenzierten Genomen auf, können sie aufgrund der hohen Empfindlichkeit der *de novo*-Sequenzierung mittels LC-ESI-MS/MS als Treffer des Datenbankabgleichs der tryptischen Peptide nachgewiesen werden. Dies kann auch die sehr verschiedenen Treffer der Datenbanksuche erklären (Tab. 3.21 und Tab. 3.22).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das beschriebene Protokoll den *proof of principle* für die Reinigung der HPL aus *L. edodes* und wertvolle Informationen wie das Molekulargewicht des Enzyms (3.4.5, 3.4.6) liefert.

4.4.3 Hydroperoxid-metabolisierende Enzyme und möglicher Mechanismus der Hydroperoxidlyase

Die auch als Oxylin-Pathway bekannte Biosynthese von oxofunktionalisierten Fettsäurederivaten ist nahezu ubiquitär in allen Lebewesen verbreitet und dient der Bildung bioaktiver Moleküle. Insbesondere in Pflanzen und Säugetieren ist sie gut untersucht (Feussner und Wasternack 2002, Mosblech *et al.* 2009, Funk 2001). Oxyline spielen in Pflanzen beispielsweise bei der Regulation von Entwicklung und Wachstum sowie als intra- und interzelluläre Signalmoleküle bei der Reaktion auf Umweltstress eine Rolle (Brash 1999, Wasternack und Feussner 2018, Howe und Schillmiller 2002). Im menschlichen Körper sind Oxyline u. a. in Form der Bildung von Leukotrienen durch die 5-LOX an Entzündungsprozessen beteiligt (Ivanov *et al.* 2010).

In Pflanzen beginnt die Biosynthese von Oxylipinen in der Regel mit der Oxygenierung von ungesättigten Fettsäuren durch Lipoxygenasen zu Fettsäurehydroperoxiden und führt neben vielen weiteren Produkten auch zu den als Aromastoffen relevanten *green leaf volatiles*, die durch Hydroperoxidlyase-Katalyse entstehen (Matsui 2006). Hydroperoxidlyase (HPL), Allenoxid-Synthase (AOS), Divinylether-Synthase (DES) sowie Epoxyalkoholsynthase (EAS) sind bekannte Hydroperoxid-verstoffwechselnde Enzyme, die zur CYP74-Familie innerhalb der Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme gehören (Lee *et al.* 2008, Toporkova *et al.* 2018).

Zwei Gruppen um Grechkin und Hamberg zeigten anhand der 13-HPL aus Guave (*Psidium guajava*, Grechkin und Hamberg 2004) und der 9-HPL aus Melone (*Cucumis melo* L., Grechkin *et al.* 2006), dass HPL entgegen früherer Annahmen (bspw. Matsui 1998) keine heterolytische Spaltung der Fettsäurehydroperoxide zu einem Aldehyd und einer Oxocarbonsäure bewirken, sondern als Isomerase die Umlagerung des Hydroperoxids zu einem instabilen Hemiacetal katalysieren. Das Hemiacetal wiederum zerfällt schnell in einen Aldehyd und einen Enol-Aldehyd, welcher sich zum Aldehyd umlagert. Auch andere CYP74-Enzyme wurden durch Experimente mit isotope markierten Substraten, gezielte Mutationen der Enzyme, durch Kristallstrukturanalysen sowie phylogenetische Analysen und Alignments auf Proteinebene eingehend untersucht (Lee *et al.* 2008, Brash 2009, Toporkova *et al.* 2017).

Abb. 4.9 gibt einen Überblick über die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen der Hydroperoxid-metabolisierenden Enzyme.

Erster Schritt ist bei allen Enzymen die homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung der Hydroperoxy-Gruppe unter Übertragung von $\cdot\text{OH}$ auf das Fe(III)-Ion der Hämgruppe und die Bildung der protonierten Ferryl-Spezies Fe(IV)-OH. Das Alkoxyradikal addiert an die benachbarte Doppelbindung und bildet dadurch ein mesomeriestabilisiertes Epoxyallylradikal. An dieser Stelle gehen die Reaktionswege der unterschiedlichen Enzymtypen auseinander.

In EAS erfolgt abschließend ein sog. *oxygen rebound*, d. h. die Rückübertragung des Hydroxylradikals, vom Häm-Eisen auf das Epoxyallylradikal. Dieser liefert als Produkt den Epoxyalkohol. Dagegen wird bei der AOS-Katalyse formal ein Wasserstoffatom aus dem Epoxyallylradikal eliminiert und als Produkte werden ein Allenoxid und Wasser erhalten.

Das Epoxyallylradikal kann sich aber auch unter homolytischer Spaltung der C-C-Bindung der Epoxygruppe zu einem Vinyloxy-carbonyl-Radikal umlagern. Bei der Bildung von Divinylethern durch DES erfolgt im letzten Reaktionsschritt die Abstraktion eines Wasserstoffs aus diesem. Formal wird also bei der Gesamtreaktion, wie auch bei der AOS, Wasser eliminiert. Bei der HPL hingegen findet ähnlich der EAS-Reaktionssequenz ein *oxygen rebound* des Hydroxylradikals auf das Vinyloxy-carbonylradikal statt. Das Endprodukt der HPL-Katalyse ist ein Hemiacetal (Brash 2009, Lee *et al.* 2008, Toporkova *et al.* 2018).

Inwieweit insbesondere bei AOS und DES intermediär Carbokationen (Epoxyallylkation bzw. Vinyloxy-carbokation) gebildet werden oder ausschließlich radikalische Intermediate vorkommen, ist nicht abschließend geklärt (Brash 2009). Für eine detaillierte Beschreibung der Reaktionsmechanismen basierend auf den Röntgenkristallstrukturanalysen von HPL und AOS wird auf Lee *et al.* (2008) verwiesen.

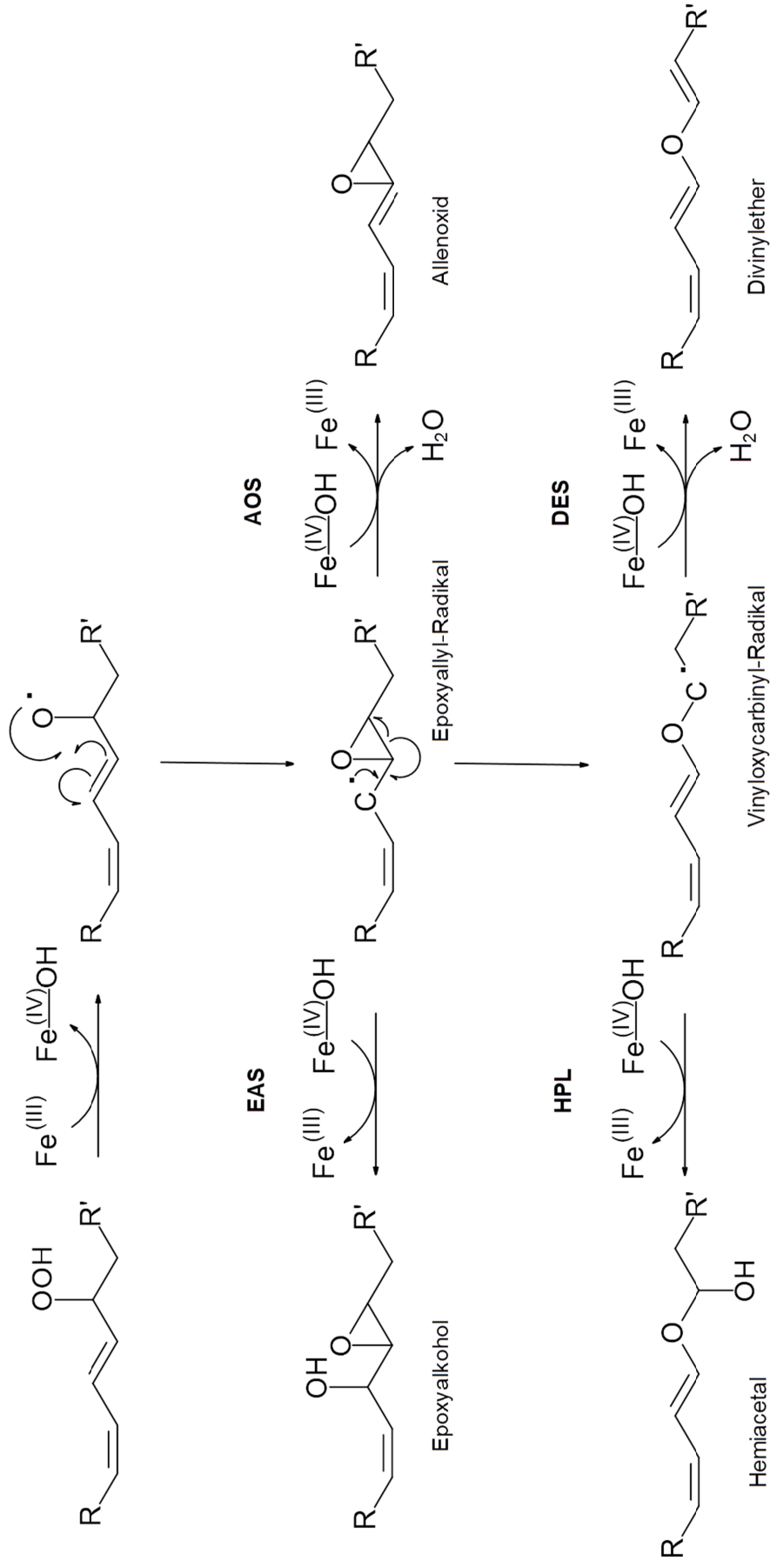


Abb. 4.9: Metabolismus von Fettsäurehydroperoxiden durch Enzyme der CYP74-Familie in Pflanzen: Mechanismen und Produkte der Katalyse durch EAS, AOS, HPL und DES (modifiziert nach Toporkova et al. 2018)

Auch in Pilzen sind eine Vielzahl an Oxylipinen, teilweise ihre Funktionen bzw. Auswirkungen sowie einige an der Biosynthese beteiligte Enzyme beschrieben worden (Brodhun und Feussner 2011, Gessler *et al.* 2017).

Eingehend ist die Bildung und Funktion u. a. der 8-Hydroxy- („psiB“) und 5,8-Dihydroxy-Derivate („psiC“) von Öl-, Linol- und Linolensäure sowie der δ -Lactonform von psiC („psiA“) in *Aspergillus*-Spezies (Ascomycota) untersucht worden. Die zusammenfassende Bezeichnung als *precocious sexual inducer factor* (*psi factor*) rührt von ihrer Funktion in der Steuerung der sexuellen und asexuellen Reproduktion her (Tsitsigiannis *et al.* 2005, Tsitsigiannis und Keller 2007, Wadman *et al.* 2009). So stimulieren beispielsweise 8(*R*)-Hydroxy-Linolsäure („psiB α “) und 5(*S*), 8(*R*)-Dihydroxy-Linolsäure („psiC α “) die Bildung sexueller Sporen und inhibieren gleichzeitig die Bildung asexueller Sporen in *Aspergillus nidulans*. Das δ -Lacton der 5(*S*), 8(*R*)-Dihydroxy-Linolsäure (8(*R*)-Hydroxy-octadeca-9,12-dien-5(*S*)-olid, „psiA α “) besitzt dagegen die gegenteilige Wirkung (Champe und el-Zayat 1989, Tsitsigiannis und Keller 2007). Die Bildung der *psi factors* erfolgt durch eine Gruppe von Fettsäure-Dioxygenasen aus der Myeloperoxidase (MPO)-Familie, welche eine Hämgruppe besitzen und als *psi-factor producing oxygenases* (Ppo) zusammengefasst werden (Garscha *et al.* 2007). Mittels bioinformatischer Techniken wurden in den Genomen mehrerer *Aspergilli* bis zu fünf Gene identifiziert, die putative Ppo-Enzyme codieren. Weiterhin ergaben phylogenetische Analysen, dass Ppo-Gene sowohl in saprophytischen und pathogenen Ascomyceten als auch in Basidiomyceten konserviert sind (Tsitsigiannis *et al.* 2005).

Eine Besonderheit der Ppo ist, dass sie als Fusionsproteine zwei Häm-Domänen besitzen. In der N-terminalen Region des Enzyms befindet sich eine Fettsäure-Hämperoxidase bzw. -Dioxygenase und für die C-terminale Region ergibt sich aufgrund der Sequenz eine Cytochrom P450-Domäne (Brodhun und Feussner 2011). Die Sequenzen der Ppo weisen dabei eine starke Homologie zu einer *linoleate diol synthase* (LDS) aus *Gaeumannomyces graminis* sowie zu Cyclooxygenasen auf (Garscha *et al.* 2007). Die 7,8-LDS aus *G. graminis* katalysiert die Umsetzung von Linolsäure zu 7(*S*),8(*S*)-Dihydroxy-octadecadiensäure über die Schritte der Oxygenierung zu 8(*R*)-HPOD und der Isomerisierung von 8(*R*)-HPOD zum Dihydroxy-Derivat (Brodowsky *et al.* 1992, Hamberg *et al.* 1994, Su *et al.* 1995). Bis zur Beschreibung der Ppo war die 7,8-LDS die einzige charakterisierte Dioxygenase mit Isomerase-Aktivität aus Pilzen (Garscha 2009).

Die *psi-factor producing oxygenase A* (PpoA) bewirkt die Bildung der psiB. Eine Häm-Domäne katalysiert die Oxygenierung von C18-Fettsäuren zu 8-Hydroperoxy-Derivaten und an der anderen erfolgt die Isomerisierung dieser zu 5,8-Dihydroxy-Fettsäuren (Nadler *et al.* 2011, Garscha 2009).

Bei PpoB ist bislang noch unklar, welche Reaktion das Enzym katalysiert, jedoch scheint die Cytochrom P450-Domäne aufgrund einer Mutation inaktiv zu sein (Garscha *et al.* 2007, Jernerén *et al.* 2010).

Die Deletion der PpoC-Gene in *A. nidulans* und *A. fumigatus* führte im Vergleich zu den Wildtypen zu einem Fehlen des 10(*R*)-HPOD im Spektrum der Oxylipine. Folglich wurde PpoC als 10(*R*)-Dioxygenase identifiziert (Garscha *et al.* 2007). Beachtenswert ist, dass PpoC bei der Bildung von 10-HPOD die gegenteilige Enantioselektivität zu der in Basidiomyceten für die Bildung von Oct-1-en-3-ol postulierten Dioxygenase-Aktivität zeigt (Garscha *et al.* 2007, Akakabe *et al.* 2005).

Brodhun *et al.* (2010) stellten bei Experimenten mit heterolog exprimiertem PpoC aus *A. nidulans* weiterhin lediglich einen Zerfall und keine enzymatische Umsetzung des 10(*R*)-HPOD zu C₈-Aromen, darunter auch Oct-1-en-3-ol, fest. Dies überrascht zunächst, da die enzymatische Bildung insbesondere von *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol und daneben auch anderen C₈-Verbindungen in *Aspergilli* bekannt ist (Kaminński *et al.* 1972, Kaminski *et al.* 1974, Miyamoto *et al.* 2014). Eine Erklärung liefert jedoch die Struktur von PpoC, die nur eine aktive Häm-Domäne, welche die Dioxygenierung katalysiert, vorhersagt. Während in anderen Ppo die Thiofunktion eines Cysteins das Häm-Eisen der Cytochrom P450-Domäne als fünfter Ligand koordiniert, ist in PpoC an dieser Position Cystein durch andere Aminosäuren ersetzt. Durch diese Mutation ist keine Isomerase-Aktivität möglich (Brodhun *et al.* 2010).

In Übereinstimmung damit bewiesen Miyamoto *et al.* (2014) durch Ausschalten von vier Ppo-Genen, darunter auch PpoC, und einer Lipoxygenase in *Aspergillus flavus*, dass die Bildung von *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol unabhängig von PpoC erfolgt.

Daneben sind in Pilzen eine Vielzahl weiterer Enzyme, die Fettsäuren oxidieren, inklusive einiger Lipoxygenasen mit unterschiedlicher Regio- und Stereospezifität beschrieben worden (Oliw und Su 2002, Gessler *et al.* 2017).

Außergewöhnlich ist das Vorkommen von Lipoxygenasen, welche im katalytischen Zentrum Mangan anstelle von Eisen als Zentralion aufweisen. Als erstes Enzym aus dieser Gruppe wurde eine 13-Lipoxygenase aus *G. graminis* isoliert und charakterisiert. Das Enzym wird sekretiert, weist einen hohen Glykosilierungsgrad

auf, besitzt ein Molekulargewicht im Bereich von 100 kDa – 140 kDa im nativen Zustand und von etwa 73 kDa deglykosiliert und setzt Linolen- sowie Linolsäure zu den jeweiligen 13*R*-Hydroperoxiden um (Su und Oliw 1998). Durch Abstraktion des pro-*S* Wasserstoffs an C11 der Fettsäure generiert das Enzym zunächst ein bisallylisches Radikal, welches entweder direkt durch Umlagerung und Oxygenierung zum 13(*R*)-Hydroperoxid umgesetzt oder erst reversibel an C11 oxygeniert wird. Das 11(*S*)-HPOD tritt nicht nur als Intermediat sondern auch als Nebenprodukt auf (Hamberg *et al.* 1998). Weitere bekannte Vertreter sind eine Mangan-Lipoxygenase aus *Fusarium oxysporum*, die bevorzugt 11(*R*)-konfigurierte Hydroperoxide und als Nebenprodukte 13(*R*)- und 9(*R/S*)-Hydroperoxide bildet, und eine 9(*S*)-Lipoxygenase aus *Magnaporthe salvinii*, welche gemeinsam mit einer spezifischen Epoxyallylalkohol-Synthase (EAS) sekretiert wird (Wennman und Oliw 2013).

Im Phylum der Basidiomyceten ist die Biosynthese von Oxylipinen noch wenig aufgeklärt. Auf stofflicher Ebene sind neben den C₈-Aromastoffen, ihren Vorstufen und den zugehörigen C₁₀-Verbindungen als weitere Oxylipine die 8-Hydroperoxy-, 13-Hydroperoxy-, 8-Hydroxy- und 8,11-Dihydroxy-Derivate von Linolsäure beschrieben worden (Tressl *et al.* 1982, Matsui *et al.* 2003, Brodowsky und Oliw 1993, Assaf *et al.* 1995, Wadman *et al.* 2005). Für die C₁₀-Verbindung 10-ODA ist eine Funktion in der Regulation des Pilzwachstums gezeigt worden (Mau *et al.* 1992). Im Bereich der Enzyme sind bislang nur 13-LOX, von denen einige neben ungesättigten Fettsäuren auch das Terpen Valencen umsetzen, aus *Pleurotaceae* isoliert und biochemisch charakterisiert worden (Fraatz *et al.* 2009, Tasaki *et al.* 2013, Plagemann *et al.* 2013, Leonhardt *et al.* 2013). Daneben ist über die Aktivität einer 8(*R*)-Linolsäuredioxygenase aus *L. arvalis* mit Ähnlichkeiten zu einer sekretierten 8(*R*)-Dioxygenase aus dem Ascomyceten *G. graminis* berichtet worden, jedoch wurde das Enzym nicht isoliert oder eingehend charakterisiert (Brodowsky und Oliw 1993). Über Enzyme, die Fettsäurehydroperoxide metabolisieren, ist aber noch nicht berichtet worden.

Als Hypothese für die HPL-katalysierte Spaltung von 10(*S*)-HPOD schlugen Wurzenberger und Grosch (1984b) zunächst vor, dass das Substrat in einer angenommenen hydrophoben Tasche des Enzyms fixiert wird und dieses dann die Spaltung der O-O-Bindung der Hydroperoxidgruppe induziert (Abb. 4.10). Die

Spaltung könnte demnach als eine homolytische Spaltung der Hydroperoxidgruppe, d. h. unter Übertragung eines OH-Radikals und Bildung eines Alkoxyradikals, oder mit ionischen Zwischenstufen erfolgen. Das Hydroxylradikal bzw. das Hydroxidion wird dann unter Ausbildung eines neuen Stereozentrums an C13 angelagert und in der Folge die Doppelbindung C12=C13 nach C11=C12 umgelagert. Abschließend erfolgt der Bruch der Bindung C10-C11 und die Ausbildung der Carbonylfunktion an C10.

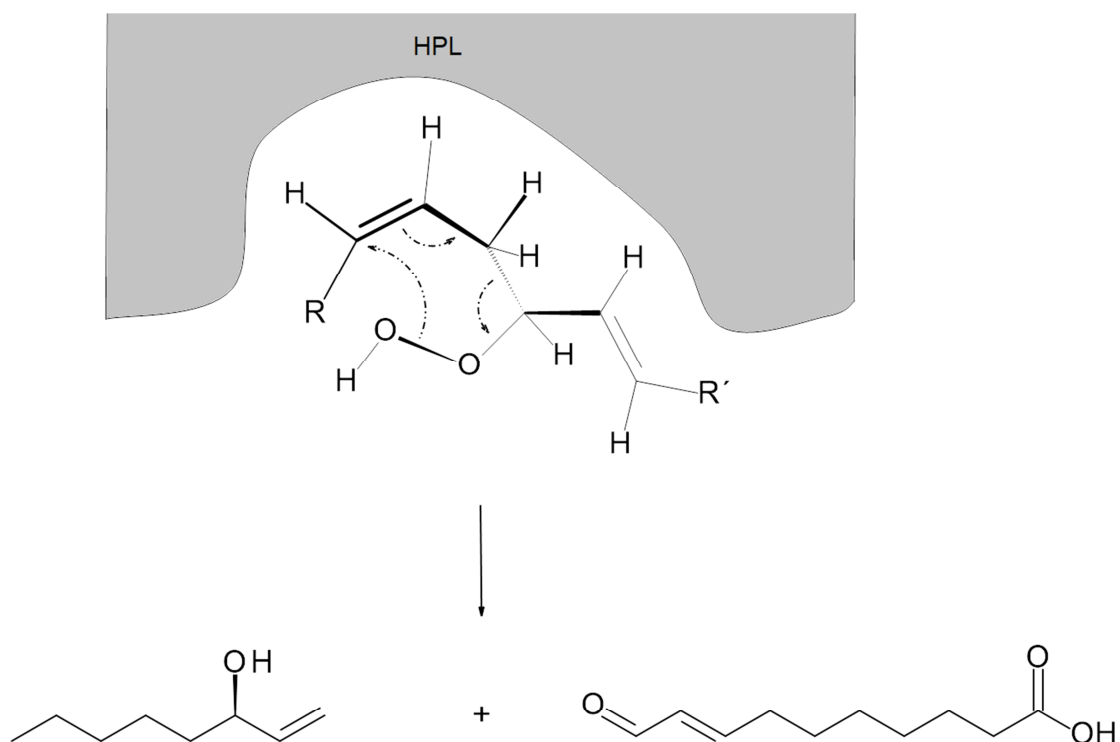


Abb. 4.10: Hypothese von Wurzenberger zur HPL-katalysierten Spaltung von 10-HPOD (Wurzenberger und Grosch 1984b); R = $-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3$, R' = $-(\text{CH}_2)_6\text{-COOH}$

Gegen eine heterolytische Spaltung der Hydroperoxidgruppe sprechen die Ergebnisse von Modellversuchen, in denen 10-HPOD mit hetero- bzw. homolytisch spaltenden Katalysatoren umgesetzt wurde. Weder 10-ODA noch Oct-1-en-3-ol, sondern nur C₉-Verbindungen wurden als Produkte der Lewis-Säure katalysierten heterolytischen Spaltung mit Bortrifluorid detektiert (Wurzenberger und Grosch 1986). Dagegen wurden 10-ODA sowie die C₈-Verbindungen Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol bei Experimenten mit den homolytisch spaltenden Verbindungen *meso*-Tetraphenylporphinato-Eisen(III) und einem Eisen(III)-Bleomycin-Komplex nachgewiesen (Labeque und Marnett 1989, Padbury *et al.* 1988, Natrajan und Hecht

1991). Eine homolytische β -Spaltung kann nicht nur die Produkte erklären, sondern steht auch in Einklang mit den Ergebnissen, dass der Sauerstoff in Oct-1-en-3-ol und in 10-ODA aus der Luft und nicht aus dem Wasser stammt (Wurzenberger 1986).

Weitergehende mechanistische Untersuchungen zur HPL aus Pilzen sind nicht publiziert, deswegen soll im Folgenden ein Vergleich mit den oben beschriebenen Mechanismen der CYP74-Enzyme in Pflanzen und den Erkenntnissen zu Enzymen aus anderen Organismen, die eine ähnliche Bildung von Oct-1-en-3-ol zeigen, gezogen werden. Dabei fallen zunächst die Abweichungen zu den in Pflanzen bekannten Hydroperoxidlyase-Pathways auf. Die HPL-katalysierte Spaltung des 10-HPOD zu 10-ODA und Oct-1-en-3-ol in Pilzen unterscheidet sich offensichtlich in zwei wesentlichen Punkten. Zum einen besitzt das Substrat kein konjugiertes Dien als Strukturmotiv und zum anderen ergibt die Reaktion neben der ω -Oxocarbonsäure keinen weiteren Aldehyd, sondern einen sekundären Alkohol als Endprodukt.

Die fehlende konjugierte Dienstruktur hat zur Folge, dass nach der homolytischen Spaltung der Hydroperoxygruppe keine Umlagerung des Alkoxyradikals zu einem mesomeriestabilisierten Epoxyallyl-Radikal möglich ist, wie es bei der HPL-Katalyse in Pflanzen erfolgt (vgl. Abb. 4.9). Eine Epoxidbildung ist durch Angriff des Radikals auf die Doppelbindung C8-C9 zwar denkbar, würde jedoch zu einem 9,10-Epoxid-Derivat mit einem an C8 lokalisierten Radikal führen. Von dieser Struktur ausgehend ist keine Spaltung in ein C₈-Spaltstück und 10-ODA möglich. Weiterhin sind in der Literatur bislang keine Berichte über Oxylipine mit Epoxy-Struktur in Basidiomyceten vorhanden.

Das Vorkommen von Oct-1-en-3-ol und weiteren C₈-Verbindungen ist auch in verschiedenen Moosen (Bryophyta, Marchantiophyta) und Algen festgestellt worden (Croisier *et al.* 2010, Kihara *et al.* 2014, Chen *et al.* 2015, Sun *et al.* 2012). Dort sind im Gegensatz zu den Basidiomyceten im Wesentlichen C₂₀-Fettsäuren *precursor* für die Bildung der C₈-Verbindungen.

Die Bildung von Oct-1-en-3-ol erfolgt in *Marchantia polymorpha* (Abteilung: Marchantiophyta/Lebermoose) und *P. patens* (Abteilung: Bryophyta/Laubmoose) ausgehend von Arachidonsäure (Kihara *et al.* 2014, Senger *et al.* 2005). In *P. patens* wird die Arachidonsäure durch eine multifunktionale Lipoxygenase zunächst zum 12-Hydroperoxid (12-Hydroperoxy-eicosa-5(Z),8(Z),10(E),14(Z)-tetraensäure) oxy-

geniert und dieses anschließend durch die HPL-Aktivität des Enzyms in *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol, Oct-2-en-1-ol und 12-Oxo-dodeka-5(*Z*),8(*Z*),10(*E*)-triensäure gespalten. Dieselbe LOX ist zudem auch in der Lage, γ -Linolensäure über das entsprechende 10-Hydroperoxid (10-Hydroperoxy-octadeca-6(*Z*),8(*E*),12(*Z*)-triensäure) u. a. zu Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol umzusetzen (Senger *et al.* 2005, Wichard *et al.* 2005).

Auch in der Alge *Pyropia haitanensis* katalysiert eine multifunktionale LOX die Umsetzung von Arachidonsäure über ein 12-Hydroperoxid zu u. a. Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol. Das Enzym besitzt neben der Aktivität als LOX und HPL zudem noch schwache AOS-Aktivität, weist jedoch keine CYP74-Domäne auf und zeigt bei einem breiten Substratspektrum nur geringe Positionsspezifität bezüglich der Oxygenierung (Chen *et al.* 2015).

Unterschiede zur Bildung der C₈-Aromastoffe in Basidiomyceten sind also im Wesentlichen die Nutzung von C₂₀-Fettsäuren, insbesondere von Arachidonsäure, als Ausgangsstoffe und das Auftreten konjugierter 12-Hydroperoxide der Fettsäuren als Intermediate.

Erstaunlicherweise wurde im Cyanobakterium *N. punctiforme* (Stamm: PCC 73102) der identische Biosyntheseweg für Oct-1-en-3-ol wie in Pilzen identifiziert, welcher durch zwei Enzyme katalysiert wird (Brash *et al.* 2014). Die beteiligte Dioxygenase besitzt eine Hämgruppe und setzt mit hoher Substratspezifität C₁₈-Fettsäuren mit Doppelbindung an C9 (Ölsäure > Linolsäure >>> Linolensäure) zu unkonjugierten 10-Hydroperoxiden um. Das Enzym wurde daher als Häm-10(*S*)-Dioxygenase charakterisiert.

Die phylogenetische Untersuchung ergab eine hohe Homologie (89% Übereinstimmung) zu einer annotierten Hämperoxidase aus *Cylindrospermum stagnale* (ebenfalls ein Cyanobakterium) und zeigte Ähnlichkeiten zu charakteristischen Motiven von Cyclooxygenasen. Jedoch ergaben sich nur geringe Übereinstimmungen zu Häm-Dioxygenasen aus Pilzen wie der 7,8-LDS aus *G. graminis* oder PpoC aus *A. fumigatus*. Ebenso wies die Dioxygenase nur geringe Übereinstimmung (11% – 16% Identität) zu vier putativen, bislang nicht charakterisierten Häm-dioxygenase-Cytochrom P450-Fusionsproteinen aus den Genomen von *A. bisporus* und *P. ostreatus* auf (Brash *et al.* 2014).

Weiterhin sind zwei assoziierte Enzyme mit 10(S)-Dioxygenase- bzw. 7,10-Diol-Isomerase-Aktivität und Spezifität für Ölsäure in *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 42A2) beschrieben worden (Martínez *et al.* 2010, Estupiñán *et al.* 2014). Die Oxygenase ist zwar auch in der Lage Linolsäure umzusetzen, weist jedoch keine besonders hohe Übereinstimmung mit der Häm-10(S)-Dioxygenase aus *N. punctiforme* auf.

Als zweites die Biosynthese von Oct-1-en-3-ol katalysierendes Enzym in *N. punctiforme* wurde eine 10-Hydroperoxidlyase identifiziert, heterolog exprimiert und untersucht (Brash *et al.* 2014). Die Aminosäuresequenz weist Übereinstimmungen mit charakteristischen Regionen von Katalasen sowie Threonin direkt vor dem Histidin aus, welches als distale Hämbindungsstelle angenommen wird (Brash *et al.* 2014). Diese Threonin-Histidin-Abfolge ist typisch für alle bislang bekannten Fettsäurehydroperoxid-metabolisierenden Katalase-verwandten Enzyme (Mashhadi *et al.* 2016). Aus diesem Grund, und weil auch die molekulare Masse von etwa 45 kDa dem typischen Molekulargewicht entspricht, wurde diese HPL als Katalase-verwandt eingeordnet. Somit unterscheidet sie sich auch deutlich von den oben besprochenen Enzymen der CYP74-Familie (Brash *et al.* 2014).

Die HPL zeigt strikte Regio- und Enantiospezifität für das Substrat 10(S)-HPOD; positionisomere Hydroperoxide von Linolsäure und Ölsäure sind keine Substrate. Die Umsetzung von 10(S)-HPOD erfolgt mit einer Wechselzahl k_{cat} von $\sim 2.500 \text{ s}^{-1}$ sehr schnell und liefert neben 10-ODA Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol in etwa im Verhältnis 3:1. Das Oct-1-en-3-ol zeigt mit 99% ee [*R*-(-)-Oct-1-en-3-ol] eine sehr hohe Enantiomerenreinheit. Als Nebenprodukt (< 3%) wurde das 10-Ketoderivat von Linolsäure identifiziert. Andere 10-Hydroperoxide wie 10(*R*)-HPOD oder das 10(S)-Hydroperoxid der Ölsäure wurden wesentlich langsamer umgesetzt und lieferten dabei als Hauptprodukt die 10-Ketoderivate (60% – 70%) neben den Spaltprodukten 10-ODA und den C₈-Verbindungen (Brash *et al.* 2014). Die Reduktion von 10-HPOD zum Ketoderivat der Linolsäure wurde auch von (Brodhun *et al.* 2010) für PpoC berichtet.

Mit der Umsetzung der 10(S)-Hydroperoxide ging eine rasche Inaktivierung der Enzyme einher (Brash *et al.* 2014). Inwiefern die Reaktion zu den 10-Ketoderivaten ursächlich für die Inaktivierung ist, ist unklar, aber sie könnte die Ergebnisse durchaus plausibel erklären. Die schnellste Inaktivierung wurde beim 10(S)-Hydroperoxid der Ölsäure beobachtet, am zweitschnellsten erfolgte die

Inaktivierung bei der Umsetzung von 10(S)-HPOD (Brash *et al.* 2014). 10(S)-HPOD stellt im Hinblick auf die Reaktionsgeschwindigkeit das beste Substrat der HPL dar und das 10(S)-Hydroperoxid der Ölsäure wird langsamer umgesetzt, aber dieses liefert dabei mehr Keto-Produkt.

Brash *et al.* (2014) schlagen auch einen hypothetischen Mechanismus für die HPL-katalysierte Spaltung von 10(S)-HPOD vor, welcher auf den Erkenntnissen zu den CYP74-Enzymen und der chemisch katalysierten, homolytischen Spaltung beruht (Abb. 4.11, vgl. 4.4.1 und Abschnitt zur Hypothese von Wurzenberger oberhalb). Zunächst wird die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung der Hydroperoxy-Gruppe homolytisch gespalten und das Hydroxylradikal $\bullet\text{OH}$ auf das hämgebundene Fe(III)-Ion übertragen. Anders als bei den Enzymen der CYP74-Familie erfolgt jedoch keine Umlagerung des Alkoxyradikals zu einem Epoxyradikal, sondern direkt die Spaltung der Bindung C10-C11. Diese ergibt als Produkte 10-ODA sowie ein Oct-2-enylradikal. Die Rückübertragung des Hydroxylradikals erfolgt dann entweder direkt auf das Oct-2-enylradikal, was zu Oct-2-en-1-ol führt, oder nach Umlagerung des Oct-2-enylradikal zum stabileren Oct-1-enylradikal. Der *oxygen rebound* auf das Oct-1-enylradikal erfolgt stereospezifisch und liefert *R*-(-)-Oct-1-en-3-ol, das vorwiegende C₈-Spaltprodukt.

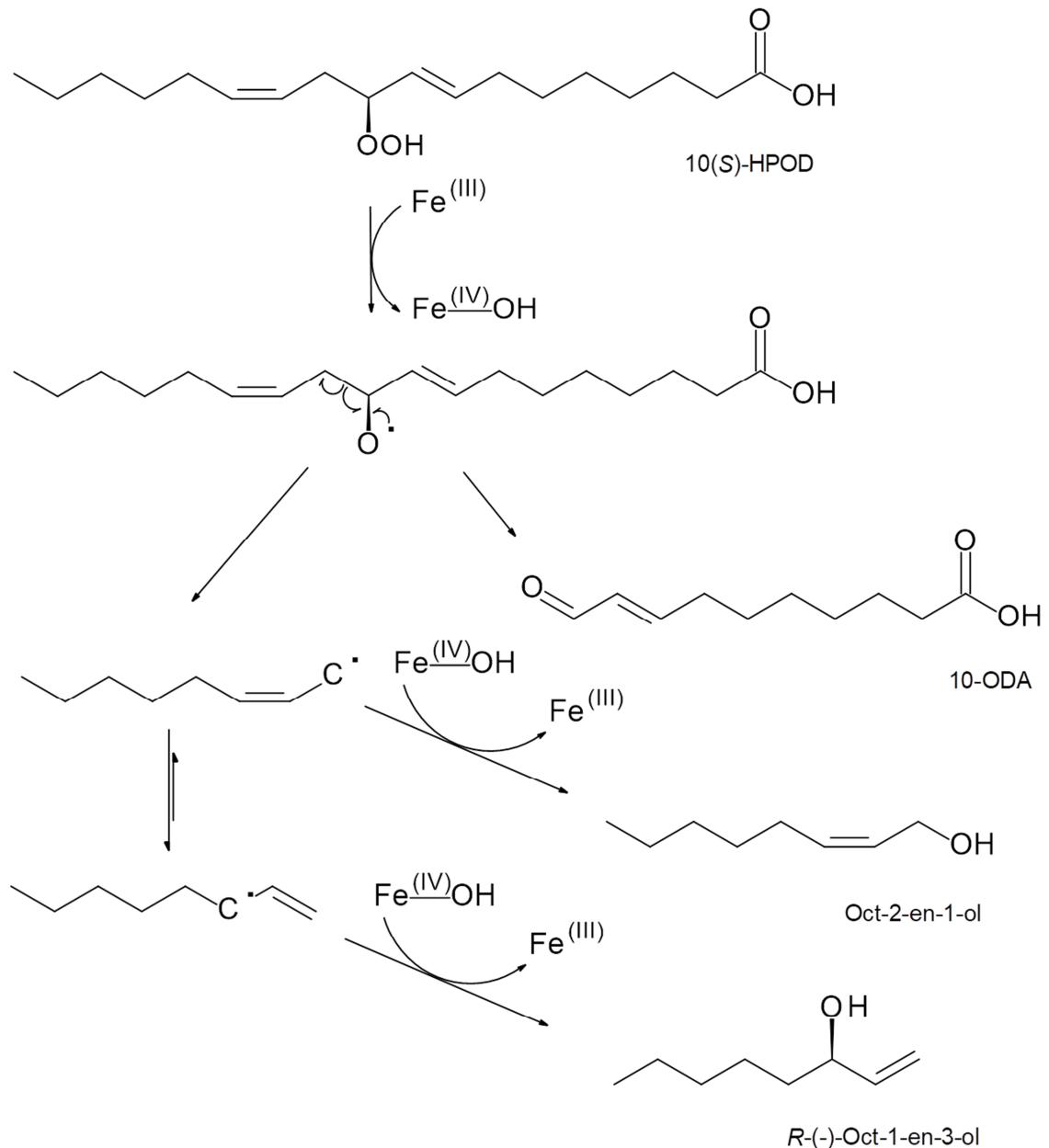


Abb. 4.11: Hypothese von Brash *et al.* (2014) zur Spaltung von 10(S)-HPOD durch die Katalase-verwandte HPL aus *N. punctiforme*

Im Gegensatz zu der von Wurzenberger und Grosch (1984b) vorgeschlagenen Hypothese der direkten Übertragung der Hydroxygruppe auf den Kohlenstoff C13 ohne Beteiligung eines Häms, kann der Mechanismus von Brash *et al.* (2014) die Bildung von Oct-1-en-3-ol und Oct-2-en-1-ol erklären.

Um zu prüfen, ob das Substrat 10(S)-HPOD inhärent die Stereochemie des Produktes induziert, setzten Brash *et al.* (2014) in Modellexperimenten 10(S)-HPOD mit Hämatin oder Eisen(II)-Ionen um. Da dabei als Produkt racemisches Oct-1-en-3-ol entstand, erfolgt bei der enzymatischen Umsetzung sowohl die

Spaltung der C-C-Bindung als auch die Stereokontrolle der Übertragung des Hydroxylradikals auf das C₈-Spaltstück durch die HPL (Brash *et al.* 2014).

In der Literatur gibt es bislang keinen Nachweis, dass Oct-2-en-1-ol in Basidiomyceten auch über 10-HPOD gebildet wird. Zu den starken Indizien für 10-HPOD als *precursor* zählen das Vorkommen in einem festen Verhältnis zu Oct-1-en-3-ol – wie von Brash *et al.* (2014) beschrieben oder auch in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Aromabildung durch Homogenate von *L. edodes* (s. 4.1.4) festgestellt wurde – sowie die gute Übereinstimmung des vorgeschlagenen Mechanismus mit den Erkenntnissen zur chemisch katalysierten Spaltung von 10-HPOD (vgl. 4.4.1, Abb. 4.8). In Einklang dazu stehen auch die Ergebnisse von Wurzenberger und Grosch (1986) zur Umsetzung von 10-Hydroperoxy-octadeca-8(*E*),12(*Z*),15(*Z*)-triensäure (dem zu 10-HPOD analogen 10-Hydroperoxid der Linolensäure) mit einer Proteinfraction aus *A. bisporus*. Als Produkte der enzymatischen Spaltung durch die enthaltene HPL-Aktivität wurden 10-ODA und die C₈-Spaltstücke Octa-1,5-dien-3-ol und Octa-2,5-dien-1-ol im Verhältnis 3:2 erhalten. Das Octadi-1,5-en-3-ol wies wie das Oct-1-en-3-ol aus 10-HPOD einen hohen Überschuss des *R*-Enantiomers auf (Wurzenberger und Grosch 1986).

Die Ergebnisse und die Hypothese von Brash *et al.* (2014) zum Mechanismus der Bildung von Oct-1-en-3-ol in *N. punctiforme* decken sich sehr gut mit den Erkenntnissen zur Biosynthese in Basidiomyceten. Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der HPL in Basidiomyceten auch um ein Häm-haltiges Enzym handelt.

5 **Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ansatz zur biotechnologischen Produktion von Aromaextrakten mit der Geruchsqualität „pilzig“ auf Basis der submersen Kultivierung von *L. edodes* entwickelt und in Bezug auf das verwendete Medium und die Bildung von Oct-1-en-3-ol optimiert. Als nächster Schritt in Richtung einer kommerziellen Nutzung des Systems ist ein Scale-up der Kultivierung vom bislang verwendeten Schüttelkolben-Maßstab über Bioreaktoren im Litermaßstab hin zu großvolumigen Fermentern erforderlich. Der Reaktortyp und die Agitation der Kulturbrühe, der Einfluss der Begasung sowie der Temperatur sind dabei wichtige Parameter mit Auswirkungen auf das Wachstum des Basidiomyceten, die es zu ermitteln und anzupassen gilt. Ebenso müssen auch der Prozess des Zellaufschlusses maßstabsgerecht angepasst und eine geeignete Aufarbeitung zur Gewinnung der Aromastoffe gefunden werden. Nachdem bereits das Medium einfacher und kostengünstiger gestaltet wurde, stellt die Zugabe von Linolsäure einen weiteren erheblichen Kostenfaktor dar. Hydrolysiertes, Linolsäure-reiches Pflanzenöl könnte hierfür eine günstige Alternative sein. Weiterhin sollte auch geprüft werden, welche Verwertungsmöglichkeiten für den Transformationsansatz aus homogenisiertem Myzel, Puffer sowie Linolsäure bzw. Pflanzenöl bestehen.

Das Aromaprofil des submers kultivierten Myzels von *L. edodes* wurde untersucht, indem aus dem aufgeschlossenen Myzel mittels LLE mit nachfolgender SAFE und HS-SPME Aromaextrakte gewonnen wurden und diese anschließend mittels GC-O und GC-MS analysiert wurden. Die bereits erfolgte Identifizierung aromarelevanter Substanzen könnte durch weitere Arbeiten wie die Bestimmung einzelner, bislang nicht identifizierter geruchsaktiver Stoffe, die Ermittlung der Hauptaromakomponenten mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA), die Quantifizierung dieser und der Berechnung der zugehörigen *odour activity values* (OAV) sowie einer Rekonstitution erweitert werden.

Bei der Isolierung und Untersuchung der HPL aus *L. edodes* wurde ein geeigneter Aktivitätsassay und eine Reinigungsstrategie für das Enzym entwickelt sowie u. a. das Molekulargewicht der HPL ermittelt. Die Sequenz konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Daher sollte durch eine Wiederholung der Reinigung in größerem Maßstab mehr Zielprotein isoliert werden, um anschließend mittels *de novo*-Sequenzierung die Sequenz zu bestimmen. Ausgehend von der Sequenz kann in den publizierten

Basidiomyceten-Genomen die zugehörige DNA-Sequenz gefunden und auch in anderen Organismen nach verwandten Genen gesucht werden. Eine heterologe Expression des Enzyms ist für die Gewinnung größerer Mengen des Enzyms zielführend und würde die biochemische Charakterisierung sowie die Untersuchung des Mechanismus der HPL vereinfachen. Ferner könnte ein patentrechtlicher Schutz in Bezug auf eine spätere Nutzung für die biotechnologische Herstellung von Oct-1-en-3-ol interessant sein.

6 Literatur

- Abraham BG, Berger RG** (1994) Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. *J Agric Food Chem* 42 (10):2344-2348
- Acree TE, Barnard J, Cunningham DG** (1984) A Procedure for the Sensory Analysis of Gas Chromatographic Effluents. *Food Chem* 14 (4):273-286
- Aebersold R, Mann M** (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422 (6928):198-207
- Akakabe Y, Matsui K, Kajiwara T** (2005) Stereochemical Correlation between 10-Hydroperoxyoctadecadienoic Acid and 1-Octen-3-ol in *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake* Mushrooms. *Biosci Biotechnol Biochem* 69 (8):1539-1544
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17):3389-3402
- Assaf S, Hadar Y, Dosoretz CG** (1995) Biosynthesis of 13-Hydroperoxylinoleate, 10-Oxo-8-decenoic acid, and 1-Octen-3-ol from Linoleic Acid by a Mycelial-Pellet Homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. *J Agric Food Chem* 43 (8):2173-2178
- Assaf S, Hadar Y, Dosoretz CG** (1997) 1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*. *Enzyme Microb Technol* 21 (7):484-490
- Bastos DHM, Ishimoto EY, Ortiz M, Marques M, Fernando Ferri A, Torres EA** (2006) Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J Food Compos Anal* 19 (6-7):538-543
- Belinky PA, Masaphy S, Levanon D, Hadar Y, Dosoretz CG** (1994) Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 40 (5):629-633
- Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P** (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie: Mit 481 Abbildungen, 923 Formeln und 634 Tabellen, 6., vollst. überarb. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg
- Berger RG** (2009) Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnol Lett* 31 (11):1651-1659
- Blank I** (1996) Gas Chromatography-Olfactometry in Food Aroma Analysis. In: Marsili R (Hrsg.) Techniques for analyzing food aroma. Food science and technology 79, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. S. 293-329
- Block E, Deorazio R** (1994) Chemistry in a salad bowl: Comparative organosulfur chemistry of garlic, onion and shiitake mushrooms. *Pure Appl Chem* 66 (10-11):2205-2206
- Böker A, Fischer M, Berger RG** (2001) Raspberry Ketone from Submerged Cultured Cells of the Basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnol Prog* 17 (3):568-572
- Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H** (2013) Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food Chem* 141 (3):2952-2959

- Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F** (2008) Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylene orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Anal Biochem* 377 (1):1-15
- Brash AR** (1999) Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J Biol Chem* 274 (34):23679-23682
- Brash AR** (2009) Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 70 (13-14):1522-1531
- Brash AR, Niraula NP, Boeglin WE, Mashhadi Z** (2014) An Ancient Relative of Cyclooxygenase in Cyanobacteria Is a Linoleate 10S-Dioxygenase That Works in Tandem with a Catalase-related Protein with Specific 10S-Hydroperoxide Lyase Activity. *J Biol Chem* 289 (19):13101-13111
- Brattoli M, Cisternino E, Dambruoso PR, de Gennaro G, Giungato P, Mazzone A, Palmisani J, Tutino M** (2013) Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds. *Sensors* 13 (12):16759-16800
- Brodhun F, Feussner I** (2011) Oxylipins in fungi. *FEBS J* 278 (7):1047-1063
- Brodhun F, Schneider S, Göbel C, Hornung E, Feussner I** (2010) PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem. *Biochem J* 425 (3):553-565
- Brodowsky ID, Hamberg M, Oliw EH** (1992) A Linoleic Acid (8*R*)-Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase of the Fungus *Gaeumannomyces graminis*. *J Biol Chem* 267 (21):14738-14745
- Brodowsky ID, Oliw EH** (1993) Biosynthesis of 8*R*-hydroperoxylinoleic acid by the fungus *Laetisaria arvalis*. *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* 1168 (1):68-72
- de Carvalho DS, Dionísio AP, dos Santos R, Boguzs S Jr., Godoy HT, Pastore GM** (2011) Production of 1-octen-3-ol by *Neurospora* species isolated from beiju in different culture medium. *Procedia Food Sci* 1:1694-1699
- Champavier Y, Pommier M-T, Arpin N, Voiland A, Pellon G** (2000) 10-Oxo-*trans*-8-decenoic acid (ODA): production, biological activities, and comparison with other hormone-like substances in *Agaricus bisporus*. *Enzyme Microb Technol* 26 (2-4):243-251
- Champe SP, El-Zayat AAE** (1989) Isolation of a Sexual Sporulation Hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 171 (7):3982-3988
- Charpentier BA, Sevenants MR, Sanders RA** (1986) Comparison of the effect of extraction methods on the flavor volatile composition of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) via GC/MS and GC/FTIR. In: Charalambous G (Hrsg.) *The Shelf Life of Foods and Beverages. Proceedings of the 4th International Flavor Conference, Rhodes, Greece, 23-26 July 1985. Developments in Food Science 12*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. S. 413-433
- Chen C-C, Ho C-T** (1986) Identification of Sulfurous Compounds of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *J Agric Food Chem* 34 (5):830-833

- Chen C-C, Liu S-E, Wu C-M, Ho C-T** (1986) Enzymic Formation of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). In: Parliment TH, Croteau R (Hrsg.) Biogeneration of Aromas. ACS Symposium Series 317, American Chemical Society, Washington, DC. S. 176-183
- Chen C-C, Wu C-M** (1984) Studies on the Enzymic Reduction of 1-Octen-3-one in Mushroom (*Agaricus bisporus*). J Agric Food Chem 32 (6):1342-1344
- Chen H-m, Zhu Z-j, Chen J-J, Yang R, Luo Q-j, Xu J-I, Shan H, Yan X-J** (2015) A multifunctional lipoxygenase from *Pyropia haitanensis*— The cloned and functioned complex eukaryotic algae oxylipin pathway enzyme. Algal Res 12:316-327
- Chin H-W, Lindsay RC** (1994) Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. Food Chem 49 (4):387-392
- Cho D-B, Seo H-Y, Kim K-S** (2003) Analysis of the Volatile Flavor Compounds Produced during the Growth Stages of the Shiitake Mushrooms (*Lentinus edodes*). J Food Sci Nutr 8 (4):306-314
- Cho IH, Kim SY, Choi H-K, Kim Y-S** (2006) Characterization of Aroma-Active Compounds in Raw and Cooked Pine-Mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.). J Agric Food Chem 54 (17):6332-6335
- Choi H-S** (2003) Character Impact Odorants of *Citrus* Hallabong [(*C. unshiu* Marcov × *C. sinensis* Osbeck) × *C. reticulata* Blanco] Cold-Pressed Peel Oil. J Agric Food Chem 51 (9):2687-2692
- Combet E, Henderson J, Eastwood DC, Burton KS** (2006) Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. Mycoscience 47 (6):317-326
- Croisier E, Rempt M, Pohnert G** (2010) Survey of volatile oxylipins and their biosynthetic precursors in bryophytes. Phytochemistry 71 (5-6):574-580
- Da Costa NC, Eri S** (2006) Identification of Volatile Compounds in Shiitake Mushrooms Using Modern Extraction Techniques. In: Turner C (Hrsg.) Modern Extraction Techniques: Food and agricultural samples. ACS Symposium Series 926, American Chemical Society, Washington, DC. S. 163-175
- d'Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L** (2008) Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. J Chromatogr A 1186 (1-2):123-143
- Delahunty CM, Eyres G, Dufour J-P** (2006) Gas chromatography-olfactometry. J Sep Sci 29 (14):2107-2125
- Domon B, Aebersold R** (2006) Mass Spectrometry and Protein Analysis. Science 312 (5771):212-217
- El-Sayed AS** (2010) Microbial L-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications. Appl Microbiol Biotechnol 86 (2):445-467
- Engel W, Bahr W, Schieberle P** (1999) Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. Eur Food Res Technol 209 (3):237-241
- Esterbauer H** (1968) Über die Autoxydation von Linolsäure-methylester in Wasser III: Chromatographische Auftrennung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte. Fette Seifen Anstrichm 70 (1):1-4

- Estupiñán M, Diaz P, Manresa A** (2014) Unveiling the genes responsible for the unique *Pseudomonas aeruginosa* oleate-diol synthase activity. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1841 (10):1360-1371
- Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union** (2008) Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG
- FAOStat** (2017) Mushroom and Truffles: Production 2014. Herausgegeben von FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Online verfügbar unter <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, zuletzt geprüft am 30.08.2018
- Fauconnier M-L, Perez AG, Sanz C, Marlier M** (1997) Purification and Characterization of Tomato Leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Hydroperoxide Lyase. *J Agric Food Chem* 45 (11):4232-4236
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The Lipoxygenase Pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53 (1):275-297
- Fischer KH, Grosch W** (1987) Volatile Compounds of Importance in the Aroma of Mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lebensm-Wiss Technol* 20 (5):233-236
- Forss DA** (1973) Odor and flavor compounds from lipids. *Prog Chem Fats Other Lipids* 13 (Supplement C):177-258
- Fraatz MA, Riemer SJ, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H** (2009) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J Mol Catal B: Enzym* 61 (3):202-207
- Fraatz MA, Zorn H** (2010) Fungal Flavours. In: Hofrichter M (Hrsg.) *Industrial Applications. The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. The Mycota X*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 249-268
- Frankel EN** (1983) Volatile lipid oxidation products. *Prog Lipid Res* 22 (1):1-33
- Fukami K, Ishiyama S, Yaguramaki H, Masuzawa T, Nabeta Y, Endo K, Shimoda M** (2002) Identification of Distinctive Volatile Compounds in Fish Sauce. *J Agric Food Chem* 50 (19):5412-5416
- Funk CD** (2001) Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 294 (5548):1871-1875
- Garscha U** (2009) Catalytic and Structural Properties of Heme-containing Fatty Acid Dioxygenases: Similarities of Fungal Dioxygenases and Cyclooxygenases. Dissertation, Uppsala Universitet
- Garscha U, Jernerén F, Chung D, Keller NP, Hamberg M, Oliw EH** (2007) Identification of Dioxygenases Required for *Aspergillus* Development. *J Biol Chem* 282 (48):34707-34718
- Gay CA, Gebicki JM** (2002) Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric-Xylenol Orange Peroxide Assay. *Anal Biochem* 304 (1):42-46

- Gessler NN, Filippovich SY, Bachurina GP, Kharchenko EA, Groza NV, Belozerskaya TA** (2017) Oxylipins and Oxylipin Synthesis Pathways in Fungi. *Appl Biochem Microbiol* 53 (6):628-639
- Grechkin AN, Brühlmann F, Mukhtarova LS, Gogolev YV, Hamberg M** (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1761 (12):1419-1428
- Grechkin AN, Hamberg M** (2004) The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1636 (1):47-58
- Grosshauser S, Schieberle P** (2013) Characterization of the Key Odorants in Pan-Fried White Mushrooms (*Agaricus bisporus* L.) by Means of Molecular Sensory Science: Comparison with the Raw Mushroom Tissue. *J Agric Food Chem* 61 (16):3804-3813
- Grossman S, Zakut R** (1979) Determination of the Activity of Lipoyxygenase (Lipoxidase). In: Glick D (Hrsg.) *Methods of Biochemical Analysis*. 25, Interscience, John Wiley and sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. S. 303-329
- Hamberg M, Su C, Oliw E** (1998) Manganese Lipoyxygenase. *J Biol Chem* 273 (21):13080-13088
- Hamberg M, Zhang L-Y, Brodowsky ID, Oliw EH** (1994) Sequential Oxygenation of Linoleic Acid in the Fungus *Gaeumannomyces graminis*: Stereochemistry of Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase Reactions. *Arch Biochem Biophys* 309 (1):77-80
- Heuger AH, Fraatz MA, Zorn H** (2015) Biotechnological production of C₈ aroma compounds by submerged cultures of shiitake (*Lentinula edodes*). In: Engel K-H, Takeoka G (Hrsg.) *Importance of Chirality to Flavor Compounds*. ACS Symposium Series 1212, American Chemical Society, Washington, DC. S. 85-96
- Hiraide M, Kato A, Nakashima T** (2010) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* V: changes in lenthionine and lenticinic acid contents during the drying process. *J Wood Sci* 56 (6):477-482
- Högnadóttir Á, Rouseff RL** (2003) Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 998 (1-2):201-211
- Howe GA, Schillmiller AL** (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol* 5 (3):230-236
- Huber W, Fröhlke E** (1972) Ein neues Sprühreagens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden. *Chromatographia* 5 (4):256-257
- Hughes C, Ma B, Lajoie GA** (2010) De Novo Sequencing Methods in Proteomics. In: Hubbard SJ, Jones AR (Hrsg.) *Proteome Bioinformatics*. *Methods in Molecular Biology* 604, Humana Press, Totowa, NJ. S. 105-121
- Husson F, Bompas D, Kermasha S, Belin JM** (2001) Biogenesis of 1-octen-3-ol by lipoyxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus*. *Process Biochem* 37 (2):177-182

- Husson F, Krumov KN, Cases E, Cayot P, Bisakowski B, Kermasha S, Belin J-M** (2005) Influence of medium composition and structure on the biosynthesis of the natural flavour 1-octen-3-ol by *Penicillium camemberti*. *Process Biochem* 40 (3-4):1395-1400
- Husson F, Thomas M, Kermasha S, Belin J-M** (2002) Effect of linoleic acid induction on the production of 1-octen-3-ol by the lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Penicillium camemberti*. *J Mol Catal B: Enzym* 19–20:363-369
- Itoh A, Vick BA** (1999) The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1436 (3):531-540
- Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M** (2010) Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys* 503 (2):161-174
- Iwami K, Yasumoto K, Mitsuda H** (1975a) Enzymatic Cleavage of Cysteine Sulfoxide in *Lentinus edodes*. *Agric Biol Chem* 39 (10):1947-1955
- Iwami K, Yasumoto K, Nakamura K, Mitsuda H** (1975b) Properties of γ -Glutamyltransferase from *Lentinus edodes*. *Agric Biol Chem* 39 (10):1933-1940
- Iwami K, Yasumoto K, Nakamura K, Mitsuda H** (1975c) Reactivity of *Lentinus* γ -Glutamyltransferase with Lentinic Acid as the Principal Endogenous Substrate. *Agric Biol Chem* 39 (10):1941-1946
- Jernerén F, Garscha U, Hoffmann I, Hamberg M, Oliw EH** (2010) Reaction mechanism of 5,8-linoleate diol synthase, 10*R*-dioxygenase, and 8,11-hydroperoxide isomerase of *Aspergillus clavatus*. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1801 (4):503-507
- Jirovetz L, Smith D, Buchbauer G** (2002) Aroma Compound Analysis of *Eruca sativa* (*Brassicaceae*) SPME Headspace Leaf Samples Using GC, GC-MS, and Olfactometry. *J Agric Food Chem* 50 (16):4643-4646
- Kaminski E, Stawicki S, Wasowicz E** (1974) Volatile Flavor Compounds Produced by Molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. *Appl Microbiol* 27 (6):1001-1004
- Kamiński E, Libbey LM, Stawicki S, Wasowicz E** (1972) Identification of the Predominant Volatile Compounds Produced by *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol* 24 (5):721-726
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C** (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23 (11):1511-1512
- Karpievitch YV, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR** (2010) Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat* 4 (4):1797-1823
- Kermasha S, Perraud X, Bisakowski B, Husson F** (2002) Production of flavor compounds by hydroperoxide lyase from enzymatic extracts of *Penicillium* sp. *J Mol Catal B: Enzym* 19-20:479-487

- Kihara H, Tanaka M, Yamato KT, Horibata A, Yamada A, Kita S, Ishizaki K, Kajikawa M, Fukuzawa H, Kohchi T, Akakabe Y, Matsui K** (2014) Arachidonic acid-dependent carbon-eight volatile synthesis from wounded liverwort (*Marchantia polymorpha*). *Phytochemistry* 107:42-49
- Kim JG, Yoon HJ, Lee G-M, Eun J-V, Lee Y-J, Kim S-W, Cheon W-J** (2014) The lipoxygenase and hydroperoxide lyase genes involved in the biosynthesis of 1-octen-3-ol of the *Tricholoma matsutake* (maschinelle Übersetzung, Original auf Koreanisch). Korea Patent Application 1020120158565 bzw. 1020140085327
- Kováts E** (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. *Helv Chim Acta* 41 (7):1915-1932
- Kumazawa K, Masuda H** (2003) Investigation of the Change in the Flavor of a Coffee Drink during Heat Processing. *J Agric Food Chem* 51 (9):2674-2678
- Kunkel K** (2013) Biotechnologische Konversion von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffen durch Basidiomyceten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Kuribayashi T, Kaise H, Uno C, Hara T, Hayakawa T, Joh T** (2002) Purification and Characterization of Lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J Agric Food Chem* 50 (5):1247-1253
- Labeque R, Marnett LJ** (1987) 10-Hydroperoxy-8,12-octadecadienoic Acid: A Diagnostic Probe of Alkoxy Radical Generation in Metal-Hydroperoxide Reactions. *J Am Chem Soc* 109 (9):2828-2829
- Labeque R, Marnett LJ** (1988) Reaction of Hematin with Allylic Fatty Acid Hydroperoxides: Identification of Products and Implications for Pathways of Hydroperoxide-Dependent Epoxidation of 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzol[*a*]pyrene. *Biochemistry* 27 (18):7060-7070
- Labeque R, Marnett LJ** (1989) Homolytic and Heterolytic Scission of Organic Hydroperoxides by (*meso*-Tetraphenylporphinato)iron(III) and Its Relation to Olefin Epoxidation. *J Am Chem Soc* 111 (17):6621-6627
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Le Guen S, Prost C, Demaimay M** (2000) Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 896 (1-2):361-371
- Lee D-S, Nioche P, Hamberg M, Raman CS** (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature* 455:363-368
- Lee S-J, Noble AC** (2003) Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 51 (27):8036-8044
- Leonhardt R-H, Plagemann I, Linke D, Zelena K, Berger RG** (2013) Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. – A comparison of substrate specificity and sequence homology. *J Mol Catal B: Enzym* 97:189-195
- Lin S-H, Guidotti G** (2009) Purification of Membrane Proteins. In: Burgess RR, Deutscher MP (Hrsg.) *Guide to Protein Purification*, 2nd Edition. *Methods in Enzymology* 463, Academic Press, San Diego, Burlington, London. S. 619-629

- Linke D** (2009) Detergents: An Overview. In: Burgess RR, Deutscher MP (Hrsg.) Guide to Protein Purification, 2nd Edition. Methods in Enzymology 463, Academic Press, San Diego, Burlington, London. S. 603-617
- Lobanok AG, Babitskaya VG, Plenina LV, Puchkova TA, Osadchaya OV** (2003) Composition and Biological Activity of Submerged Mycelium of the Xylotrophic Basidiomycete *Lentinus edodes*. Appl Biochem Microbiol 39 (1):60-64
- Long Z, Kong X, Zhang C, Jiang B, Hua Y** (2010) Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves. Eur Food Res Technol 231 (6):865-871
- Lorber K, Schieberle P, Buettner A** (2014) Influence of the Chemical Structure on Odor Qualities and Odor Thresholds in Homologous Series of Alka-1,5-dien-3-ones, Alk-1-en-3-ones, Alka-1,5-dien-3-ols, and Alk-1-en-3-ols. J Agric Food Chem 62 (5):1025-1031
- Luning PA, de Rijk T, Wichers HJ, Roozen JP** (1994) Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Sniffing Port Analyses of Volatile Compounds of Fresh Bell Peppers (*Capsicum annuum*) at Different Ripening Stages. J Agric Food Chem 42 (4):977-983
- Maga JA** (1981) Mushroom flavor. J Agric Food Chem 29 (1):1-4
- Martínez E, Hamberg M, Busquets M, Díaz P, Manresa A, Oliw EH** (2010) Biochemical Characterization of the Oxygenation of Unsaturated Fatty Acids by the Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase of *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. J Biol Chem 285 (13):9339-9345
- Mashhadi Z, Newcomer ME, Brash AR** (2016) The Thr–His Connection on the Distal Heme of Catalase-Related Hemoproteins: A Hallmark of Reaction with Fatty Acid Hydroperoxides. ChemBioChem 17 (21):2000-2006
- Matsui K** (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. Belg J Bot 131 (1):50-62
- Matsui K** (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Curr Opin Plant Biol 9 (3):274-280
- Matsui K, Sasahara S, Akakabe Y, Kajiwara T** (2003) Linoleic Acid 10-Hydroperoxide as an Intermediate during Formation of 1-Octen-3-ol from Linoleic Acid in *Lentinus decadetes*. Biosci Biotechnol Biochem 67 (10):2280-2282
- Mau J, Beelman RB, Ziegler GR** (1994) Aroma and flavor components of cultivated mushrooms. In: Charalambous G (Hrsg.) Spices, Herbs and Edible Fungi. Developments in Food Science 34, Elsevier Science B.V., Amsterdam. S. 657-684
- Mau J-L, Beelman RB, Ziegler GR** (1992) Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth of *Agaricus bisporus*. Phytochemistry 31 (12):4059-4064
- Mau J-L, Ma J-T** (2001) Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth of several mushroom mycelia. Fung Sci 16 (3, 4):1-12
- Mayorga H, Knapp H, Winterhalter P, Duque C** (2001) Glycosidically Bound Flavor Compounds of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). J Agric Food Chem 49 (4):1904-1908

- Miyamoto K, Murakami T, Kakumyan P, Keller NP, Matsui K** (2014) Formation of 1-octen-3-ol from *Aspergillus flavus* conidia is accelerated after disruption of cells independently of Ppo oxygenases, and is not a main cause of inhibition of germination. *PeerJ* 2:e395
- Morawicki RO, Beelman RB** (2008) Study of the Biosynthesis of 1-Octen-3-ol Using a Crude Homogenate of *Agaricus bisporus* in a Bioreactor. *J Food Sci* 73 (3):C135-C139
- Morawicki RO, Beelman RB, Peterson D, Demirci A** (2005a) Biosynthesis of 1-Octen-3-ol and 10-Oxo-*trans*-8-decenoic Acid Using a Crude Homogenate of *Agaricus bisporus*: Reaction Scale Up. *J Food Sci* 70 (5):E367-E371
- Morawicki RO, Beelman RB, Peterson D, Ziegler G** (2005b) Biosynthesis of 1-octen-3-ol and 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid using a crude homogenate of *Agaricus bisporus*. Optimization of the reaction: kinetic factors. *Process Biochem* 40 (1):131-137
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA** (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24 (16):1757-1764
- Morita K, Kobayashi S** (1966) Isolation and synthesis of lenthionine, an odorous substance of shiitake, an edible mushroom. *Tetrahedron Lett* 7 (6):573-577
- Mosandl A, Heusinger G, Gessner M** (1986) Analytical and Sensory Differentiation of 1-Octen-3-ol Enantiomers. *J Agric Food Chem* 34 (1):119-122
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I** (2009) Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* 47 (6):511-517
- Nadler A, Koch C, Brodhun F, Wehland J-D, Tittmann K, Feussner I, Diederichsen U** (2011) Influence of Substrate Dideuteration on the Reaction of the Bifunctional Heme Enzyme Psi Factor Producing Oxygenase A (PpoA). *ChemBioChem* 12 (5):728-737
- Natrajan A, Hecht SM** (1991) Production of 2-Octenyl Radicals from the Fe(III) • Bleomycin-Mediated Fragmentation of 10-Hydroperoxy-8,12-octadecadienoic Acid. *J Org Chem* 56 (18):5239-5241
- Oliw EH, Su C** (2002) Formation of Oxygenated Fatty Acids by Fungal Enzymes. In: Gardner HW, Kuo TM (Hrsg.) *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. S. 277-291
- Ong PK, Acree TE** (1999) Similarities in the Aroma Chemistry of Gewürztraminer Variety Wines and Lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) Fruit. *J Agric Food Chem* 47 (2):665-670
- Padbury G, Sligar SG, Labeque R, Marnett LJ** (1988) Ferric Bleomycin Catalyzed Reduction of 10-Hydroperoxy-8,12-octadecadienoic Acid: Evidence for Homolytic O-O Bond Scission. *Biochemistry* 27 (20):7846-7852
- Park S-G, Yoo SI, Ryu DS, Lee H, Ahn YJ, Ryu H, Ko J, Hong CP** (2017) Long-read transcriptome data for improved gene prediction in *Lentinula edodes*. *Data Brief* 15:454-458
- Picardi SM, Issenberg P** (1973) Investigation of Some Volatile Constituents of Mushrooms (*Agaricus bisporus*): Changes which Occur during Heating. *J Agric Food Chem* 21 (6):959-962

- Pingoud A, Urbanke C** (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. De Gruyter, Berlin, New York
- Plagemann I, Zelena K, Arendt P, Ringel PD, Krings U, Berger RG** (2013) LOX_{Psa1}, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *J Mol Catal B: Enzym* 87:99-104
- Poole CF** (2013) Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *J Chromatogr A* 1296:2-14
- Rontani J-F, Aubert C** (2008) Hydrogen and Trimethylsilyl Transfers During EI Mass Spectral Fragmentation of Hydroxycarboxylic and Oxocarboxylic Acid Trimethylsilyl Derivatives. *J Am Soc Mass Spectrom* 19 (1):66-75
- van Ruth SM** (2001) Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomol Eng* 17 (4):121-128
- Ruther J** (2000) Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 890 (2):313-319
- Rychlik M, Schieberle P, Grosch W** (1998) Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Garching
- Sánchez C** (2004) Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (6):756-762
- Schieberle P, Grosch W** (1987) Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z Lebensm Unters Forsch* 185 (2):111-113
- Schindler F, Seipenbusch R** (1990) Fungal flavour by fermentation. *Food Biotechnol* 4 (1):77-85
- Schirmeister T, Schmuck C, Wich PR** (2016) Beyer / Walter Organische Chemie, 25., völlig neu bearb. Aufl., S. Hirzel Verlag, Stuttgart
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ** (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta, Biomembr* 1666 (1-2):105-117
- Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD** (2010) *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* 10 (4):634-649
- Senger T, Wichard T, Kunze S, Göbel C, Lerchl J, Pohnert G, Feussner I** (2005) A Multifunctional Lipoxygenase with Fatty Acid Hydroperoxide Cleaving Activity from the Moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem* 280 (9):7588-7596
- Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Badr P, Mohagheghzadeh A** (2005) Biotransformation of terpenes and related compounds by suspension culture of *Glycyrrhiza glabra* L. (Papilionaceae). *Flavour Fragr J* 20 (2):141-144
- Shibata Y, Matsui K, Kajiwara T, Hatanaka A** (1995) Purification and Properties of Fatty Acid Hydroperoxide Lyase from Green Bell Pepper Fruits. *Plant Cell Physiol* 36 (1):147-156
- Shim D, Park S-G, Kim K, Bae W, Lee GW, Ha B-S, Ro H-S, Kim M, Ryoo R, Rhee S-K, Nou I-S, Koo C-D, Hong CP, Ryu H** (2016) Whole genome *de novo* sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. *J Biotechnol* 223:24-25

- Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M** (2003) Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 64 (3):743-752
- Spaether S** (2000) Zellkultur von Shiitake - Schwefelmetabolismus und Lentinsäurebildung im Speisepilz *Lentinus edodes*. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Stahl PD, Klug MJ** (1996) Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl Environ Microbiol* 62 (11):4136-4146
- Standing KG** (2003) Peptide and protein *de novo* sequencing by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* 13 (5):595-601
- Su C, Brodowsky ID, Oliw EH** (1995) Studies on Linoleic Acid 8*R*-Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase of the Fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Lipids* 30 (1):43-50
- Su C, Oliw EH** (1998) Manganese Lipoxygenase. *J Biol Chem* 273 (21):13072-13079
- Sun S-M, Chung G-H, Shin T-S** (2012) Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*. *J Appl Phycol* 24 (5):1003-1013
- Tasaki Y, Toyama S, Kuribayashi T, Joh T** (2013) Molecular Characterization of a Lipoxygenase from the Basidiomycete Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 77 (1):38-45
- Tian Y, Zhao Y, Huang J, Zeng H, Zheng B** (2016) Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms. *Food Chem* 197 (Part A):714-722
- Toporkova YY, Gorina SS, Bessolitsyna EK, Smirnova EO, Fatykhova VS, Brühlmann F, Ilyina TM, Mukhtarova LS, Grechkin AN** (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1863 (4):369-378
- Toporkova YY, Gorina SS, Mukhitova FK, Hamberg M, Ilyina TM, Mukhtarova LS, Grechkin AN** (2017) Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* 1862 (10, Part A):1099-1109
- Tressl R, Bahri D, Engel KH** (1981) Lipid Oxidation in Fruits and Vegetables. In: Teranishi R, Barrera-Benitez H (Hrsg.) *Quality of Selected Fruits and Vegetables of North America*. ACS Symposium Series 170, American Chemical Society, Washington, DC. S. 213-232
- Tressl R, Bahri D, Engel KH** (1982) Formation of Eight-Carbon and Ten-Carbon Components in Mushrooms (*Agaricus campestris*). *J Agric Food Chem* 30 (1):89-93
- Tsitsigiannis DI, Keller NP** (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* 15 (3):109-118
- Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP** (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 151 (6):1809-1821

- Ullrich F, Grosch W** (1987) Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z Lebensm Unters Forsch* 184 (4):277-282
- Ullrich F, Grosch W** (1988) Flavour Deterioration of Soya-bean Oil: Identification of Intense Odour Compounds Formed during Flavour Reversion. *Eur J Lipid Sci Tech* 90 (9):332-336
- Valim MF, Rouseff RL, Lin J** (2003) Gas Chromatographic-Olfactometric Characterization of Aroma Compounds in Two Types of Cashew Apple Nectar. *J Agric Food Chem* 51 (4):1010-1015
- Vardar-Ünlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M, Dönmez E, Tepe B** (2003) Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J Agric Food Chem* 51 (1):63-67
- Venkateswarlu G, Chandravada MV, Tewari RP** (1999) Volatile flavour components of some edible mushrooms (Basidiomycetes). *Flavour Fragr J* 14 (3):191-194
- Vick BA** (1991) A Spectrophotometric Assay for Hydroperoxide Lyase. *Lipids* 26 (4):315-320
- Wada S, Nakatani H, Morita K** (1967) A New Aroma-Bearing Substance from Shiitake, an Edible Mushroom. *J Food Sci* 32 (5):559-561
- Wadman MW, van Zadelhoff G, Hamberg M, Visser T, Veldink GA, Vliegthart JFG** (2005) Conversion of Linoleic Acid into Novel Oxylipins by the Mushroom *Agaricus bisporus*. *Lipids* 40 (11):1163-1170
- Wadman MW, de Vries RP, Kalkhove SIC, Veldink GA, Vliegthart JFG** (2009) Characterization of oxylipins and dioxygenase genes in the asexual fungus *Aspergillus niger*. *BMC Microbiol* 9:59
- Wasternack C, Feussner I** (2018) The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu Rev Plant Biol* 69 (1):363-386
- Wennman A, Oliw EH** (2013) Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii*. *J Lipid Res* 54 (3):762-775
- Wichard T, Göbel C, Feussner I, Pohnert G** (2005) Unprecedented Lipoxygenase/Hydroperoxide Lyase Pathways in the Moss *Physcomitrella patens*. *Angew Chem Int Ed* 44 (1):158-161
- Wu C-M, Wang Z** (2000) Volatile Compounds in Fresh and Processed Shiitake Mushrooms (*Lentinus edodes* Sing.). *Food Sci Technol Res* 6 (3):166-170
- Wurzenberger M** (1986) Untersuchungen zur enzymatischen Bildung der Aromastoffe 1-Octen-3-ol, (Z)-1,5-Octadien-3-ol und (Z,Z)-2,5-Octadien-1-ol, in Champignons (*Psalliota bispora*). Dissertation, Technische Universität München
- Wurzenberger M, Grosch W** (1982) The Enzymic Oxidative Breakdown of Linoleic Acid in Mushrooms (*Psalliota bispora*). *Z Lebensm Unters Forsch* 175 (3):186-190
- Wurzenberger M, Grosch W** (1984a) Origin of the oxygen in the products of the enzymatic cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* 794 (1):18-24

Wurzenberger M, Grosch W (1984b) Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* 795 (1):163-165

Wurzenberger M, Grosch W (1984c) The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim Biophys Acta, Lipids Lipid Metab* 794 (1):25-30

Wurzenberger M, Grosch W (1986) Enzymic Oxidation of Linolenic Acid to 1,Z-5-Octadien-3-ol, Z-2,Z-5-Octadien-1-ol and 10-Oxo-E-8-decenoic Acid by a Protein Fraction from Mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lipids* 21 (4):261-266

Yasumoto K, Iwami K, Mitsuda H (1971) Enzyme-catalyzed Evolution of Lenthionine from Lentic Acid. *Agric Biol Chem* 35 (13):2070-2080

Yasumoto K, Iwami K, Mitsuda H (1976) Enzymic formation of Shii-ta-ke aroma from non-volatile precursor(s) - lenthionine from lentic acid. *Mushroom Sci* 9, Pt. 1:371-383

Zawirska-Wojtasiak R (2004) Optical purity of (R)-(-)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms. *Food Chem* 86 (1):113-118

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J Comput Biol* 7 (1-2):203-214

Zorn H, Fischer-Zorn M, Berger RG (2003) A Labeling Study To Elucidate the Biosynthesis of 4-(4-Hydroxyphenyl)-Butan-2-one (Raspberry Ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*. *Appl Environ Microbiol* 69 (1):367-372

7 Anhang

7.1 NMR-Spektren von 10-HPOD

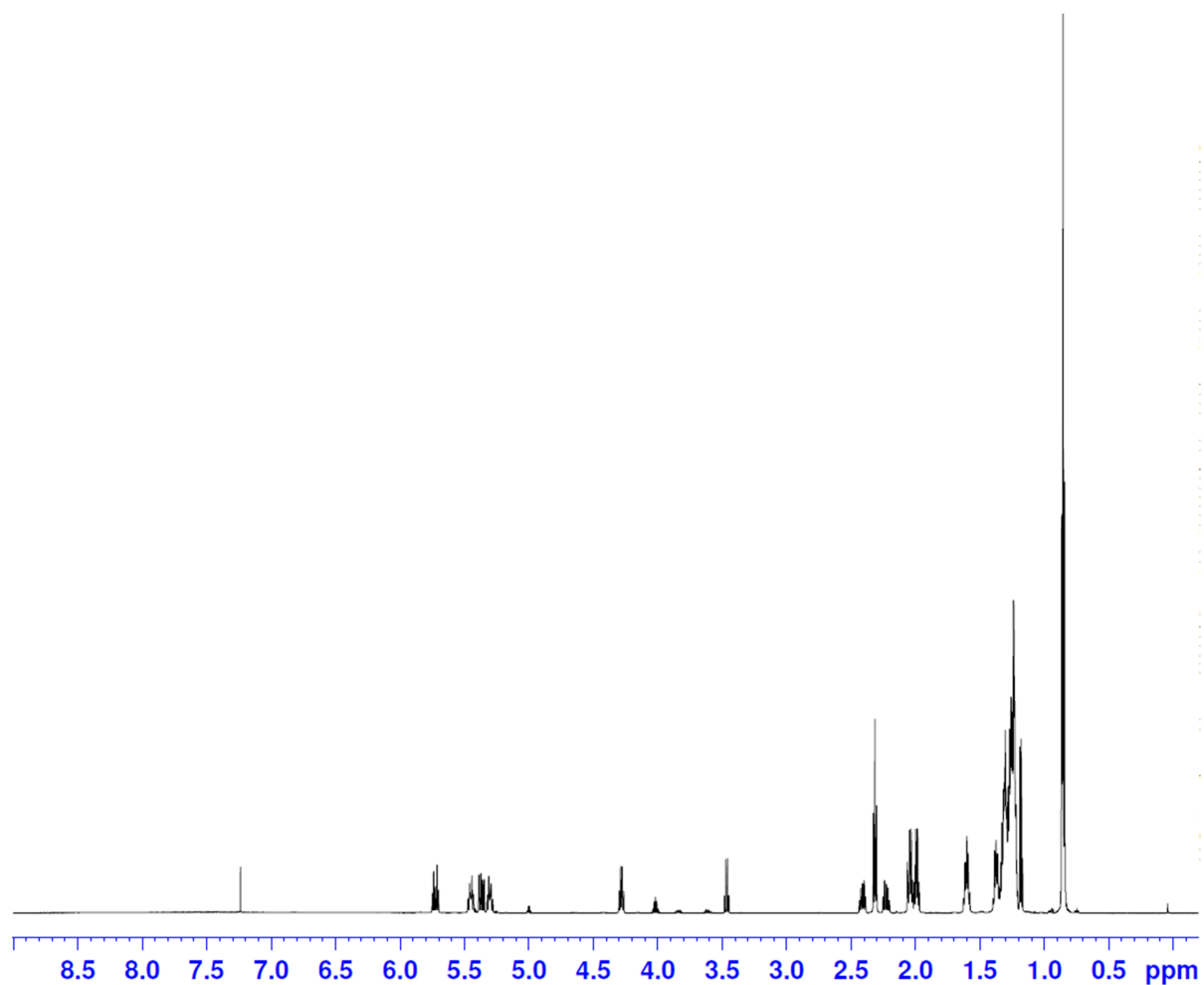


Abb. 7.1: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von 10-HPOD (in CDCl_3)

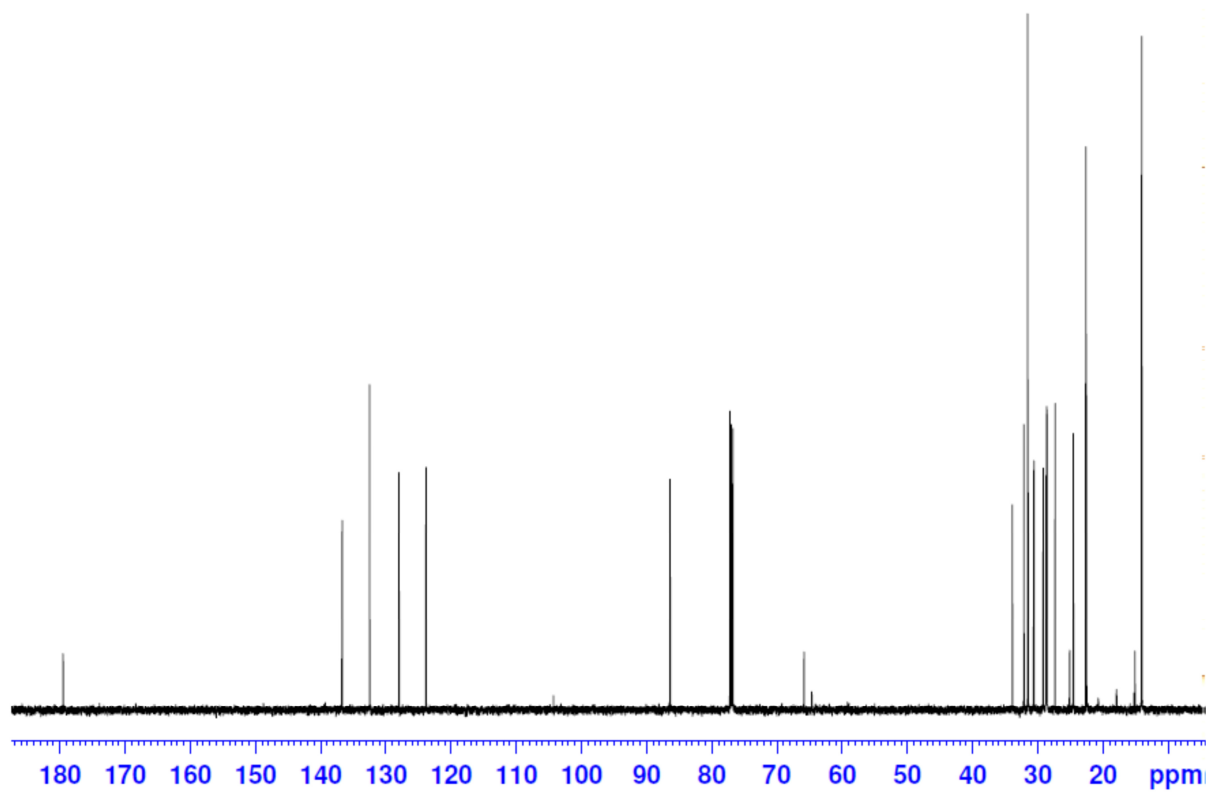


Abb. 7.2: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von 10-HPOD (in CDCl_3)