

Biotechnologische Darstellung und analytische Charakterisierung aromaaktiver Fettaldehyde

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lebensmittelchemiker

Andreas Klaus Hammer

2021

Dekan

Professor Dr. Jürgen Janek

Gutachter

Erstgutachter:

Professor Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Apl. Professor Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Erklärung zum eigenständigen Arbeiten

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.

Bad Nauheim, den

.....

Andreas Klaus Hammer

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des Themas und seine wissenschaftliche Unterstützung bedanken. In dringenden Fällen war er immer greifbar, wofür ich sehr dankbar bin. Ebenso danke ich Apl. Professor Dr. Peter Friedhoff für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Professor Dr. Till Schäberle und Professor Dr. Bernhard Spengler für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Dr. Marco A. Fraatz gebührt großer Dank für seine fachliche Unterstützung in gaschromatographischen und sensorischen, aber auch allgemeinen wissenschaftlichen Fragestellungen. Ein großes Dankeschön für die unentwegte Hilfsbereitschaft.

Dr. Daniel Bakonyi, Dr. Martin Gand und Dr. Miriam Sowa danke ich für ihre bereitwillige Hilfe und Auskunft bei molekularbiologischen und anderen biochemischen Fragen.

Den SusAld-Projektpartnern von der Symrise AG (Dr. Thorsten Geißler, Egon Gross, Christoph Harms, Dr. Jacob Ley) und der Universität Greifswald (Dr. Kathleen Balke, Prof. Dr. Uwe Bornscheuer) möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Für die Finanzierung des Projektes danke ich der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR) und dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit. Weiter danke ich Dr. Markus Buchhaupt, Dr. Henrik Schewe und Professor Dr. Jens Schrader vom DECHEMA-Forschungsinstitut für die gute Kooperation.

Daneben gilt allen Studentinnen und Studenten mein Dank, die während ihrer Praktika und Abschlussarbeiten zur Generierung von Daten beigetragen haben. In besonderer Weise sind an dieser Stelle Florian Albrecht und Nils Oliver Emrich hervorzuheben.

Darüber hinaus danke ich allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen – insbesondere Florian Birk, Friederike Bürger, Julia Büttner, Friederike Hahne, Carolin Mewe, Svenja Sommer, Dr. habil. Astrid Spielmeier und Dr. Tobias Trapp für die Teilnahme an sensorischen Bewertungen und die rege wissenschaftliche Diskussion. Außerdem möchte ich Bianka Daubertshäuser und Peter Seum für ihre kleinen, aber unentwegten Hilfestellungen und ihre Zuverlässigkeit danken.

Ebenso danke ich den fleißigen Korrekturleserinnen und Korrekturlesern Julia Büttner, Alexander Mayer, Svenja Sommer, Miriam Sowa und Oliver Wittek.

Frau Professor Dr. Monika Pischetsrieder und Professor Dr. Andrea Büttner danke ich für meine Ausbildung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und dass sie bereits während meines Studiums und der Abschlussarbeit den Wissensdurst und Forscherdrang in mir geweckt haben. Meinem ehemaligem Kommilitonen Oliver Wittek danke ich für die auch über das Studium hinausreichende Freundschaft und wissenschaftliche Diskussion.

Zu guter Letzt gilt auch meiner Familie ein außerordentlicher Dank. Meinen Eltern und meine Schwester, auch meine Großeltern und vor allem Alexander haben stets an mich geglaubt, mich unterstützt, in deprimierenden Momenten aufgefangen und nicht mit aufbauenden Worten gespart, wenn es einmal nicht nach Plan lief.

Für meine Familie

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Hammer A. K., Albrecht F., Hahne F., Jordan P., Fraatz M. A., Ley J., Geissler T., Schrader J., Zorn H., Buchhaupt M.: Biotechnological Production of Odor-Active Methyl-Branched Aldehydes by Means of a Novel α -Dioxygenase from *Crocospaera subtropica*. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, 68 (38), 10432–10440.

Hammer A. K., Emrich N. O., Ott J., Birk F., Fraatz M. A., Ley J. P., Geissler T., Bornscheuer U. T., Zorn H.: Biotechnological Production and Sensory Evaluation of ω 1-Unsaturated Aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69 (1), 345–353.

Tagungsbeiträge

Vortrag

Hammer A. K., Albrecht F., Emrich N. O., Fraatz M. A., Geissler T., Ley J., Bornscheuer U. T., Buchhaupt M., Schrader J., Zorn H.: Biotechnological Production of Natural Flavours from Fungal Lipids. *17th Euro Fed Lipid Congress and Expo 2019*, Sevilla (Spanien).

Poster Flash-Vortrag

Hammer A. K., Fraatz M. A., Geissler T., Ley J., Bornscheuer U. T., Zorn H.: Enzymatic generation of odor active aldehydes. *12th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology 2019*, Eisenach

Poster

Hammer A. K., Fraatz M. A., Geissler T., Ley J., Bornscheuer U. T., Zorn H.: Enzymatic generation of odor active aldehydes. *12th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology 2019*, Eisenach

Zusammenfassung

Eine große Bandbreite an Geruchsqualitäten und vergleichsweise niedrige Geruchsschwellen machen Aldehyde für die Aromaindustrie zu einer interessanten Substanzklasse. Trotz diverser Lösungsansätze fehlt allerdings nach wie vor eine nachhaltige Produktionsmethode mit hoher Ausbeute. Aus diesem Grund wurde ein biotechnologischer Ansatz verfolgt, der unter Einsatz rekombinant exprimierter Enzyme die Gewinnung von Aldehyden aus fungalen Lipiden erlaubt. Letztere stellen dabei eine nachhaltige Quelle für selten vorkommende Fettsäuren dar.

Dazu wurden zunächst ca. 40 verschiedene Pilz-Spezies als potentielle Produktionsorganismen vielversprechender Fettsäuren untersucht. Die Pilze wurden in Schüttelkolben kultiviert und die neutralen Lipide mittels Soxtherm[®]-Apparatur aus den Myzelien extrahiert. Auf diese Weise wurden Lipidausbeuten zwischen 30 mg (*L. edodes*) und 1,9 g (*C. heterosporus*) pro Liter Nährmedium ermittelt. Die Fettsäureprofilanalysen mittels GC-MS zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur, dass es sich bei den Hauptbestandteilen primär um Linol-, Öl- und Palmitinsäure handelte. Ausnahmen bildeten *C. heterosporus* und zwei *Mortierella*-Stämme, die größere Mengen an Arachidonsäure produzierten. Bemerkenswerterweise enthielt das Myzel der *Conidiobolus*-Spezies zudem hohe Anteile mehrerer *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Fettsäuren. Daneben wurden aber auch weitere ungewöhnliche Komponenten detektiert, so etwa die endständig desaturierte Dodec-11-ensäure (12:1(11)) in *F. velutipes* oder die ω 8-ungesättigte (9Z)-Heptadec-9-ensäure (17:1(9Z)) in *M. hyalina*.

Durch Variation der Kulturparameter wurde deren Einfluss auf die Bildung der beiden zuletzt genannten Substanzen untersucht und damit die Kulturführung der beiden Pilze diesbezüglich optimiert. Durch den Zusatz von L-Isoleucin wurde die Ausbeute von 17:1(9Z) auf ca. 70 mg pro Liter Nährmedium gesteigert. Für 12:1(11) wurden bis zu 20 mg pro Liter Nährmedium erreicht. Über Supplementationsstudien war es darüber hinaus möglich, die terminale Desaturierung ¹³C-markierter Laurinsäure durch *F. velutipes* nachzuweisen. Damit wurde ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Biosynthese der in der Natur selten vorkommenden ω 1-ungesättigten Fettsäuren geleistet.

Die Triglyceride der fungalen Lipidextrakte wurden schließlich mit Hilfe einer Lipase aus *C. rugosa* hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden wahlweise mit heterolog in *E. coli* exprimierter und affinitätschromatographisch gereinigter α -Dioxygenase oder Carbonsäure-

Zusammenfassung

Reduktase zu Aldehyden umgesetzt. Die Biotransformationsprodukte wurden mittels HS-SPME-GC-MS-O analysiert und sensorisch evaluiert. Während die Reaktionsprodukte der 17:1(9Z) olfaktorisch kaum wahrgenommen werden konnten, wiesen die Produkte der 12:1(11) deutlich wahrnehmbar sensorisch ansprechende Qualitäten auf.

Aufgrund dessen wurde eine homologe Reihe (C₇–C₁₃) dieser ω 1-ungesättigten Aldehyde chemisch synthetisiert und instrumentell-analytisch (GC-MS, NMR, z.T. HRMS) sowie sensorisch charakterisiert. Dabei wurden Geruchsschwellen von 0,039 bis 29 ng/L in Luft bzw. 0,24 bis 22 μ g/L in wässriger Lösung bestimmt, wobei Non-8-enal die potenteste Substanz darstellte. Alle Aldehyde wiesen einen grünen Geruch auf. Grasige Noten mit Nuancen nach Gurke bzw. Melone waren charakteristisch für die C₇- und C₈-Aldehyde, während mit Non-8-enal ein medizinischer Geruchseindruck nach Pappe assoziiert wurde. Mit steigender Kettenlänge zeichneten sich die Aldehyde wiederum durch einen seifigen Geruch nach Koriander-Blättern aus, der zum Teil krautige und wächserne Züge annahm. Analog wurde mit einer homologen Reihe *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Fettaldehyde (C₁₂–C₁₅) verfahren, die biotechnologisch hergestellt wurden. Die Geruchsschwellen dieser Aldehyde betragen in Luft 0,18 bis 70 ng/L. Die niedrigsten Schwellen zeigten die beiden C₁₄-Isomere. Neben grün-seifigen Noten besaßen die methylverzweigten Vertreter süßliche, zum Teil auch citrusartige Nuancen, die teils ins Metallische, Pfeffrige oder auch Würzig-Talgige übergingen.

Zur Darstellung dieser methylverzweigten Fettaldehyde wurde eine rekombinant in *E. coli* exprimierte α -Dioxygenase aus dem Cyanobakterium *C. subtropica* eingesetzt, welche unter anderem hinsichtlich der Umsetzung *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Fettsäuren charakterisiert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die endständige Methylverzweigung keinen Einfluss auf die katalytische Effizienz und damit auf die Substratpräferenz hatte. Mittels Thermo-fluor-Assay, gaschromatographischer Methoden und Messung des Sauerstoff-Verbrauchs über eine optische Sonde wurden Salz-, pH- und Temperaturoptimum sowie das Substratspektrum und enzymkinetische Parameter bestimmt. Das Enzym zeichnete sich durch die für α -Dioxygenasen atypische Umsetzung verhältnismäßig kurzkettiger Substrate (< C₁₄) und eine gewisse Halophilie aus. Mit diesem Enzym wurde erstmals eine α -Dioxygenase nicht-pflanzlichen Ursprungs beschrieben.

Abstract

Different odor qualities and relatively low odor thresholds make aldehydes a favorable compound class for the flavor and fragrance industry. Despite various approaches, an established method for the sustainable and effective production of aldehydes is still lacking. Therefore, a biotechnological approach, allowing the production of aldehydes by converting fungal lipids with the help of recombinantly expressed enzymes, was developed. Fungi represent a sustainable resource of rare fatty acids.

Almost 40 different fungi were screened for the production of promising, unusual fatty acids. Submerged cultivation was performed in shake flasks and neutral lipids of the mycelia were extracted by means of a Soxtherm® apparatus, resulting in lipid yields between 30 mg (*L. edodes*) and 1.9 g (*C. heterosporus*) per liter culture broth. In accordance with the literature, fatty acid profiling by means of GC-MS revealed linolic, oleic, and palmitic acid as main components. However, two strains of the genus *Mortierella* and *C. heterosporus* were shown to produce notable proportions of arachidonic acid. The latter contained higher amounts of some *iso*- and *anteiso*-methyl-branched fatty acids as well. Apart from that, other unusual compounds, such as the terminally desaturated dodec-11-enoic acid (12:1(11)) in *F. velutipes* or the ω 8-unsaturated (9Z)-heptadec-9-enoic acid (17:1(9Z)) in *M. hyalina*, were detected.

By varying culture parameters, their influence on the production of those two substances was evaluated and hence cultivation optimized. Addition of L-isoleucine to the medium further increased the quantities of 17:1(9Z). Thus, yields of approximately 70 mg 17:1(9Z) and 10 to 20 mg 12:1(11) per liter main culture were achieved. Furthermore, supplementation studies revealed the terminal desaturation of ¹³C-labelled lauric acid by *F. velutipes*. This is an important contribution to the elucidation of the biogenesis of rarely occurring ω 1-unsaturated fatty acids.

A lipase of *C. rugosa* was applied for hydrolysis of fungal triglycerides. Liberated fatty acids were converted into aldehydes by using either α -dioxxygenase or carboxylic acid reductase, which were heterologously expressed in *E. coli* and purified by means of affinity chromatography. Biotransformation products were analyzed and their sensory characteristics assessed by HS-SPME-GC-MS-O. Reaction products of 17:1(9Z) were hardly perceivable at the olfactory detection port, whereas 12:1(11) led to aldehydes clearly exhibiting pleasant fragrances.

Abstract

For this reason, a homologous series of terminally unsaturated aldehydes (C₇–C₁₃) was prepared via chemical synthesis and characterized by instrumental (GC-MS, NMR, HRMS) as well as sensory techniques. Odor thresholds ranging from 0.039 to 29 ng/L in air and 0.24 to 22 µg/L in aqueous solution were determined, with non-8-enal being the most potent representative. All aldehydes exhibited green odors. Grassy scents with nuances of cucumber and melon were found to be characteristic for C₇- and C₈-aldehydes, while non-8-enal was associated with a medicinal, cardboard-like note. With increasing chain length, a soapy odor of coriander leaves with partially herbaceous and waxy nuances was perceivable. A series of biotechnologically generated *iso*- and *anteiso*-fatty aldehydes (C₁₂–C₁₅) was studied in the same manner. Odor thresholds between 0.18 and 70 ng/L were determined in air. The two C₁₄ isomers showed the lowest thresholds. Apart from green-soapy and sweetish attributes with partly senses of citrus, methyl-branched aldehydes were distinguishable from others by metallic, peppery and to some extent savory-tallowy reminiscences.

A cyanobacterial α -dioxygenase from *C. subtropica* was recombinantly expressed in *E. coli* and applied for the preparation of methyl-branched aldehydes. The enzyme was particularly in respect of its acceptance towards *iso*- and *anteiso*-fatty acid substrates investigated. As a comparison of straight and branched-chain acids demonstrated, there was no effect of terminal methyl-branches on the catalytic efficiency and therefore substrate preference. By means of thermofluor assay, gas chromatographic methods, and an oxygen depletion assay (optical sensor), salt, pH, and temperature optima as well as the substrate spectrum and enzyme kinetic parameters were determined. Atypical high activity towards comparatively short-chained substrates (< C₁₄) and a certain saline preference were observed. With this enzyme, the first α -dioxygenase of non-plant, but bacterial origin, was described.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zum eigenständigen Arbeiten	I
Danksagung	II
Publikationen und Tagungsbeiträge.....	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract	VIII
Inhaltsverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Aldehyde als Aromastoffe	1
1.2 Biotechnologische Produktion von Aldehyden	4
1.3 α -Dioxygenasen.....	6
1.3.1 Vorkommen und native Funktion.....	6
1.3.2 Struktureller Aufbau und katalytischer Mechanismus.....	7
1.3.3 Biotechnologische Anwendung	8
1.4 Carbonsäure-Reduktasen	9
1.4.1 Vorkommen und native Funktion.....	9
1.4.2 Struktureller Aufbau und katalytischer Mechanismus.....	10
1.4.3 Biotechnologische Anwendung	11
1.5 Zielsetzung.....	12
2 Experimenteller Teil.....	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Biochemische und molekularbiologische Materialien	20
2.1.2.1 Plasmide und <i>Primer</i>	20
2.1.2.2 Weitere biochemische Materialien.....	23
2.1.3 Verbrauchsmaterial	24
2.1.4 Mikroorganismen	25
2.1.4.1 Bakterien	25
2.1.4.2 Pilze.....	25
2.1.5 Geräte und Zubehör	27
2.1.5.1 Gaschromatographie.....	27
2.1.5.2 Sonstige Geräte	28

Inhaltsverzeichnis

2.2	Software und Datenbanken	31
2.3	Kulturführung von Pilzen: Screening mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren.....	32
2.3.1	Zusammensetzung der Nährmedien	32
2.3.2	Stammhaltung	32
2.3.3	Kulturführung auf Agar-Platten (emers)	33
2.3.4	Vorkulturführung (submers).....	33
2.3.5	Hauptkulturführung (submers)	33
2.3.6	Kulturente und Bestimmung der Biotrockenmasse.....	34
2.4	Einfluss bestimmter Parameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren	35
2.4.1	Test diverser komplexer Standard-Nährmedien	35
2.4.2	Kultivierungstemperatur	36
2.4.3	Kultivierungsdauer.....	36
2.4.4	Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (<i>Flammulina velutipes</i>)	36
2.4.4.1	Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis	36
2.4.4.2	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.....	37
2.4.5	Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren (<i>Mortierella hyalina</i>).....	37
2.5	Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch <i>Flammulina velutipes</i>	38
2.6	Lipid- und Fettsäureanalytik.....	39
2.6.1	Lipidextraktion.....	39
2.6.2	Synthese von Fettsäuremethylestern	40
2.6.2.1	Umesterung der Fettsäuren aus den fungalen Lipidextrakten mittels alkali-katalysierter Transmethylierung	40
2.6.2.2	Um- und Veresterung der Fettsäuren aus den fungalen Lipid- extrakten mittels Bortrifluorid-katalysierter Transmethylierung	40
2.6.2.3	Veresterung von Fettsäuren als Referenzsubstanzen.....	40
2.6.3	Gaschromatographische Fettsäureprofilanalyse	41
2.6.4	Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung	42
2.7	Transformation, Enzymexpression und -reinigung	43
2.7.1	Stammhaltung	43
2.7.2	Transformationen und genetische Modifikationen	43
2.7.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	45
2.7.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit der α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i> kodierenden Gensequenz	45

Inhaltsverzeichnis

2.7.2.3	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Colony-PCR</i>)	46
2.7.2.4	Modifikation der Gensequenz mittels <i>QuikChange</i> TM	46
2.7.3	Rekombinante Expression der α -Dioxygenasen aus <i>Crocospaera subtropica</i> und <i>Oryza sativa</i>	47
2.7.4	Rekombinante Expression der Carbonsäure-Reduktase aus <i>Mycobacterium marinum</i>	48
2.7.5	Reinigung der Enzyme	49
2.7.6	Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ...	50
2.7.7	<i>Western Blot</i>	51
2.7.8	Funktionstests der gereinigten Enzyme	52
2.8	Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase	53
2.8.1	Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden	53
2.8.2	Biotransformation fungaler Lipide	54
2.9	Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	57
2.9.1	Einfluss des C-terminalen His-Tags auf die α -Dioxygenase-Aktivität.....	57
2.9.2	Thermofluor-Assay zur Bestimmung der Enzymstabilität (Screening)	57
2.9.3	Bestimmung von Salz-, pH- und Temperaturoptimum	57
2.9.4	Bestimmung enzymkinetischer Parameter	59
2.9.5	Substratspektrum	60
2.10	Darstellung und Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie <i>iso</i> - und <i>anteiso</i> -methylverzweigter Aldehyde	61
2.10.1	Darstellung und Isolierung der Aldehyde	61
2.10.1.1	Reduktion von Carbonsäuren mit LiAlH_4	61
2.10.1.2	Selektive Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden (Dess-Martin-Oxidation).....	62
2.10.1.3	Biotechnologische Darstellung methylverzweigter Aldehyde mittels α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	62
2.10.1.4	Isolierung der chemischen Synthese- und Biotransformationsprodukte.....	63
2.10.2	Gaschromatographische Charakterisierung und Strukturanalyse der isolierten Substanzen	64
2.10.3	Sensorische Charakterisierung der ω 1-ungesättigten Aldehyde	65
2.10.3.1	Bestimmung der sensorischen Reinheit mittels GC-FID-O.....	65
2.10.3.2	Bestimmung der Geruchsqualitäten	66
2.10.3.3	Bestimmung der Geruchsschwellen in Luft.....	67
2.10.3.4	Bestimmung der Geruchsschwellen in Wasser	68
2.10.4	Sensorische Charakterisierung der methylverzweigten Aldehyde	69

Inhaltsverzeichnis

2.11	Entsorgung von S1-Abfällen und Chemikalien	70
2.11.1	Sterilisierung und Entsorgung von S1-Abfällen	70
2.11.2	Entsorgung von Chemikalien	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Screening verschiedener Pilz-Spezies mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren.....	71
3.1.1	Wachstum der einzelnen Spezies und Lipidgehalte der gebildeten Myzelien	71
3.1.2	Fettsäureprofile	73
3.2	Einfluss der Kulturparameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren.....	107
3.2.1	Test diverser komplexer Standard-Nährmedien	107
3.2.1.1	<i>Flammulina velutipes</i>	107
3.2.1.2	<i>Mortierella hyalina</i>	108
3.2.2	Kultivierungstemperatur	109
3.2.2.1	<i>Flammulina velutipes</i>	109
3.2.2.2	<i>Mortierella hyalina</i>	110
3.2.3	Kultivierungsdauer.....	111
3.2.3.1	<i>Flammulina velutipes</i>	111
3.2.3.2	<i>Mortierella hyalina</i>	112
3.2.4	Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (<i>Flammulina velutipes</i>)	113
3.2.4.1	Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis	113
3.2.4.2	Kohlenstoffquelle	114
3.2.4.3	Stickstoffquelle	115
3.2.5	Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren (<i>Mortierella hyalina</i>).....	117
3.3	Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung	118
3.4	Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch <i>Flammulina velutipes</i>	119
3.5	Transformation, Enzymexpression und -reinigung	121
3.5.1	Transformationen und genetische Modifikationen	121
3.5.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit der α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i> kodierenden Gensequenz	121
3.5.1.2	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Colony-PCR</i>)	121
3.5.1.3	Modifikation der Gensequenz mittels <i>QuikChange</i> TM	122
3.5.2	Rekombinante Expression und Reinigung der Enzyme	123
3.5.2.1	α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	123

Inhaltsverzeichnis

3.5.2.2	α -Dioxygenase aus <i>Oryza sativa</i>	124
3.5.2.3	Carbonsäure-Reduktase aus <i>Mycobacterium marinum</i>	125
3.5.3	Funktionstests der gereinigten Enzyme	126
3.6	Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase	127
3.6.1	Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden ..	127
3.6.1.1	Wahl der Adsorbens-Beschichtung	127
3.6.1.2	Einfluss unterschiedlicher Matrices	128
3.6.1.3	Optimierung weiterer Extraktionsparameter	128
3.6.2	Biotransformation fungaler Lipide	129
3.7	Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	132
3.7.1	Einfluss des C-terminalen His-Tags auf die α -Dioxygenase-Aktivität.....	132
3.7.2	Thermofluor-Assay zur Bestimmung der Enzymstabilität (Screening)	133
3.7.3	Bestimmung von Salz-, pH- und Temperaturoptimum	134
3.7.4	Bestimmung enzymkinetischer Parameter	137
3.7.5	Substratspektrum	138
3.8	Darstellung und Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie <i>iso</i> - und <i>anteiso</i> -methylverzweigter Aldehyde	139
3.8.1	Gaschromatographische Charakterisierung und Strukturanalyse der isolierten Substanzen	139
3.8.1.1	Gaschromatographische Charakterisierung.....	139
3.8.1.2	Strukturanalyse der isolierten ω 1-ungesättigten Aldehyde und Alkohole.....	140
3.8.1.3	Strukturanalyse der isolierten methylverzweigten Aldehyde.....	144
3.8.2	Sensorische Charakterisierung der ω 1-ungesättigten Aldehyde	147
3.8.2.1	Bestimmung der sensorischen Reinheit mittels GC-FID-O.....	147
3.8.2.2	Bestimmung der Geruchsqualitäten	147
3.8.2.3	Bestimmung der Geruchsschwellen.....	148
3.8.3	Sensorische Charakterisierung der methylverzweigten Aldehyde	148
3.8.3.1	Bestimmung der Geruchsqualitäten	148
3.8.3.2	Bestimmung der Geruchsschwellen in Luft.....	149
4	Diskussion	151
4.1	Screening verschiedener Pilz-Spezies mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren.....	151
4.1.1	Herangehensweise und Methodik des Screenings	151
4.1.2	Wachstum, Lipidgehalt und Fettsäureprofile.....	152
4.1.3	Vorkommen ungewöhnlicher Fettsäuren	155

Inhaltsverzeichnis

4.2	Einfluss der Kulturparameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren.....	158
4.2.1	Test diverser komplexer Standard-Nährmedien	158
4.2.2	Kultivierungstemperatur	159
4.2.3	Kultivierungsdauer.....	160
4.2.4	Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (<i>Flammulina velutipes</i>)	161
4.2.4.1	Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis	161
4.2.4.2	Kohlenstoffquelle	162
4.2.4.3	Stickstoffquelle	162
4.2.5	Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren (<i>Mortierella hyalina</i>).....	164
4.2.6	Optimierte Kulturführung für <i>Flammulina velutipes</i> und <i>Mortierella hyalina</i> im Hinblick auf die Produktion relevanter Fettsäuren	164
4.3	Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung	166
4.4	Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch <i>Flammulina velutipes</i>	167
4.5	Transformation, Enzymexpression und -reinigung	170
4.5.1	Transformationen und genetische Modifikationen	170
4.5.2	Enzymexpression und -reinigung	170
4.6	Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase	172
4.6.1	Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden..	172
4.6.2	Biotransformation fungaler Lipide	172
4.7	Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	176
4.7.1	Enzymstabilität, Salz-, pH- und Temperaturoptimum.....	176
4.7.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter	177
4.7.3	Substratspektrum	178
4.8	Sensorische Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie <i>iso</i> - und <i>anteiso</i> -methylverzweigter Aldehyde	179
4.8.1	Geruchsqualitäten	179
4.8.2	Geruchsschwellen.....	181
5	Ausblick	183
6	Literaturverzeichnis	185
Anhang	204
A.	Aminosäuresequenzen	204
A.1	α -Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>	204

Inhaltsverzeichnis

A.2	α -Dioxygenase aus <i>Oryza sativa</i>	204
A.3	Carbonsäure-Reduktase aus <i>Mycobacterium marinum</i>	204
B.	Retentionsindices von Referenzverbindungen	205
C.	Ergänzende Fettsäureprofile	207
C.1	Ergänzende Fettsäureprofile von <i>Flammulina velutipes</i>	207
C.2	Ergänzende Fettsäureprofile von <i>Mortierella hyalina</i>	222
D.	Anteilige Berechnung des ¹³ C-Fettsäuregehalts	231
E.	Enzymkinetische Parameter der Carbonsäure-Reduktase aus <i>Mycobacterium marinum</i> bezüglich Dodec-11-ensäure.....	232
F.	Geruchsattribute der ω 1-ungesättigten Aldehyde	233

Abkürzungsverzeichnis

Neben den in Tabelle 4 (Fettsäuren) und Tabelle 16 (Pilze) eingeführten Kurzformen fanden in der vorliegenden Arbeit folgende Abkürzungen Verwendung.

α -DOX	α-Dioxygenase
AldDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APCI	chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CAR	Carbonsäure-Reduktase (<i>carboxylic acid reductase</i>)
CAR	Carboxen
Cel	Cellobiose
COC	Kaltaufgabe auf die Säule (<i>cool on column</i>)
Cs α -DOX	α-Dioxygenase aus <i>Crocospaera subtropica</i>
CW	Carbowax
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylen-diaminetetraacetic acid</i>)
FD	schnell verdauend (<i>fast digest</i>)
Fru	Fructose
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
Glc	Glucose
HF	hohe Wiedergabetreue (<i>high fidelity</i>)
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HS	Kopfraum (<i>head space</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Lac	Lactose
LB	Nährmedium für <i>Escherichia coli</i> (<i>lysogenic broth</i>)
LOX	Lipoxygenase

Abkürzungsverzeichnis

Mal	M altose
ME	M alzextrakt
MEP	M alzextrakt- P epton
MmCAR	Carbonsäure-Reduktase (<i>carboxylic acid reductase</i>) aus <i>Mycobacterium marinum</i>
MPC	M alzextrakt- P epton- K ohlenstoff
MPG	M alzextrakt- P epton- G lucose
MS	M assenspektrometer, M assenspektrometrie
NADP(H)	N icotinamidadeninukleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)
OD ₆₀₀	optische D ichte bei 600 nm
O	O lfaktometrie
ODP	olfaktorischer D etektorport
ORF	olfaktorischer R einheitsfaktor
Os α -DOX	α - D ioxygenase aus <i>Oryza sativa</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Kartoffelextrakt-Glucose (<i>potato extract dextrose</i>)
PDMS	P olydimethylsiloxan
PVDF	P olyvinylidenfluorid
RI	R etentionsindex
Sac	S accharose
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNL	S tandard- N ährlösung
Sor	S orbitol
SPME	Festphasenmikroextraktion (<i>solid phase microextraction</i>)
TAE	T ris- A cetate- E DTA
<i>t</i> -BME	<i>tert</i> - B uthylmethylether
TBS-T	Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween® 20 (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	T etramethylethyldiamin
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	T ris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE	vollentsalzt
VF	V erdünnungsfaktor
Xyl	X ylose

Abkürzungsverzeichnis

YD	Hefeextrakt-Glucose (<i>yeast extract dextrose</i>)
YM	Hefeextrakt-Malzextrakt (<i>yeast extract malt extract</i>)
YMG	Hefeextrakt-Malzextrakt-Glucose (<i>yeast extract malt extract glucose</i>)
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose II (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)
YPG	Hefeextrakt-Pepton-Glucose I (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

1 Einleitung

1.1 Aldehyde als Aromastoffe

Die Stoffklasse der Aldehyde umfasst eine Vielzahl an Molekülen mit einer großen Bandbreite weiterer struktureller Merkmale. Im Folgenden liegt der Fokus auf aliphatischen, acyclischen Aldehyden, die – wie auch die anderen Vertreter dieser vielfältigen Stoffklasse – eine bedeutende Rolle als Aroma- und Duftstoffe spielen (Dunkel *et al.* 2014).

Die Genese von Aldehyden ist durch eine Reihe verschiedener Reaktionen möglich. Dabei lassen sich enzymatische von nicht-enzymatischen Prozessen abgrenzen (Abbildung 1). Zu Letzteren gehört die (Hitze-induzierte) Lipidautoxidation. Diese ist für die Generierung diverser gesättigter, aber auch ein- und mehrfach ungesättigter, vor allem kurz- bis mittelkettiger Aldehyde beschrieben, welche sich aus den intermediär gebildeten Hydroperoxid-Fettsäuren ableiten (Frankel 1982). Bei der thermischen Freisetzung von Aldehyden aus Plasmalogenen handelt es sich um einen weiteren thermisch katalysierten Bildungsweg, welcher in erster Linie für die Bildung von Fettaldehyden verantwortlich zeichnet (Guth und Grosch 1993; Kerscher *et al.* 2000). Beim Strecker-Abbau werden dagegen Aldehyde gebildet, die sich von Aminosäuren ableiten. Letztere werden durch Reaktion mit α -Dicarbonylverbindungen oxidativ abgebaut, was zur Bildung C₁-verkürzter Produkte führt (Hofmann *et al.* 2000; Smit *et al.* 2009).

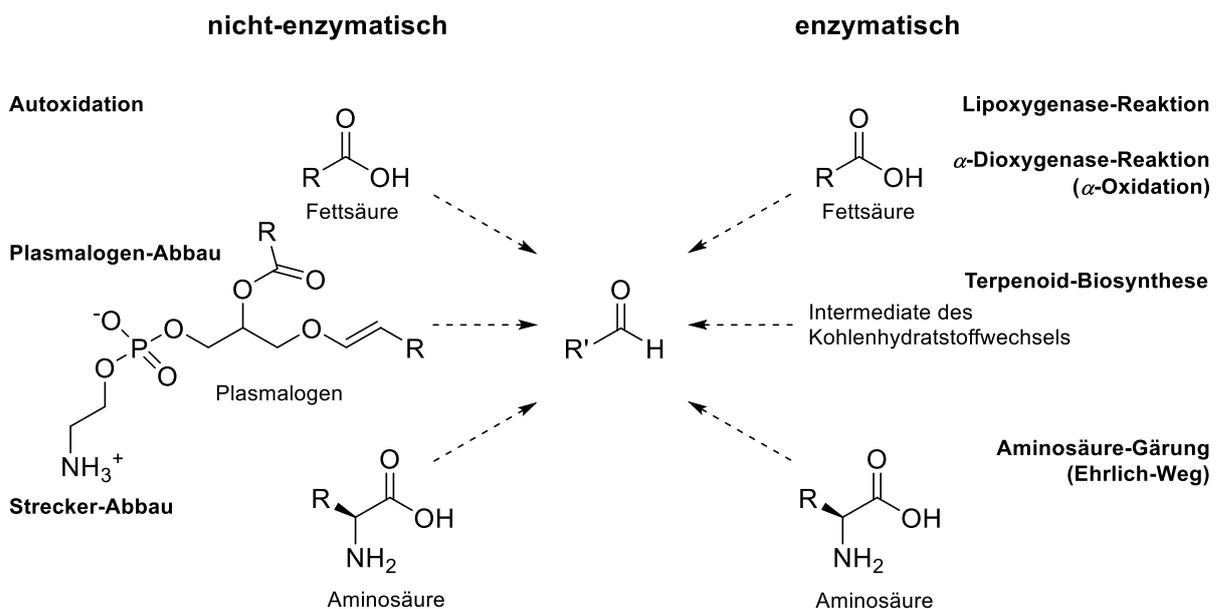


Abbildung 1: Typische Genese-Wege von Aldehyden in Lebensmitteln.

Einleitung

Aminosäuren können daneben enzymatisch in Aldehyde überführt werden. Sie können im Ehrlich-Weg (Aminosäuregärung) in einer mehrstufigen Reaktion in Aldehyde wie 2/3-Methylbutanal oder auch Methional umgewandelt werden (Smit *et al.* 2009; Dunkel *et al.* 2014). Daneben können aber auch Lipide Ausgangssubstanzen für die enzymatische Aldehyd-Synthese sein, wobei die Lipoxygenase-Reaktion den bekanntesten Reaktionstypus darstellen dürfte. Durch dieses Enzym werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linol- oder Linolensäure zu Hydroperoxiden oxidiert, welche nachfolgend in einer Lyase-gekoppelten Reaktion zu Aldehyden und ω -Oxofettsäuren gespalten werden. Bei den Folgereaktionen können Isomerasen involviert sein (Matsui 1998; Feussner und Wasternack 1998; Andreou und Feussner 2009). Neben den Lipoxygenasen nutzen auch α -Dioxygenasen (α -DOX) Fettsäuren als Präkursoren für die Aldehyd-Biosynthese (Näheres siehe 1.3). Weiter können Zwischenprodukte aus dem Kohlenhydratstoffwechsel in die Terpenoid-Synthese münden, die ebenfalls die Bildung von Aldehyden ermöglicht (Vranová *et al.* 2013).

Durch die Genese aus verschiedenen, in erster Linie ubiquitären sowie in großen Mengen vorkommenden Präkursoren, resultiert ein breit verteiltes Vorkommen sowohl in pflanzlichen wie auch tierischen Lebensmitteln. In diesem Zusammenhang ist die große Variabilität an Geruchsqualitäten von Aldehyden zu erwähnen. So können sie neben röstigen auch grüne und fettige Noten aufweisen. Auch Vertreter mit frittierten sowie talgigen Nuancen sind bekannt. Weiter finden sich Komponenten, die zu blumigen oder fruchtigen bis citrusartigen Geruchseindrücken beitragen. Daneben werden metallische oder auch weihrauchartige Gerüche beschrieben (Beispiele siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Auswahl an Vertretern aliphatischer, acyclischer Aldehyde unter Angabe des Vorkommens und der Geruchsqualitäten nach Burdock und Fenaroli (2010), sofern nicht anders angegeben.

Kategorie	Vertreter	Vorkommen (Beispiele)	Geruchsqualität
gesättigt, unverzweigt	Acetaldehyd	Früchte wie Apfel, Erdbeere oder Ananas, Rum, Whiskey	fruchtig
	Hexanal	Fisch, Fleisch, Früchte, Gemüse, Kaffee, Milch, Tee	fettig, fruchtig, grasig, grün
	Decanal	ätherische Öle vieler Citrus-Früchte, Früchte, Milchprodukte, Fleisch	citrusartig, fettig, floral, süßlich, wächsern
	Tridecanal	ätherisches Orangen-Öl, Koriander-Blätter	citrusartig, frisch, seifig, wächsern

Einleitung

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Kategorie	Vertreter	Vorkommen (Beispiele)	Geruchsqualität
gesättigt, verzweigt	2-Methylbutanal	Bier, Fisch, Früchte, Gemüse, Getreide, Milchprodukte, Nüsse	süßlich, nach Schokolade, leicht fruchtig
	6-Methyloctanal	ätherisches Orangen-Öl ^a , ätherisches Yuzu-Öl ^b	fettig, frisch, fruchtig, grün, nach Orange ^{a,b}
	2-Methylundecanal	ätherisches Kumquat-Öl	fettig, floral, nach Honig, nach Weihrauch ^c
	12-Methyltridecanal	Rindfleisch ^d , gereifter Gouda ^e	fleischig, talgig
ungesättigt, unverzweigt	(2E)-Hex-2-enal	Bier, Fisch, Fleisch, Früchte, Gemüse, Milch, Tee	grün, fruchtig, nach Mandeln, nach Pflaume, süßlich
	(8Z)-Tetradec-8-enal	ätherisches Orangen-Öl ^a	citrusartig, fettig, frisch, fruchtig, süßlich ^a
	(2E,6Z)-Nona-2,6-dienal	Fisch, Fleisch, Früchte, Gemüse, insbesondere Gurke, Milch	nach Gurke, nach Melone
	(2E,4E)-Deca-2,4-dienal	frittierte Kartoffelprodukte, Früchte, Gemüse, Fisch und Fleisch, insbesondere Hähnchen	ölig, nach Hähnchen, in hohen Konzentrationen süßlich, nach Orange
ungesättigt, verzweigt	2,6-Dimethyl-5-heptenal	ätherisches Zitronen- und Limetten-Öl, Ingwer	nach Melone
sonstige	<i>trans</i> -4,5-Epoxy-(2E)- dec-2-enal	pflanzliche Öle, Rindfleisch, Orangensaft ^f	metallisch ^f

^a Widder *et al.* (2003), ^b Tajima *et al.* (1990), ^c Surburg und Panten (2006), ^d Guth und Grosch (1993), ^e Inagaki *et al.* (2015), ^f Buettner und Schieberle (2001)

Eine weitere Ursache für die tragende Rolle der Aldehyde als Aromastoffe liegt in ihren niedrigen Geruchsschwellen (Ranson *et al.* 1992), wodurch sie bereits in sehr kleinen Konzentrationen aromawirksam sind. In Extremfällen können die Schwellen in Luft Minimalwerte von 80 pg/L ((2E,4E)-Deca-2,4-dienal) oder sogar 1 pg/L (*trans*-4,5-Epoxy-(2E)-dec-2-enal) erreichen (Gasser und Grosch 1990; Buettner und Schieberle 2001). Aldehyde können allerdings nicht nur im positiven Sinne zum Aroma eines Lebensmittels beitragen, sondern bereits in Spuren unerwünschte Fehlgerüche hervorrufen. In der Literatur lassen sich mannigfache Beispiele feststellen, bei denen Fehlgerüche auf unerwünschte Aldehyde zurückzuführen sind. Bier (Narziss 1986), Mayonnaise (Hartvigsen *et al.* 2000), pflanzliche Öle (Ullrich und Grosch 1987), Rindfleisch (Konopka und Grosch 1991), Sojaprodukte (Zhang *et al.* 2012), Wein (Culleré *et al.* 2007) und sogar Polyethylen-Verpackungen (Sanders *et al.* 2005) seien an dieser Stelle als betroffene Lebensmittel bzw. Bedarfsgegenstände genannt.

1.2 Biotechnologische Produktion von Aldehyden

Die unterschiedlichen Geruchsqualitäten bei gleichzeitig niedrigen Schwellenwerte machen Aldehyde zu einer interessanten Substanzklasse für die Aromen- und Duftstoffindustrie. Die Zugänglichkeit dieser Verbindungen über die chemische Synthese ist allerdings nicht ohne Weiteres gegeben. Die Reduktion von Carbonsäuren bedarf aufgrund deren großer thermodynamischer Stabilität einer hohen Aktivierungsenergie. Für gewöhnlich wird daher zum Alkohol überreduziert (Gaylord 1957) und im Anschluss selektiv zum Aldehyd oxidiert (Bowden *et al.* 1946; Omura und Swern 1978; Dess *et al.* 1983; Anelli *et al.* 1987; Ley *et al.* 1994). Entsprechend muss eine große Menge an Reduktionsäquivalenten eingesetzt werden. Einige der selektiven Oxidationsmittel sind zudem teuer. Die Reaktionsführung muss überwiegend in organischen Lösungsmitteln erfolgen und einige der verwendeten Chemikalien sind gesundheitlich bedenklich. Eine alternative, direkte Reduktion zu Aldehyden erfordert meist eine vorherige Aktivierung der Carbonsäuren sowie unerwünschte Reaktionsbedingungen (Brown und Rao 1958; Zakharkin und Khorlina 1962; Chandrasekhar *et al.* 1998). Gleichzeitig herrscht eine steigende Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen, deren Kriterien die chemischen Synthesen nicht erfüllen. Extraktionen aus natürlichen Rohstoffen liefern jedoch nur geringe Ausbeuten, die den Bedarf bei weitem nicht decken können. Biotechnologische Produktionsmethoden, bei denen Mikroorganismen bzw. mit deren Hilfe (heterolog) exprimierte Enzyme zum Einsatz kommen, stellen demgegenüber eine sinnvolle Alternative dar. Im Gegensatz zu chemischen Syntheseansätzen besitzen die dabei zum Einsatz kommenden Enzyme zudem den Vorteil der Stereo-, Regio- und Enantioselektivität, wodurch hochreine Produkte zugänglich sind. Darüber hinaus erlauben sie die Anwendung milder Reaktionsbedingungen, was der zum Teil geringen Stabilität vieler Produkte entgegenkommt (Longo und Sanroman 2006; Akacha und Gargouri 2015; Berger 2015; Carroll *et al.* 2016). Zum überwiegenden Teil werden Bakterien oder Hefen, aber auch Pflanzen und Insekten zur (heterologen) Expression von Enzymen genutzt. Bei *E. coli* handelt es sich um das populärste Expressionssystem, da sich das Bakterium in einem kostengünstigen Nährmedium kultivieren lässt und sich durch eine geringe Verdopplungszeit, effektive Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA, einfache Möglichkeit zur Mutanten-Selektion, hohe Expressionsraten und/oder Zelldichten auszeichnet. Weiter stehen viele verschiedene Vektorsysteme und Expressionsstämme zur Verfügung (Kaur *et al.* 2018).

Einleitung

In den vergangenen Jahren wurden Produktionsverfahren für eine Vielzahl von Verbindungen entwickelt, sodass mittlerweile über 100 Aromastoffe aus biotechnologischen Prozessen kommerziell verfügbar sind (Akacha und Gargouri 2015; Berger 2015). Bei der Entwicklung derartiger Produktionsverfahren wird in der Regel versucht, einen natürlichen Biosyntheseweg nachzubilden. So fanden auch einige der in Kapitel 1.1 erläuterten Bildungswege Anwendung.

Zur Herstellung von C₆- und C₉-Aldehyden wird das Enzymsystem aus Lipoxygenase (LOX) und Hydroperoxid-Lyase (HPL) genutzt (Akacha und Gargouri 2015). Enzymhaltige Pflanzen-Homogenate wie Sojamehl (13-LOX) und Zuckerrübenblätter (HPL) werden eingesetzt, um Hexanal und (3Z)-Hex-3-enal aus Linol- bzw. Linolensäure herzustellen (Rabetafika *et al.* 2008). Durch rekombinante Co-Expression einer 13-LOX aus Soja und einer HPL aus Melone in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde zudem ein mikrobieller Prozess zur Gewinnung von (3Z)-Hex-3-enal etabliert (Buchhaupt *et al.* 2012). Huang und Schwab brachten das Gen einer HPL dagegen in Tabakblätter ein. Dies rief simultan eine Hochregulation der Aktivität der endogenen 9-LOX hervor und machte damit ungesättigte C₉-Aldehyde zugänglich (Huang und Schwab 2012). Kurzkettigere Aldehyde wie Isobutyraldehyd konnten mit Hilfe von *E. coli* über den Aminosäure-Metabolismus gewonnen werden (Rodriguez und Atsumi 2012). Als direkte Präkursoren kommen darüber hinaus Alkohole und Carbonsäuren in Frage. Durch Anwendung von Alkohol-Dehydrogenasen wurden für die Umsetzung kurzkettiger Alkohole bereits hohe Ausbeuten erzielt (Gabelman und Luzio 1996). Zur Nutzung von Carbonsäure-Substraten stehen mehrere Enzymklassen zur Verfügung, wobei zur direkten Reduktion Aldehydoxidoreduktasen (aus anaeroben Bakterien und Archaeen), vor allem aber Carbonsäure-Reduktasen (CAR, aus aeroben Bakterien, Pilzen und Pflanzen) bevorzugt werden (Napura-Wijata *et al.* 2014; Qu *et al.* 2018). Fraatz *et al.* gelang mittels einer CAR aus *Mycobacterium marinum* die Herstellung von 12-Trimethyldecanal (Fraatz *et al.* 2018) und auch viele aromatische Aldehyde lassen sich mit diesen Enzymen aus den entsprechenden Säuren gewinnen (1.4). Andererseits sind Carbonsäuren auch mit α -DOX umsetzbar, wobei keine direkte Reduktion der Carbonsäurefunktion erfolgt, sondern durch oxidative Decarboxylierung ein C₁-verkürztes Aldehyd resultiert (1.3).

1.3 α -Dioxygenasen

1.3.1 Vorkommen und native Funktion

α -DOX stellen die namensgebenden Schlüsselenzyme der α -Oxidation dar und katalysieren die Dioxygenierung am α -Kohlenstoffatom von Fettsäuren. Die auf diese Weise intermediär generierten Hydroperoxyfettsäuren können in weiteren Reaktionen entweder zum C_1 -verkürzten Aldehyd decarboxylieren oder mittels Peroxidase zu 2-Hydroxyfettsäuren umgesetzt werden (Abbildung 2). Tatsächlich besitzen einige Vertreter der α -DOX sogar selbst Peroxidase-Aktivität (Hamberg *et al.* 2005).

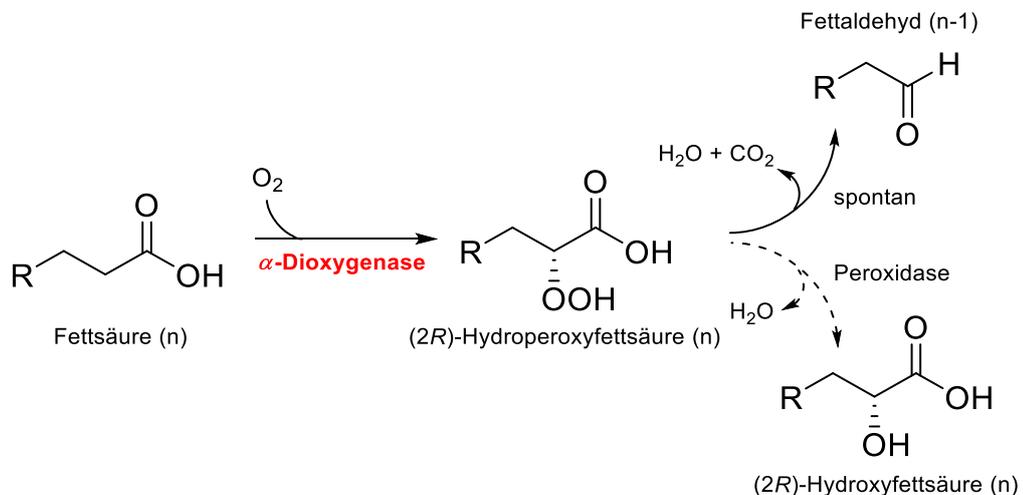


Abbildung 2: Mechanismus der α -Oxidation von Fettsäuren nach Hamberg *et al.* 2005.

Grundlegende Untersuchungen zum Prozess der α -Oxidation erfolgten bereits in den 1960er bis 1970er Jahren anhand diverser pflanzlicher Gewebe (Stumpf 1956; Hitchcock und James 1966; Markovetz *et al.* 1972; Shine und Stumpf 1974). Seither wurden α -DOX in verschiedenen Pflanzen beschrieben (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der am besten charakterisierten α -DOX.

Herkunftsorganismus	Literaturstelle
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	Sanz <i>et al.</i> (1998) und Hamberg <i>et al.</i> (1999)
<i>Arachis sp.</i> (Erdnuss)	Markovetz <i>et al.</i> (1972)
<i>Cucumis sativus</i> (Gurke)	Borge <i>et al.</i> (1997) und Galliard und Matthew (1976)
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak)	Sanz <i>et al.</i> (1998) und Hamberg <i>et al.</i> (1999)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)	Tirajoh <i>et al.</i> (2005)
<i>Oryza sativa</i> (Reis)	Koeduka <i>et al.</i> (2000)
<i>Pea sativa</i> (Erbse)	Saffert <i>et al.</i> (2000)
<i>Physcomitrella patens</i> (Moos)	Hamberg <i>et al.</i> (2005)
<i>Ulva pertusa</i> (Alge)	Akakabe <i>et al.</i> (1999)

Neuere Studien sehen den Stoffwechselweg unter anderem im Kontext pflanzlicher Abwehrreaktionen (Hamberg *et al.* 2002a; Hamberg *et al.* 2005). So wurde beispielsweise bei mikrobiellen Infektionen und Insekten-Fraß eine erhöhte Expression der α -DOX festgestellt (Hermsmeier *et al.* 2001; Hamberg *et al.* 2002a; Ponce de Leon *et al.* 2002; Hamberg *et al.* 2003). Aber auch generelle Stress-Situationen wie erhöhte Salz-Konzentrationen induzierten die Enzymexpression (Tirajoh *et al.* 2005). Ein verstärktes Vorkommen in Keimlingen legt daneben eine Rolle im Zuge von deren Entwicklung nahe. Dabei scheint in erster Linie eine zweite Isoform der α -DOX beteiligt zu sein (Hamberg *et al.* 2005; Bannenber *et al.* 2009).

1.3.2 Struktureller Aufbau und katalytischer Mechanismus

α -DOX werden von helikalen Strukturen dominiert. Zum Teil weisen diese amphipathische Eigenschaften auf, was auf eine Assoziation an Lipid-Membranen hindeutet. Die Funktion der entdeckten Ca^{2+} -Bindestellen ist dagegen bislang unklar (Goulah *et al.* 2013). Weiter besitzen die Enzyme als strukturgebendes Merkmal eine nicht-kovalent gebundene Häm-Gruppe, die daneben auch eine katalytische Funktion erfüllt (Liu *et al.* 2004).

Bereits seit längerem ist bekannt, dass durch verschiedene α -DOX selektiv die (*R*)-Enantiomere sowohl der 2-Hydroperoxy- als auch der 2-Hydroxyfettsäuren gebildet werden (Hitchcock *et al.* 1968; Markovetz *et al.* 1972; Akakabe *et al.* 1999; Hamberg *et al.* 2002b; Koeduka *et al.* 2002). Mechanistische Hinweise lieferten zunächst Studien, bei denen durch Punktmutation einzelne Aminosäuren im Enzym getauscht wurden und damit deren Bedeutung für die Katalyse untersucht wurde (Hamberg *et al.* 2002b; Koeduka *et al.* 2002; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008). Die Röntgen-Kristallstrukturen der α -DOX aus *Oryza sativa* (Zhu *et al.* 2013) und *Arabidopsis thaliana* (Goulah *et al.* 2013) lieferten weitere Anhaltspunkte für die katalytische Funktionsweise der Enzyme. Demzufolge binden α -DOX ihr Fettsäure-Substrat über einen Substratkanal, wobei – anders als bei den strukturell verwandten Cyclooxygenasen – die Carboxy-Gruppe im aktiven Zentrum gebunden wird (Goulah *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2013). Man nimmt an, dass das 2-pro-(*R*)-Wasserstoffatom vom C2-Atom eines Fettsäure-Substrates durch ein Tyrosyl-Radikal abstrahiert wird, was zur Bildung eines α -Carbonyl-Radikals führt. Dieses wiederum kann molekularen Sauerstoff einfangen (Huff *et al.* 2011; Goulah *et al.* 2013). Histidin-, Threonin- und Arginin-Reste scheinen für die Ausrichtung des Substrates wichtig zu sein. Daneben besteht die Annahme, dass zwei Phenylalanin-Reste dessen Kohlenstoffkette durch hydrophobe Interaktionen stabilisieren (Goulah *et al.* 2013).

1.3.3 Biotechnologische Anwendung

Die ersten heterologen Expressionen von α -DOX erfolgten zunächst in Insektenzellen (Sanz *et al.* 1998; Hamberg *et al.* 1999), doch bereits kurz darauf folgte die erste erfolgreiche Expression der α -DOX aus der Reispflanze in *E. coli* (Koeduka *et al.* 2000), womit der Grundstein für die biotechnologische Anwendung gelegt wurde. Seither wurde dieses Reis-Enzym sporadisch zur Produktion gesättigter bzw. methylverzweigter Aldehyde als Aromastoffe eingesetzt (Kaehne *et al.* 2011a, 2011b; Fraatz *et al.* 2015).

1.4 Carbonsäure-Reduktasen

1.4.1 Vorkommen und native Funktion

Im Vergleich zu α -DOX folgen CAR einem alternativen Reaktionsmechanismus, der zu einer direkten Reduktion der Carboxylgruppe ohne Verkürzung der Kohlenstoffkette führt (Abbildung 3) (Napora-Wijata *et al.* 2014; Qu *et al.* 2018; Winkler 2018; Butler und Kunjapur 2020).

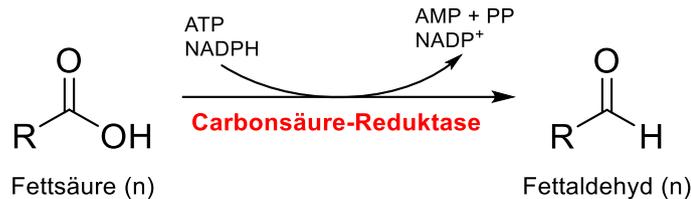


Abbildung 3: Reduktion von Carbonsäuren mittels CAR.

Der erste Nachweis der Aktivität von CAR datiert auf 1959. Nach Inkubation aromatischer Carbonsäuren mit Myzel des Pilzes *Trametes versicolor* wurden entsprechende Aldehyde und Alkohole detektiert (Farmer *et al.* 1959). Erst über 50 Jahre später gelang schließlich die Beschreibung und Charakterisierung des verantwortlichen Enzyms (Winkler und Winkler 2016). Die Identifizierung und erste rekombinante Expression eines anderen CAR-Enzyms aus *Nocardia iowensis* erfolgte jedoch bereits einige Jahre früher (He *et al.* 2004). Mittlerweile ist eine Vielzahl anderer CAR aus Bakterien, Pilzen und auch Pflanzen beschrieben. Sie zeichnen sich durch sehr breite Substratspektren aus, die zwischen den einzelnen Enzymen mehr oder weniger stark überlappen (Napora-Wijata *et al.* 2014; Qu *et al.* 2018; Winkler 2018; Butler und Kunjapur 2020). Für die Mehrheit der CAR sind vor allem hohe Aktivitäten gegenüber aromatischen Carbonsäuren dokumentiert. Für mehrere Vertreter finden sich allerdings auch Nachweise bezüglich der Reduktionsfähigkeit gegenüber aliphatischen Substraten (Tabelle 3). Trotz der zahlreichen Nachweise ist die originäre Funktion der Enzyme bislang nicht endgültig geklärt. In der Literatur wird eine noch nicht näher erkennbare Rolle im erweiterten Lipidstoffwechsel diskutiert. Ein Zusammenhang mit Infektionsmechanismen erscheint möglich (Moura *et al.* 2016).

Einleitung

Tabelle 3: CAR mit dokumentierter Reduktionsfähigkeit gegenüber Fettsäuren.

Abkürzung	Herkunftsorganismus	getestete Substrate	Literaturstelle
MabCAR	<i>Mycobacterium abscessus</i>	4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Khusnutdinova et al. (2017)
MavCAR	<i>Mycobacterium avium</i>	4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Khusnutdinova et al. (2017)
McCAR	<i>Mycobacterium chelonae</i>	4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Khusnutdinova et al. (2017)
MiCAR	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Khusnutdinova et al. (2017)
MmCAR	<i>Mycobacterium marinum</i>	4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1(9Z), 18:2(9Z,12Z), 18:3(9Z,12Z,15Z) 4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0 i14:0, i15:0	Akhtar et al. (2013) Khusnutdinova et al. (2017) Fraatz et al. (2018)
MnCAR	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	6:0, 9:0, 12:0, 15:0, 18:2(9Z,12Z)	Duan et al. (2015b)
MpCAR	<i>Mycobacterium phlei</i>	8:0, 12:0, 18:0	Finnigan et al. (2017)
MsCAR	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	8:0, 12:0, 18:0 4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Finnigan et al. (2017) Khusnutdinova et al. (2017)
NbCAR	<i>Nocardia brasiliensis</i>	4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Khusnutdinova et al. (2017)
NiCAR	<i>Nocardia iowensis</i>	4:0, 8:0, 12:0, 18:0 3:0, 4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0	Finnigan et al. (2017) Sheppard et al. (2014)
NoCAR	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	8:0, 12:0, 18:0	Finnigan et al. (2017)
TpCAR	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	8:0, 12:0, 18:0	Finnigan et al. (2017)
TtCAR	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Horvat et al. (2019)
TvCAR	<i>Trametes versicolor</i>	7:0, 8:0, 9:0	Winkler und Winkler (2016)
SrCAR	<i>Segniliparus rotundus</i>	6:0, 9:0, 14:0 4:0, 5:0, 6:0, 7:0, 8:0, 9:0, 10:0	Duan et al. (2015a) Khusnutdinova et al. (2017)

1.4.2 Struktureller Aufbau und katalytischer Mechanismus

CAR sind Mg^{2+} , ATP- sowie NADPH-abhängig und gehören der Enzymklasse EC 1.2.1.30 an (Derrington et al. 2019; Napora-Wijata et al. 2014). Trotz unterschiedlicher phylogenetischer Abstammung scheinen alle CAR dieselbe 3-Domänen-Struktur aufzuweisen und damit die Katalyse nach demselben Mechanismus zu ermöglichen (Stolterfoht et al. 2017). Erst kürzlich wurden durch Röntgen-Kristall-Strukturanalysen detaillierte Strukturinformationen dreier verschiedener CAR erhalten, die die bisherigen Thesen weiter untermauern (Gahloth et al. 2017). Eine Adenylierungs-Domäne (A-Domäne) aktiviert das Carbonsäuresubstrat durch die Bildung von Carboxyl-AMP unter ATP-Aufwand. Dieses wird in der Transthiolierungs-Domäne (T-Domäne, auch PPT-Bindungsseite oder Peptidyl-Carrier-Protein (PCP-Domäne)) auf die

Thiol-Gruppe eines Phosphopantethein-Restes übertragen. Die T-Domäne kann daraufhin mit dem kovalent gebundenen Substrat zur Reduktionsdomäne (R-Domäne) umklappen, wo unter NADPH-Aufwand die Reduktion des Thioesters erfolgt (Venkitasubramanian *et al.* 2007).

1.4.3 Biotechnologische Anwendung

Die Forschung beschäftigt sich derzeit vor allem mit dem Einsatz von CAR zur Produktion von Aromastoffen. So wurde beispielsweise ein biotechnologischer Ansatz auf Basis einer CAR entwickelt, mit dem 12-Methyltridecanal hergestellt werden kann (Fraatz *et al.* 2018). Andere Gruppen beschäftigten sich mit der Darstellung aromatischer Aldehyde wie Benzaldehyd (Kunjapur *et al.* 2014) und Vanillin (Kunjapur *et al.* 2014; Horvat *et al.* 2019) oder auch Piperonal (Schwendenwein *et al.* 2016). Daneben finden sich immer mehr Untersuchungen zur Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Feinchemikalien. Eine neuere Entwicklung sind vor allem in diesem Zusammenhang *in vivo*-Kaskaden und chemo-enzymatische Reaktionskopplungen (Winkler 2018; Derrington *et al.* 2019).

Die Exprimierbarkeit der CAR mit Hilfe von *E. coli* macht die Enzyme leicht zugänglich. Dennoch erschweren der Co-Faktor-Bedarf sowie die Reduktion der gewünschten Aldehyde durch *E. coli*-eigene Enzyme einen ökonomisch sinnvollen Einsatz. Gegenstand aktueller Studien ist daher die Entwicklung von Lösungsstrategien (Winkler 2018; Derrington *et al.* 2019).

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biotechnologischen Darstellung und der instrumentell-analytischen sowie sensorischen Charakterisierung ungewöhnlicher Fettaldehyde.

Als Präkursoren sollten fungale Fettsäuren genutzt werden. Geeignete Fettsäuren sowie Produktionsorganismen sollten zunächst durch ein breit angelegtes Screening identifiziert werden. Hierfür wurden Pilze in Schüttelkolben kultiviert, die Lipide der Myzelien mittels halbautomatischer Soxtherm® extrahiert und nach Methylveresterung deren Fettsäureprofile per Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Die Kulturführung vielversprechender Kandidaten sollte optimiert werden, indem der Einfluss verschiedener Kulturparameter näher untersucht wurde. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Ausbeute von Fettsäuren mit Doppelbindungen an ungewöhnlichen Positionen (v.a. 12:1(11) (ω 1) und 17:1(9Z) (ω 8)). Durch Supplementationsstudien sollten bislang unbekannte Biosynthesewege solcher Zielverbindungen aufgeklärt werden.

Die Biotransformation der Fettsäuren sollte nach Hydrolyse der Triglyceride durch eine kommerziell erhältliche Lipase mittels α -DOX oder CAR erfolgen. Letztere wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und affinitätschromatographisch anhand eines His-Tags gereinigt. Die enzymatischen Reaktionsprodukte wurden per Kopfraum-Festphasenmikroextraktion in Verbindung mit einem GC-System analysiert und per Massenspektrometer bzw. Olfaktometrie detektiert (HS-SPME-GC-MS-O). Sensorisch ansprechende Aldehyde stellten den Ausgangspunkt für detailliertere Untersuchungen dar. Hierfür sollten homologe Reihen der entsprechenden Aldehyde hergestellt und die einzelnen Verbindungen instrumentell-analytisch sowie sensorisch (Geruchsqualitäten und -schwellen) charakterisiert werden.

Aus internen Vorarbeiten in Kooperation mit dem DECHEMA-Forschungsinstitut (Frankfurt am Main) war neben den etablierten Enzymen eine α -DOX des Cyanobakteriums *Crocospaera subtropica* bekannt, die bislang nicht in der Literatur beschrieben war. Die Eigenschaften des Enzyms sollten umfassend untersucht werden. Mittels gaschromatographischer Methoden und durch Messung des Sauerstoff-Verbrauchs anhand einer optischen Sonde wurden Salz-, pH- und Temperaturoptimum sowie das Substratspektrum und enzymkinetische Parameter bestimmt. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Transformation methylverzweigter Fettsäure-Substrate. Die korrespondierenden Aldehyde sollten ebenfalls instrumentell-analytisch wie auch sensorisch evaluiert werden.

2 Experimenteller Teil

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Zur gaschromatographischen Identifizierung der Fettsäuren wurden Fettsäurestandards verschiedener Hersteller verwendet (Tabelle 4). Es wurden sowohl Fettsäuremethylester als auch Fettsäuren bezogen. Letztere wurden vor der gaschromatographischen Analyse in Methyl-ester überführt (2.6.2.3). Daneben wurden weitere Referenzverbindungen genutzt (Tabelle 5). In Tabelle 6 sind für die Kultivierung von Pilzen (2.3) bzw. *E. coli* (2.7) genutzten Medienbestandteile gelistet. Sonstige genutzte Chemikalien sind in Tabelle 7, Gase in Tabelle 8 enthalten.

Tabelle 4: Fettsäure- und Fettsäuremethylester-Referenzsubstanzen zur gaschromatographischen Identifizierung.

Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylester			
Abkürzung^a mit Name nach IUPAC	Trivialname^a	Rein- heit	Hersteller
4:0 ^b Butansäuremethylester	Buttersäure	n/a	Supelco (Bellefonte/PA, USA)
6:0 ^b Hexansäuremethylester	Capronsäure	n/a	Supelco
7:0 Heptansäure	Önanthsäure	98%	Acros Organics (Geel, NL)
8:0 ^b Octansäuremethylester	Caprylsäure	n/a	Supelco
9:0 Nonansäure	Pelargonsäure	97%	Acros Organics
10:0 ^b Decansäuremethylester	Caprinsäure	n/a	Supelco
11:0 ^b Undecansäuremethylester	-	n/a	Supelco
12:0 ^b Dodecansäuremethylester	Laurinsäure	n/a	Supelco
12:1(5Z) (5Z)-Dodec-5-ensäure	-	n/a	Santa Cruz Biotechnology (Dallas/TX, USA)
12:1(11) Dodec-11-ensäure	-	> 99%	Larodan AB (Solna, S)
<i>i</i> 13:0 11-Methyldodecansäure	-	> 98%	Larodan AB
<i>α</i> 13:0 10-Methyldodecansäure	-	> 98%	Larodan AB
13:0 ^b Tridecansäuremethylester	-	n/a	Supelco

Experimenteller Teil

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylester			
Abkürzung^a mit Name nach IUPAC	Trivialname^a	Rein- heit	Hersteller
<i>i</i> 14:0 12-Methyltridecansäure	<i>iso</i> -Myristinsäure	> 98%	Symrise (Holzminden)
<i>α</i> 14:0 11-Methyltridecansäure	<i>anteiso</i> -Myristinsäure	> 98%	Symrise
14:0 ^b Tetradecansäuremethylester	Myristinsäure	n/a	Supelco
14:1(5Z) (5Z)-Tetradec-5-ensäure	-	98%	TRC (Toronto, CA)
14:1(9Z) ^b (9Z)-Tetradec-9-ensäuremethylester	Myristoleinsäure	n/a	Supelco
<i>i</i> 15:0 13-Methyltetradecansäure	-	> 98%	Symrise
<i>α</i> 15:0 12-Methyltetradecansäure	-	> 98%	Symrise
15:0 ^b Pentadecansäuremethylester	-	n/a	Supelco
15:1(10Z) ^b (10Z)-Pentadec-10-ensäuremethylester	-	n/a	Supelco
<i>i</i> 16:0 14-Methylpentadecansäure	<i>iso</i> -Palmitinsäure	> 98%	Symrise
<i>α</i> 16:0 13-Methylpentadecansäure	<i>anteiso</i> -Palmitinsäure	> 98%	Symrise
16:0 ^b Hexadecansäuremethylester	Palmitinsäure	n/a	Supelco
16:1(7Z) (7Z)-Hexadec-7-ensäuremethylester	-	≥ 98%	Cayman CC (Ann Arbor/MI, USA)
16:1(9Z) ^b (9Z)-Hexadec-9-ensäuremethylester	Palmitoleinsäure	n/a	Supelco
16:1(11Z) (11Z)-Hexadec-11-ensäure	-	92%	Matreya LLC (State College/PA, USA)
16:2(7Z,10Z) (7Z,10Z)-hexadeca-7,10-diensäure	-	99%	Larodan AB
16:2(9Z,12Z) (9Z,12Z)-Hexadeca-7,12-diensäuremethylester	-	> 98%	Larodan AB
16:3(7Z,10Z,13Z) (7Z,10Z,13Z)-Hexadeca-7,10,13-triensäure	Roughaninsäure	> 98%	Larodan AB
<i>α</i> 17:0 14-Methylhexadecansäuremethylester	<i>anteiso</i> -Margarinsäure	n/a	Larodan AB
17:0 ^b Heptadecansäuremethylester	Margarinsäure	n/a	Supelco
17:1(9Z) (9Z)-Heptadec-9-ensäuremethylester	-	99%	Larodan AB
17:1(10Z) ^b (10Z)-Heptadec-10-ensäuremethylester	-	n/a	Supelco

Experimenteller Teil

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylester				
Abkürzung^a		Trivialname^a	Rein-	Hersteller
mit Name nach IUPAC			heit	
α 18:0		<i>anteiso</i> -Stearinsäure	n/a	Larodan AB
15-Methylheptadecansäure				
18:0 ^b		Stearinsäure	n/a	Supelco
Octadecansäuremethylester				
18:1(9Z) ^b		Ölsäure	n/a	Supelco
(9Z)-Octadec-9-ensäuremethylester				
18:1(9E) ^b		Elaidinsäure	n/a	Supelco
(9E)-Octadec-9-ensäuremethylester				
18:1(11Z)		<i>cis</i> -Vaccensäure	n/a	Santa Cruz Biotechnology
(11Z)-Octadec-11-ensäure				
18:2(6Z,9Z)			> 99%	Larodan AB
(6Z,9Z)-Octadeca-6,9-diensäure				
18:2(9Z,12Z) ^b bzw. LA		Linolsäure	n/a	Supelco
(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäuremethylester				
18:2(9E,12E) ^b		Linolelaidinsäure	n/a	Supelco
(9E,12E)-Octadeca-9,12-diensäuremethylester				
18:2(9Z,11E)		(9Z,11E)-konjugierte Linolsäure	≥ 96%	Sigma-Aldrich (Steinheim)
(9Z,11E)-Octadeca-9,13-diensäure				
18:2(10E,12Z)		(10E,12Z)-konjugierte Linolsäure	≥ 98%	Cayman CC
(10E,12Z)-Octadeca-10,12-diensäure				
18:3(6Z,9Z,12Z) ^b bzw. GLA		γ -Linolensäure	n/a	Supelco
(6Z,9Z,12Z)-Octadeca-6,9,12-triensäuremethylester				
18:3(9Z,12Z,15Z) ^b bzw. ALA		Linolensäure	n/a	Supelco
(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäuremethylester				
18:3(9Z,11E,13E)		α -Eleostearinsäure	n/a	Santa Cruz Biotechnology
(9Z,11E,13E)-Octadeca-9,11,13-triensäuremethylester				
18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)		Stearidonsäure	≥ 98%	Cayman CC
(6Z,9Z,12Z,15Z)-Octadeca-6,9,12,15-tetraensäure				
19:0		-	≥ 95%	Cayman CC
Nonadecansäure				
19:1(10Z)		-	≥ 98%	Cayman CC
(10Z)-Nonadec-10-ensäure				
20:0 ^b		Arachinsäure	n/a	Supelco
Eicosansäuremethylester				
20:1(11Z) ^b		Gondosäure	n/a	Supelco
(11Z)-Eicos-11-ensäuremethylester				
20:2(11Z,14Z) ^b		Homogamma- linolensäure	n/a	Supelco
(11Z,14Z)-Eicosa-11,14-diensäuremethylester				
20:3(5Z,8Z,11Z)		Meadsäure	≥ 98%	Cayman CC
(5Z,8Z,11Z)-Eicosa-5,8,11-triensäure				
20:3(5Z,11Z,14Z)		Sciadonsäure	n/a	Cayman CC
(5Z,11Z,14Z)-Eicosa-5,11,14-triensäure				
20:3(8Z,11Z,14Z) ^b bzw. DGLA		Dihomogamma- linolensäure	n/a	Supelco
(8Z,11Z,14Z)-Eicosa-8,11,14-triensäuremethylester				

Experimenteller Teil

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylester			
Abkürzung^a	Rein-	Rein-	Hersteller
mit Name nach IUPAC	heit	heit	
	Trivialname^a		
20:3(11Z,14Z,17Z) ^b bzw. ETE (11Z,14Z,17Z)-Eicosa-11,14,17-triensäuremethylester	Dihomolinolensäure	n/a	Supelco
20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) ^b (5Z,8Z,11Z,14Z)-Eicosa-5,8,11,14-tetraensäuremethylester	Arachidonsäure	n/a	Supelco
20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) ^b bzw. EPA (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eicosa-5,8,11,14,17-pentaensäuremethylester	Timnodonsäure	n/a	Supelco
21:0 ^b Heneicosansäuremethylester	-	n/a	Supelco
22:0 ^b Docosansäuremethylester	Behensäure	n/a	Supelco
22:1(13Z) ^b (13Z)-Docos-13-ensäuremethylester	Erucasäure	n/a	Supelco
22:2(13Z,16Z) ^b (13Z,16Z)-Docosa-13,16-diensäuremethylester	-	n/a	Supelco
22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) bzw. DTA (7Z,10Z,13Z,16Z)-Docosa-7,10,13,16-tetraensäure	Adrensäure	≥ 98%	Cayman CC
22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z) ^b bzw. DHA (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaensäuremethylester	Clupanodonsäure	n/a	Supelco
23:0 ^b Tricosansäuremethylester	-	n/a	Supelco
24:0 ^b Tetracosansäuremethylester	Lignocerinsäure	n/a	Supelco
24:1(15Z) ^b (15Z)-Tetracos-15-ensäuremethylester	Nervonsäure	n/a	Supelco
25:0 Pentacosansäuremethylester	-	n/a	Santa Cruz Biotechnology
26:0 Hexacosansäure	Cerotinsäure	≥ 90%	Sigma-Aldrich

^a angegeben ist stets die Abkürzung bzw. der Trivialname der korrespondierenden Fettsäure

^b die Verbindung ist Bestandteil des kommerziell erhältlichen Fettsäuremethylester-Standardmischung „37 Component FAME Mix“

Tabelle 5: Sonstige Referenzverbindungen.

Substanz	Hersteller	Substanz	Hersteller
Decanal, 96%	Alfa Aesar (Karlsruhe)	(2E)-Hex-2-enal, 99%	Acros Organics
(7Z)-Dec-7-enal, 97%	Sigma-Aldrich	Nonanal, 95%	Sigma-Aldrich
(2E)-Dec-2-enal, 95%	Sigma-Aldrich	(6Z)-Non-6-enal, 94%	Alfa Aesar
Dodecanal, 95%	Alfa Aesar	Octanal, 99%	Acros Organics
Heptanal, 97%	Alfa Aesar	Pentadecanal, 97%	TCI
Heptadecanal, > 97%	TCI (Tokyo, JP)	Tetradecanal, > 95%	TCI
(4Z)-Hept-4-enal, 98%	Th. Geyer (Karlsruhe)	Tridecanal, 96%	Alfa Aesar
Hexanal, 98%	Sigma-Aldrich	Undecanal, > 97%	TCI
Hexadecanal, > 97%	TCI	(8Z)-Undec-8-enal, 97%	ABCR (Karlsruhe)
(11Z)-Hexadec-11-enal, < 90%	TCI		

Experimenteller Teil

Tabelle 6: Medienbestandteile.

Medienkomponente	Hersteller
Adeninsulfat, $\geq 98\%$	Alfa Aesar
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat, $\geq 99,5\%$	Carl Roth
Asparagin-Monohydrat, $\geq 99\%$	AppliChem (Darmstadt)
Calciumcarbonat, p.a.	Sigma-Aldrich
Caseinpepton	Carl Roth
D-(+)-Cellobiose, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, $> 98\%$	Acros Organics
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, p.a.	AppliChem
Erbsenpepton	Carl Roth
Fleischpepton	Sigma-Aldrich
D-(-)-Fructose, $> 99,5\%$	Carl Roth
Glucose, p.a.	Carl Roth
Glucose-Monohydrat	Carl Roth
Glycerol, 99,5%	VWR (Darmstadt)
Hefeextrakt	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 98\%$	Carl Roth
Kartoffelextrakt	Fluka Analytical (Steinheim)
Kupfersulfat-Pentahydrat, p.a.	AppliChem
Lactalbuminpepton	Serva (Heidelberg)
D-(+)-Lactose-Monohydrat, Ph. Eur.	Carl Roth
<i>lysogenic broth</i> (LB)-Medium	Carl Roth
D-(+)-Maltose-Monohydrat, $\geq 95\%$	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Hydrat, $\geq 99\%$	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\geq 99,5\%$	AppliChem
Malzextrakt	Sigma-Aldrich
Mangansulfat-Monohydrat, p.a.	AppliChem
Milchpepton	Symrise
Milchprotein	Symrise
Natriumchlorid, $> 99,8\%$	Carl Roth
Pepton aus Gelatine	Sigma-Aldrich
Saccharose, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Saubohnenpepton	Sigma-Aldrich
Sojapepton	Sigma-Aldrich
Sojaprotein	Symrise
D-Sorbitol, $\geq 98\%$	Carl Roth
D-(+)-Xylose, $\geq 99\%$	Carl Roth
Zinksulfat-Heptahydrat, p.a.	AppliChem

Experimenteller Teil

Tabelle 7: Sonstige Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Aceton, > 99,8%	Carl Roth
Acetonitril, $\geq 99,95\%$	Actu-All Chemicals (Randmeer, NL)
Adenosintriphosphat (ATP)-Natriumsalz, 100 mM	Jena Bioscience (Jena)
Agarose	Biozym Sc. (Hessisch Oldendorf)
Ameisensäure, 98%	Bernd Kraft
Ammoniumperoxodisulfat (APS), $\geq 99\%$	Carl Roth
Benzophenon, 99%	Sigma-Aldrich
Bortrifluorid (20%, methanolische Lösung)	VWR
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth
<i>tert</i> -Butylmethylether (<i>t</i> -BME)	Evonik Industries (Essen)
Calciumchlorid (wasserfrei)	Bernd Kraft
Calciumchlorid-Dihydrat, Ph. Eur.	VWR
Chloramphenicol, $\geq 98,5\%$	Carl Roth
Chloroform-d mit Tetramethylsilan (TMS, 0,03% (v/v)), 99,8% Atom%D	Carl Roth
Coomassie Brilliantblau R250	AppliChem
Decansäure, > 99%	Carl Roth
Dec-9-en-1-ol, > 99%	Sigma-Aldrich
Dec-9-ensäure, > 99%	TCI
Dess-Martin-Periodinan, 97%	Fluorochem (Hadfield, UK)
Dichlormethan, HPLC-grade	Th. Geyer
Diethylether, 99,5% ^a	BCH (Brühl)
Dimethylsulfoxid (DMSO), 99,5%	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, $\geq 99,5\%$	Carl Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT), $\geq 99\%$	Carl Roth
Dodec-11-ensäure, > 99%	Nu-Chek Prep (Elysian/MN, USA)
Dodec-11-ensäuremethylester, > 99%	Nu-Chek Prep
Ethanol, $\geq 99,5\%$	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat, $\geq 99\%$	Carl Roth
Essigsäure, 100%	Carl Roth
Glycerol, 99,5%	VWR
Glycin, $\geq 99\%$	Carl Roth
<i>Gummi arabicum</i>	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Heptan, 99%	Bernd Kraft
Hept-6-ensäure, > 95%	Sigma-Aldrich
(6Z)-Hexadec-6-ensäure, 99%	Matreya LLC
<i>n</i> -Hexan, 97%	Honeywell (Charlotte/NC, USA)
Imidazol, $\geq 99,5\%$	Carl Roth
L-Isoleucin, $\geq 99\%$	Carl Roth
Isooctan, $\geq 99,8\%$	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), $\geq 99\%$	Serva
Kaliumacetat, reinst	AppliChem

Experimenteller Teil

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Substanz	Hersteller
Kaliumchlorid, ≥ 98%	Carl Roth
Kaliumhydroxid, ≥ 85%	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, 98%	Th. Geyer
Kanamycinsulfat	Serva
Kieselgel 60	Macherey-Nagel (Düren)
Laurinsäure, > 98%	Cayman CC
Laurinsäure-1- ¹³ C, 99 atom% ¹³ C	Sigma-Aldrich
Linolsäure, ≥ 99%	Acros Organics
Lithiumaluminiumhydrid, p.a.	Merck
Magnesiumchlorid	AppliChem
β-Mercaptoethanol, ≥ 99%	Carl Roth
L-Methionin, ≥ 99%	Carl Roth
Midori Green Direct	Nippon Genetics (Düren)
Myristinsäure, 99%	Acros Organics
Myristoleinsäure, ≥ 99%	Sigma-Aldrich
Natrium, ≥ 99%	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid, > 99,8%	Carl Roth
Natriumdithionit, p.a.	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 96%	AppliChem
Natriumhydrogencarbonat, > 99,7%	Th. Geyer
Natriumhydroxid, ≥ 98%	Carl Roth
Natriumsulfat (wasserfrei), ≥ 99%	Carl Roth
Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 99%	Carl Roth
Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Tetranatriumsalz	neoFroxx (Einhausen)
Nonansäuremethylester, > 99,8%	Sigma-Aldrich
Non-8-en-1-ol, > 99%	TCI
Octansäure, ≥ 99,5%	Carl Roth
Oct-7-en-1-ol, 98%	ABCR
Ölsäure, ≥ 99%	Sigma-Aldrich
Palmitinsäure, 98%	Acros Organics
Palmitoleinsäure, 99%	Acros Organics
Pentadecansäure, 99%	Acros Organics
Pentadec-14-ensäure, > 99%	Nu-Chek Prep
n-Pentan, 99%	Th. Geyer
Petrolether, niedrig siedend [35–65 °C]	Thermo Fisher (Waltham/MA, USA)
2-Propanol, ≥ 99,8%	Carl Roth
Roti® Nano-Quant, 5x Konzentrat	Carl Roth
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth
Protino Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA) Agarose	Macherey-Nagel
Salzsäure, 37%	Carl Roth
Schwefelsäure, 98%	Carl Roth
Stearinsäure, ≥ 98%	Carl Roth

Experimenteller Teil

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Substanz	Hersteller
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem
L-Threonin, ≥ 98%	Acros Organics
Tridecansäure, 99%	Sigma-Aldrich
Tridec-12-ensäure, > 99%	Nu-Chek Prep
1,2,3-Trinonanoylglycerol, 99,0%	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), ≥ 99,9%	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl), ≥ 99,9%	Carl Roth
Triton X-100®	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
Undecansäure, 99%	Acros Organics
Undec-10-en-1-ol, 100%	Acros Organics
Undec-10-enal, > 99%	Acros Organics
Undec-10-ensäure, 100%	Alfa Aesar
L-Valin, ≥ 99%	AppliChem

^a wurde vor Verwendung für Synthesen oder Säulenchromatographie mittels Rotationsverdampfer vom enthaltenen Stabilisator abgetrennt; bei Verwendung als *n*-Pentan/Diethylether-Mischung (1:1,12 (v/v)) wurde die Mischung destilliert und nach Einengen mittels Vigreux-Kolonne (43 °C) per GC-MS auf Reinheit überprüft

Tabelle 8: Gase.

Gas	Hersteller
Helium, 5.0	Praxair (Ratingen)
Stickstoff, 5.0	Air Liquide (Paris, FR)
Wasserstoff, 5.0	Praxair

2.1.2 Biochemische und molekularbiologische Materialien

2.1.2.1 Plasmide und Primer

Für die Klonierungen der CAR kodierenden Gensequenz aus *Mycobacterium marinum* (MmCAR) wurde der pACYCDuet-Vektor, für die Gensequenzen der α -DOX aus *Crocospaera subtropica* (*Cs* α -DOX) und *Oryza sativa* (*Os* α -DOX) das Plasmid pET28a genutzt (Tabelle 9).

Experimenteller Teil

Tabelle 9: Gen-Konstrukte zur Enzymexpression.

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
pACYCDuet-MmCAR-BsSfp (Abbildung 4)	Expressionsvektor (8.191 bp), Chloramphenicol-Resistenz, CAR-Gen aus <i>Mycobacterium marinum</i> sowie Phosphopantetheinyl-Transferase aus <i>Bacillus subtilis</i> als Insert zwischen BamHI und AflII, beide in <i>multiple cloning side 1</i>)	zur Verfügung gestellt von der Universität Greifswald (Arbeitsgruppe Prof. Uwe Bornscheuer)
pET28a(+)	Expressionsvektor (5.369 bp), Kanamycin-Resistenz	Merck
pET28a-Cs α -DOX (Abbildung 5)	Expressionsvektor (7.033 bp), Kanamycin-Resistenz, α -DOX-Gen aus <i>Crocospaera subtropica</i> als Insert zwischen NcoI und XhoI	GeneArt (Regensburg), zur Verfügung gestellt vom DECHEMA-Forschungsinstitut (Frankfurt/Main)
pET28a-Cs α -DOX_C-His (Abbildung 6)	Expressionsvektor (7.030 bp), Kanamycin-Resistenz, α -DOX-Gen aus <i>Crocospaera subtropica</i> als Insert zwischen NcoI und XhoI	siehe 2.7.2.4
pET28a-Hok-Os α -DOX (Abbildung 7)	Expressionsvektor (7.760 bp), Kanamycin-Resistenz und Hok/Sok-System, α -DOX-Gen aus <i>Oryza sativa</i> als Insert zwischen NheI und Sall	zur Verfügung gestellt von Symrise (Holzminden)

Die Plasmide pACYCDuet-MmCAR-BsSfp (Abbildung 4) und pET28a-Hok-Os α -DOX (Abbildung 7) kodierten für die MmCAR bzw. Os α -DOX. Die Expressionsstämme RARE (MmCAR) bzw. W3110(DE3) (Os α -DOX) lagen bereits mit den entsprechenden Plasmiden transformiert vor. Sie wurden von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Der Expressionsvektor pET28a-Cs α -DOX_C-His (Abbildung 6) kodierte für die α -DOX aus *Crocospaera subtropica* und unterschied sich durch das Vorhandensein eines C-terminalen His-Tags vom Expressionsvektor pET28a-Cs α -DOX (Abbildung 5). Er wurde mit Hilfe der in Tabelle 10 enthaltenen *Primer* mittels *QuikChange*TM aus dem zuletzt genannten Plasmid erstellt (2.7.2.4). Die weiteren gelisteten *Primer* dienten einer Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Klonierungskontrolle (2.7.2.3). Die in den Plasmiden enthaltenen Antibiotika-Resistenzen sowie das Hok/Sok-System dienten als Selektionsmarker.

Experimenteller Teil

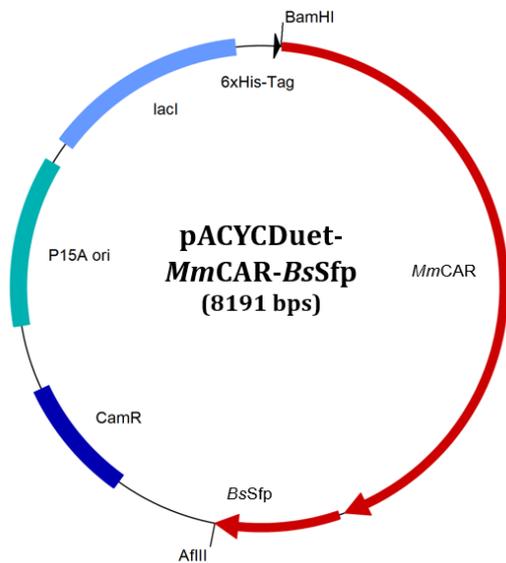


Abbildung 4: Plasmidkarte des Plasmids *pACYCDuet-MmCAR-BsSfp* mit *MmCAR*-Gen aus *Mycobacterium marinum* mit *N*-terminalem His-Tag (6xHis-Tag) sowie Phosphopantetheinyl-Transferase aus *Bacillus subtilis* (*BsSfp*), Replikationsursprung (*P15A ori*), Chloramphenicol-Resistenz (*CamR*) und *lac* Repressor (*lacI*).

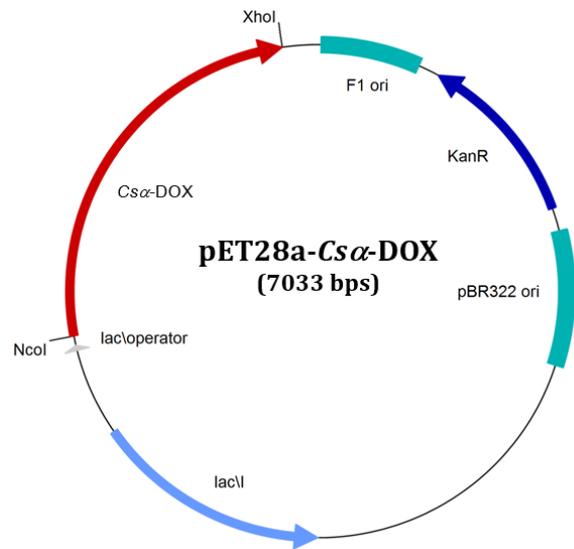


Abbildung 5: Plasmidkarte des Plasmids *pET28a-Csα-DOX* mit *Csα-DOX*-Gen aus *Crocospheara subtropica*, Replikationsursprung (*F1 ori*), Kanamycin-Resistenz (*KanR*), Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (*pBR322 ori*) und *lac* Repressor (*lacI*).

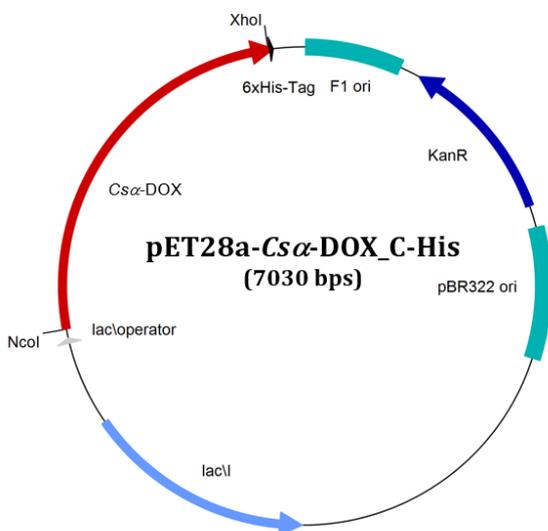


Abbildung 6: Plasmidkarte des Plasmids *pET28a-Csα-DOX_C-His* mit *Csα-DOX*-Gen aus *Crocospheara subtropica* mit *C*-terminalem His-Tag (6xHis-Tag), Replikationsursprung (*F1 ori*), Kanamycin-Resistenz (*KanR*), Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (*pBR322 ori*) und *lac* Repressor (*lacI*).

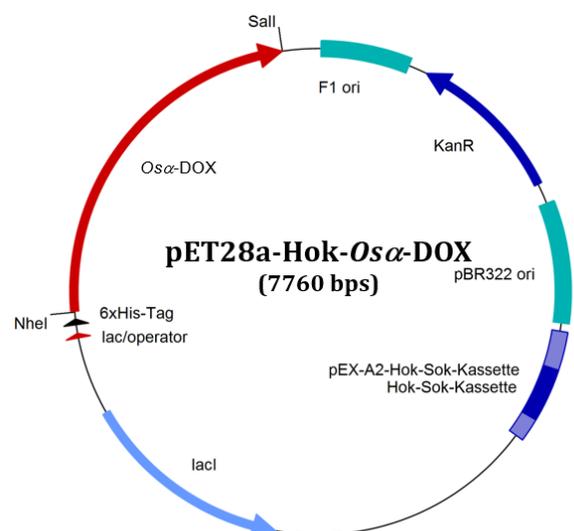


Abbildung 7: Plasmidkarte des Plasmids *pET28a-Hok-Osα-DOX* mit *Osα-DOX*-Gen aus *Oryza sativa* mit *N*-terminalem His-Tag (6xHis-Tag), Replikationsursprung (*F1 ori*), Kanamycin-Resistenz (*KanR*), Regulator für die Kopienzahl in der Zelle (*pBR322 ori*), *Hok-Sok*-Kassette und *lac* Repressor (*lacI*).

Experimenteller Teil

Tabelle 10: Zur Kolonie-PCR und QuikChange™ genutzte Primer.

Primer mit Sequenz	Hersteller
<i>Csα</i> -DOX Forward-Primer 5'-GGA GAT ATA CCA TGG GAA TCT TCG-3'	Biomers (Ulm)
<i>Csα</i> -DOX Reverse-Primer 5'-CAG TGC AAT ATC GGT TGC AG-3'	Biomers
<i>Csα</i> -DOX QuikChange™ Forward-Primer 5'-TCG TGT TCC GAG CCT CGA GCA CCA CC-3'	Biomers
<i>Csα</i> -DOX QuikChange™ Reverse-Primer 5'-GGT GGT GCT CGA GGC TCG GAA CAC GA-3'	Biomers

2.1.2.2 Weitere biochemische Materialien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diverse kommerziell erhältliche Enzyme (Tabelle 11) sowie Kits (Tabelle 12) verwendet. Weitere genutzte Materialien finden sich in Tabelle 13.

Tabelle 11: Kommerziell erhältliche Enzyme.

Enzym	Hersteller
Lipase (Rhizolipase) aus <i>Candida rugosa</i> (2.9 U/mg)	Fluka Analytical
Lysozym, ≥ 35.000 FIP-U/mg	Carl Roth
Phusion DNA-Polymerase	New England BioLabs (Ipswich/MA, USA)
Restriktionsenzym DpnI	Thermo Fisher
Restriktionsenzym XhoI	Thermo Fisher
Restriktionsenzym NdeI	Thermo Fisher

Tabelle 12: Biochemische Kits.

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
FastGene® Plasmid Mini Kit	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	Nippon Genetics
NucleoSpin® Plasmid Kit	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	Macherey-Nagel
Opti-4CN™ Substrat Kit	Entwicklung des <i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories (Feldkirchen)
Plasmid Midiprep Kit	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	Thermo Fisher

Tabelle 13: Sonstige biochemische Materialien.

Material	Hersteller
Antikörperlösung Meerrettichperoxidase (Anti-His HRP)	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA), 98%, Albumin Fraktion V	Carl Roth
DNA-Leiter (1 kbp)	Carl Roth
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher
<i>Fast Digest</i> (FD)-Puffer (10x)	Thermo Fisher
<i>High Fidelity</i> (HF)-Puffer (10x)	New England BioLabs

Experimenteller Teil

Tabelle 13 (Fortsetzung)

Material	Hersteller
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth
Phusion GC-Reaktionspuffer	New England BioLabs
Proteinmarker Blue Star, prestained (10–180 kDa)	Nippon Genetics
Proteinmarker PageRuler™, unstained (10–200 kDa)	Thermo Fisher
Reaktionsgefäße mit Hämolyselösung	EKF Diagnostics (Barleben)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 14 enthält das genutzte Verbrauchsmaterial.

Tabelle 14: Verbrauchsmaterial.

Material	Hersteller
Cellulose Extraktionshülsen, 33 x 80 mm	Lab Logistics Group LLG (Meckenheim)
Cellulose-Rundfilter (D 110 mm)	Lab Logistics Group LLG
Chromabond Säule, 50 mL, PP, 30/115 mm	Greiner Bio-One (Kremsmünster, A)
CryoPure Gefäß, 1,6 mL	Starstedt (Nümbrecht)
Direktverdränger-Pipette (Handy-Stepper)	Brand (Wertheim)
Einmalkanüle, Fine-Ject®, 0,6 x 30 mm	Henke Sass Wolf (Tuttlingen)
Feingewindeschraubkappe ND18	Th. Geyer
Gewindeflasche, 4 mL, Braunglas	Agilent Technologies (Waldbronn)
Gewindeflasche, 4 mL, Klarglas	Wicom (Heppenheim)
Gewindeflasche mit G18 Feingewinde, 20 mL, Klarglas	Wicom
Gewindeflasche mit ND18 Feingewinde, 20 mL, Klarglas	Th. Geyer
Glasfaserfilter (D 90 mm)	Satorius (Göppingen)
Küvetten (Polystyrol), 1,5 mL	Sarstedt
Küvette (Quarzglas)	Hellma (Müllheim)
Kurzgewindeflasche, 1,5 mL, Klarglas	Lab Logistics Group LLG
Kurzgewindeflasche mit integriertem Mikroeingang, Braunglas	Th. Geyer
Mehrfachmagnetruhrer für Twister™, Variomag Telesystem	Thermo Fisher
Mikro-Einsatz, 100 µL für 2 mL-Schraubvials	VWR
Mikro-Einsatz, 250 µL für 2 mL-Schraubvials	Wicom
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
Mikrotiterplattenfolie, PE, 50 µm	Carl Roth
NMR-Röhrchen	Th. Geyer
PCR-Platten (<i>Multiplate Low-Profile</i>)	Bio-Rad Laboratories
Pierce Centrifuge Column, 10 mL	Thermo Fisher
PD-10 Säule, Sephadex™ G-25 M	GE Healthcare (Solingen)
Pipettenspitzen, 2–200 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen, 100–1000 µL	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen, 1000–5000 µL	Brand

Experimenteller Teil

Tabelle 14 (Fortsetzung)

Material	Hersteller
Präzisions-Dispenser-Tips, 0,1–50 mL	Brand
PCR-Reaktionsgefäße	Nippon Genetics
Petrischalen (D 90 mm)	Greiner Bio-One
Probenschalen (Alu-Wägeteller) (D 90 mm)	Korff (Oberbipp, CH)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (PG 0,45 µm)	Carl Roth
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 mL	Brand
Rollrand-Schnappdeckelglas (50 x 30 mm)	IDL Laborbedarf (Nidderau)
Schraubkappe mit Loch (18 mm, magnetisch)	Wicom
Schraubkappe für Kurzgewindeflasche, mit Butylgummi/PTFE-Septum	Wicom
Schraubkappe für Kurzgewindeflasche, mit Gummi/PTFE-Septum	Lab Logistics Group LLG
Schraubkappe für 4 mL-Gewindeflaschen, geschlossen	Carl Roth
Schraubvial mit Kurzgewinde, 2 mL, Klarglas	Wicom
Siedesteinchen, Typ A	Gerhardt (Königswinter)
Spritzenfilter (CME, PG 0,22 µm, steril)	Carl Roth
Zentrifugenfilter, 50 kDa	Merck
Zentrifugenfilter, 100 kDa	Merck
Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Greiner Bio-One

2.1.4 Mikroorganismen

2.1.4.1 Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmiden und heterologen Enzymexpression wurden *E. coli*-Stämme diverser Anbieter genutzt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Verwendete Bakterien mit Eigenschaften und Bezugsstellen.

Stamm	Verwendung	Anbieter
<i>E. coli</i> 10β	Vervielfältigung der Plasmide pET28a-Csα-DOX und pET28a-Csα-DOX_C-His (2.7.2)	New England Biolabs
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression Csα-DOX (2.7.3)	Merck
<i>E. coli</i> MG1655 RARE ^a	Expression MmCAR (2.7.4)	Universität Greifswald
<i>E. coli</i> W3110(DE3) ^a	Expression Osα-DOX (2.7.3)	Symrise

^a Beide Stämme lagen bereits mit den entsprechenden Plasmiden (2.1.2.1) transformiert als fertige Klone zur Expression vor.

2.1.4.2 Pilze

Die verwendeten Pilze (Tabelle 16) wurden von Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Natur isoliert (LCB) oder über eines der folgenden Institute bezogen: Westerdijk Fungal Biodiversity

Experimenteller Teil

Institute (Utrecht, Niederlande, CBS), Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, DSM), Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt (Frankfurt am Main, FSI), Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, HZI) bzw. LOEWE Schwerpunkt Integrative Pilzforschung (Frankfurt am Main, IPF). Die Bezugsstellen der einzelnen Organismen sind anhand des Buchstaben-Codes der jeweiligen Stammmummern ersichtlich.

Tabelle 16: *Verwendete Pilze, Bezeichnungen, Isolationssubstrat und -ort.*

Organismus	Abkürzung	(Unter-) Abteilung^a	Stammnummer	Isolationssubstrat und -ort
<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE3	Basidio	LCB 279	unbekannt
<i>Cercospora zeina</i>	CZE	Asco	CBS 118820	Mais, Pietermaritzburg, ZAF
<i>Clitocybe odora</i>	COD	Basidio	HZI 13334	unbekannt
<i>Conidiobolus heterosporus</i>	CHET-N	Ento	CBS 333.74	Kulturboden, Leiden, NL
<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-D	Basidio	DSM 1658	Rotbuche, Deutschland
<i>Fomes fomentarius</i>	FFO	Basidio	LCB 167	Deutschland
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPI-D	Basidio	DSM 3521	unbekannt
<i>Ganoderma applanatum</i>	GAP	Basidio	DSM 3800	Humboldt-Weide, ARG
<i>Ganoderma lucidum</i>	GLU	Basidio	DSM 3515	unbekannt
<i>Inonotus radiatus</i>	INRA	Basidio	IPF	unbekannt
<i>Lachneum virgineum</i>	LVI-FP	Asco	LCB 468	Deutschland
<i>Laetiporus sulfureus</i>	LSU	Basidio	DSM 1014	unbekannt
<i>Lentinula edodes</i>	LED	Basidio	CBS 389.89	unbekannt
<i>Lycoperdon perlatum</i>	LPE	Basidio	DSM 3502	unbekannt
<i>Macrolepiota excoriata</i>	MEX	Basidio	CBS 112.18	Deutschland
<i>Macrolepiota procera</i>	MPR	Basidio	LCB 202	Deutschland
<i>Morchella esculenta</i>	MES	Asco	DSM 10370	unbekannt
<i>Mortierella alpina</i>	MAL-FP	Mucor	LCB 240	Gießen
<i>Mortierella hyalina</i>	MHY-FP	Mucor	LCB 243	Gießen
<i>Mortierella isabellina</i>	MIS	Mucor	DSM 1414	British Columbia, CA
<i>Mortierella sp.</i>	MSP	Mucor	LCB 473	Reiskriehen
<i>Mycetinis scorodonius</i>	MSC	Basidio	CBS 137.83	immergrüne Bärentraube, Ticino, CH
<i>Neonectria faginata</i>	NFA	Asco	CBS 151.92	Berchtesgaden
<i>Panellus stipticus</i>	PSTI	Basidio	LCB 203	Deutschland
<i>Phellinus igniarius</i>	PIG-F	Basidio	LCB 210	Deutschland
<i>Piptoporus betulinus</i>	PBE	Basidio	LCB 201	Deutschland
<i>Pleurotus dryinus</i>	PDR	Basidio	DSM 5178	Tschechien
<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	Basidio	DSM 8264	unbekannt
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POS	Basidio	DSM 1020	unbekannt
<i>Polyporus squamosus</i>	POSQ	Basidio	CBS 426.48	Ottawa/ON, CA
<i>Psathyrella piluliformis</i>	PPI	Basidio	LCB 223	Deutschland

Experimenteller Teil

Tabelle 16 (Fortsetzung)

Organismus	Abkürzung	(Unter-) Abteilung ^a	Stammnummer	Isolationssubstrat und -ort
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	PCIN	Basidio	DSM 1184	Laubbaum
<i>Pycnoporus coccineus</i>	PYCO	Basidio	CBS 355.63	Baumstamm, Bougainville, SLB
<i>Rhizopus azygosporus</i>	RAZ	Mucor	CBS 357.93	Tempeh, Bogor/Java, ID
<i>Stereum hirsutum</i>	SHI	Basidio	FSU 10130	unbekannt
<i>Stereum rugosum</i>	STRU	Basidio	DSM 5183	Rotbuche, D
<i>Trametes versicolor</i>	TVE	Basidio	LCB 7	unbekannt
<i>Wolfiporia cocos</i>	WCO-C	Basidio	CBS 279.55	Walhalla/SC, USA

^a Asco = Ascomycota, Basidio = Basidiomycota, Ento = Entomophthoromycotina, Mucor = Mucoromycotina

2.1.5 Geräte und Zubehör

2.1.5.1 Gaschromatographie

Zur gaschromatographischen Analyse wurden verschiedene Systeme (Tabelle 17) genutzt, wobei diverse Trennsäulen (Tabelle 18), Fasern zur SPME (Tabelle 19) und weiteres gaschromatographisches Zubehör (Tabelle 20) Anwendung fanden.

Tabelle 17: Gaschromatographische Systeme.

Kurzbezeichnung	GC-System	Autosampler und Detektor(en)	Hersteller
GC-FID	7890A		Agilent Technologies
		7683B Sampler	Agilent Technologies
		Flammenionisationsdetektor (FID)	Agilent Technologies
GC-FID-O	7890A		Agilent Technologies
		G4513A Sampler	Agilent Technologies
		FID	Agilent Technologies
		Olfactory Detection Port (ODP) 3	Gerstel (Mülheim a. d. Ruhr)
GC-MS I	7890A		Agilent Technologies
		MultiPurpose Sampler (MPS) 2XL	Gerstel
		5975C VL Mass Selective Detector (MSD)	Agilent Technologies
GC-MS II	7890B		Agilent Technologies
		MPS robotic	Gerstel
		5977B MSD	Agilent Technologies
GC-MS/MS-O	7890A		Agilent Technologies
		MPS 2XL	Gerstel
		ODP3	Gerstel
		QQQ 7000B Triple Quadrupole	Agilent Technologies

Experimenteller Teil

Tabelle 18: Gaschromatographische Trennsäulen.

Bezeichnung	Material	Polarität	Maße (Länge, Innendurchmesser, Filmdicke)	Hersteller
DB-5ms	(5%-Phenyl)- methylpolysiloxan	unpolar	30 m x 250 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
HP-5	(5%-Phenyl)- methylpolysiloxan	unpolar	30 m x 320 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
HP-INNOWax	Polyethylenglycol	polar	30 m x 320 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
Select FAME	3-Cyanopropyl- polysiloxan	polar	100 m x 250 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
VF-WAXms	Polyethylenglycol	polar	30 m x 250 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
VF-WAXms	Polyethylenglycol	polar	30 m x 320 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies

Tabelle 19: SPME-Fasern mit Angaben zum Coating-Material.

Faserbeschichtung	Farb-Code	Schichtdicke [µm]	Modell	Hersteller
Divinylbenzen/Carboxen/ Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)	grau	50/30	57298-U, StableFlex, 23 Ga, Autosampler	Supelco
PDMS/DVB	pink	65	57293-U, StableFlex, 23 Ga, Autosampler	Supelco
CAR/PDMS	hellblau	85	57295-U, StableFlex, 23 Ga, Autosampler	Supelco
PDMS	rot	100	57928-U, Metal alloy, 23 Ga, Autosampler	Supelco
Carbowax (CW) (Polyethylenglycol)	lila	60	57354-U, Metal alloy, 23 Ga, Autosampler	Supelco

Tabelle 20: Weiteres gaschromatographisches Zubehör.

Material	Nähere Bezeichnung	Hersteller
Flüssigliner	Focusliner®, 4 mm ID	SGE Analytical Science (Crownhill, UK)
GC-Spritze für GC-FID	10 µL	SGE
GC-Spritze für GC-FID-O	Gold Standard Syringe, 5 µL	Agilent
GC-Spritze für GC-MS-Systeme	10 µL (10-Gn-Mf-T)	Gerstel
SPME-Liner	Direct (SPME) Type, Straight Design (unpacked)	Supelco

2.1.5.2 Sonstige Geräte

Neben den gaschromatographischen Systemen kam eine Reihe weiterer Gerätschaften zum Einsatz (Tabelle 21).

Experimenteller Teil

Tabelle 21: Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik (Schloss Detzel)
Autoklav Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik
Avance II NMR 400 MHz	Bruker (Billerica/MA, USA)
Avance III NMR 400 MHz HD	Bruker
Avance III NMR 600 MHz	Bruker
CHN-Analysator, FlashEA – 1112 Series	Thermo Fisher
Direktverdränger-Pipette Handystep S	Brand
Feinwaage Adventurer AX224	Ohaus Europe (Greifensee, CH)
Feinwaage BP 211D	Sartorius
Feinwaage Si-234A	Denver Instrument (Denver/CO, USA)
Feuchtebestimmer MA35	Sartorius
Gefriertrockner Alpha 1-2 LD plus	Christ (Osterode am Harz)
Geldokumentation DeVision DBOX mit UV-Transilluminator	Decon Science Tec (Hohengandern)
Gelscanner Bio 5000 MICROTEK	Serva
Glucose-Analysator Biosen C-Line	EKF-Diagnostics
Grobwaage Atilon AccuLab	Satorius
Inkubationsschrank IPP 5000	Memmert (Schönaich)
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors (Einsbach)
Inkubationsschüttler Minitron	Infors
Inkubationsschüttler Orbitron	Infors
Inkubationsschüttler ES-80	Grant Instruments (Shepreth, UK)
Kälte-Umwälzthermostat Minichiller®	Peter Huber Kältemaschinenbau (Offenburg)
Kolbenhubpipetten S20, S200, S1000	Brand
Kolbenhubpipette Research 5000	Eppendorf (Hamburg)
Mikrotiterplatten-Lesegerät Synergy™ 2 Multi-Mode	Biotek Instruments (Bad Friedrichshall)
Nanophotometer Perl	Implen (München)
Ofen Bosch HCE8544.0	Robert Bosch Haushaltsgeräte (Stuttgart)
PCR-Cycler CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad
PCR-Cycler T100	Bio-Rad
PerfectBlue™ Tank Electro Blotter Web™ S	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter Seven-Easy	Mettler-Toledo (Gießen)
Probenkonzentrierer	Stuart (Staffordshire, UK)
Photometer UV-Line 9400	Schott Instruments (Mainz)
Reinstwasseranlage Sartorius Arium 611VF	Satorius
Rollinkubator RS-TR05	Phoenix Instruments (Garbsen)
Rotationsinkubator Rotator SB3	Stuart
Rotationsverdampfer Rotavapor R-300	Büchi (Flawil, CH)
Sauerstoffsensoren NTH-PSt1-L2.5-TS-NS40/1.2-NOP	PreSens (Regensburg)
Soxtherm®-Extraktionseinheit SOX 416 Makro	Gerhardt
Stereomikroskop S9i	Leica (Wetzlar)
Sterilwerkbank SAFE 2020	Thermo Fisher
Sterilwerkbank HERAsafe KS18	Thermo Fisher

Experimenteller Teil

Tabelle 21 (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Thermoraum	Viessmann (Allendorf)
TripleTOF 5600+ (APCI-TOF-MS)	ABSciex (Darmstadt)
Ultraschall-Sonde MS72 mit Netzteil Sonopuls HD 2070	Bandelin Electronic (Berlin)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H	Bandelin Electronic
Ultratiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Fisher
Ultraturrax-Dispergierstab T25	IKA (Staufen)
Zentrifuge Allegra X-15-R	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge (Microfuge) 22R	Beckman Coulter

2.2 Software und Datenbanken

Zur Dokumentation und zur Auswertung der generierten Daten wurden unterschiedliche Software und diverse Datenbanken herangezogen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Software und Datenbanken.

Software/Datenbank	Verwendungszweck	Hersteller/Anbieter
Analyst TF 1.7.1 und PeakView 2.2	Auswertung der monoisotopischen Massen von Syntheseprodukten	ABSciex
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Steuerung/Auswertung zum PCR-Cycler CFX Connect™ <i>Real-Time</i> System	Bio-Rad
Chemstation	Auswertung von Chromatogrammen (GC-FID-Systeme)	Agilent Technologies
DeVision G	Gel-Dokumentation mittels DeVision DBOX	Decon Science Tec
ExpASy ProtParam-Tool	Kalkulationen von Protein-Parametern	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, CH)
Gen5	Photometer-Software des Mikrotiterplatten-Lesegeräts	BioTek
Leica Application Suite (LAS) X version 3.0.11.20652	Stereomikroskop-Software	Leica
MassHunter Qualitative Analysis MassHunter Quantitative Analysis	Auswertung von Chromatogrammen und Massenspektren (GC-MS-Systeme)	Agilent Technologies
MestReNova Version 12.0.4-22023	Auswertung von NMR-Spektren	Mestrelab Research (Santiago de Compostela, ES)
NIST Mass Spectral Library (NIST 14)	Datenbank zum Abgleich von Massenspektren	National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg/MD, USA)
OriginPro version 2020	Kalkulation Michaelis-Menten Kinetik	OriginLab Corporation (Northampton/MA, USA)
OxyView TX3v602	Sauerstoffmessung mittels Sauerstoffsonde	PreSens
ScanWizard Bio	Gel-Dokumentation mittels Bio 5000 MICROTEK	Serva
Universal Protein Resource UniProt	Datenbank zum Abgleich von Protein-Sequenzen	UniProt Consortium ^a

^a The UniProt Consortium (2019)

2.3 Kulturführung von Pilzen:

Screening mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren

2.3.1 Zusammensetzung der Nährmedien

Die Nährmedienbestandteile (Tabelle 23) wurden mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf ihr entsprechendes Volumen aufgefüllt und autoklaviert (121 °C, 20 min). Sofern die Nährmedien Glucose enthielten, wurde diese separat von den restlichen Medienbestandteilen als wässrige Lösung autoklaviert, nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen mit dem restlichen Medium vermischt und mit autoklaviertem VE-Wasser auf 1 L aufgefüllt. Zur Herstellung von festen Nährmedien für die Emerskultivierung wurde den jeweiligen Medien vor der Sterilisation Agar (15 g/L) zugesetzt und das noch warme Medium wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen (etwa 25 mL/Platte).

Tabelle 23: Nährmedien-Zusammensetzungen.

Medienbestandteil	Konzentration [g/L]	Medienbestandteil	Konzentration [g/L]
Malzextrakt-Medium (ME)		Hefeextrakt-Glucose-Medium (YD)	
Malzextrakt	20	Hefeextrakt	10
		Glucose-Monohydrat	22
Malzextrakt-Pepton-Medium (MEP)		Kartoffelextrakt-Glucose-Medium (PD)	
Malzextrakt	30	Kartoffelextrakt	4
Sojapepton	3	Glucose-Monohydrat	22
Einstellung vor dem Autoklavieren mit 0,1 M HCl auf pH 5,6		Einstellung vor dem Autoklavieren mit 0,1 M NaOH auf pH 6,6	
Hefeextrakt-Malzextrakt-Medium (YM)			
Hefeextrakt	3		
Malzextrakt	30		

2.3.2 Stammhaltung

Mittels Korkbohrer wurden vom äußeren Rand einer zu ca. 80% bewachsenen Agarplatte 10 Myzelstücke (5 mm Durchmesser) ausgestant und in ein steriles 2 mL-Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte entweder bei 4 °C im Kühl-, bei –80 °C im Tiefkühlschrank oder in flüssigem Stickstoff. Für die Lagerung bei 4 °C wurde zu den Agarstücken 1 mL Wasser hinzugegeben. Für die Lagerung bei –80 °C sowie in flüssigem Stickstoff wurde stattdessen 1 mL

Glycerol (10%, v/v) als Gefrierschutz verwendet. Zur Kultivierung (2.3.3) wurde bei Bedarf ein Myzelstück auf eine frische Agarplatte überführt.

2.3.3 Kulturführung auf Agar-Platten (emers)

Ausgehend von der Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie (2.3.2) wurden die Pilze auf Agarplatten unterschiedlicher Zusammensetzung (2.3.1) kultiviert. Die Wahl der Nährmedien erfolgte auf Grundlage von Lieferantenempfehlungen (2.1.4.2) oder, im Falle institutseigener Isolate, Erfahrungswerten (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zur Anzucht der jeweiligen Pilze genutzte Nährmedien.

ME-Agar	MEP-Agar	PD-Agar	YD-Agar	YM-Agar
AAE3, FVE-D, FFO, FPI-D, GAP, LVI-FP, LSU, LED, MEX, MES, MSC, PER, POS, POSQ, PCIN, PYCO, RAZ, TVE, WCO-C	COD, GLU, INRA, LPE, MPR, NFA, PSTI, PIG-F, PBE, PDR, PPI, SHI, STRU	CZE	MSP, MAL-FP, MHY-FP, MIS	CHET-N

Ein frisches, ca. 1 cm² großes Myzelstück wurde mittig auf einer neuen Agarplatte platziert, die Petrischale mit Parafilm® verschlossen und bei 24 °C im dunklen Brutschrank inkubiert. Sobald die Platte zu ca. 80% bewachsen war, wurde der Pilz auf eine neue Agarplatte umgesetzt bzw. Vorkulturen angelegt (2.3.4).

2.3.4 Vorkulturführung (submers)

Für die submers geführten Vorkulturen wurden die jeweiligen Nährmedien der Emerskulturen (2.3.3) verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurde ein mit 200 mL Nährmedium befüllter 500 mL-Erlenmeyerkolben mit zwei 1 cm² großen Myzelstücken aus dem äußeren Rand der Wachstumszone einer Emerskultur inokuliert. Die Stücke wurden mittels Ultraturrax-Dispergierstab zerkleinert (30 s, 10.000 U/min) und die Vorkulturen im Anschluss bei 24 °C und Dunkelheit auf einem Inkubationsschüttler inkubiert (150 U/min, Auslenkung 25 mm).

2.3.5 Hauptkulturführung (submers)

Die Vorkulturen (2.3.4) wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Ultraturrax-Dispergierstab homogenisiert (30 s, 10.000 U/min). Jeweils 40 mL der resultierenden Suspensionen wur-

den als Inokulum verwendet und zu 400 mL frischem Nährmedium (Zusammensetzung entsprechend dem jeweiligen Nährmedium der Emers- bzw. Vorkultur) in einem 1 L-Erlenmeyerkolben hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte analog der Vorkultur. Von jedem Pilz wurden mindestens drei Hauptkulturen angelegt.

2.3.6 Kulturente und Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Myzelernte der Hauptkulturen (2.3.5) erfolgte nach ausreichendem Bewuchs (optische Abschätzung). Die Pilzmyzelien wurden per Vakuumfiltration mittels eines Büchnertrichters (Durchmesser 110 mm, Cellulosefilter) vom Nährmedium abgetrennt, mit ca. 0,5 L VE-Wasser gewaschen und bei -20 °C eingelagert.

Abweichend von diesem Verfahren wurden die Myzelien von AAE3, GAP, INRA, LPE, NFA, PSTI und PDR abzentrifugiert (3724 g , 20 °C), mehrmals mit VE-Wasser gewaschen und anschließend ebenfalls tiefgefroren.

Im Anschluss wurden alle Myzelien für mindestens 48 h gefriergetrocknet ($0,37\text{ mbar}$, -30 °C) und zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) die mittels Infrarot-Feuchtebestimmer ermittelte Restfeuchte mit dem Gewicht des Lyophilisats verrechnet.

2.4 Einfluss bestimmter Parameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren

Nachfolgend wird die Variation diverser Kulturparameter für die Kultivierung von FVE-D und MHY-FP beschrieben. Die Vorkulturen wurden ausgehend von Emerskulturen auf ME- (FVE-D) bzw. YD-Agar (MHY-FP) angesetzt. Grundsätzlich erfolgten die Kulturführung, Myzelernte und Bestimmung der BTM wie in 2.3 beschrieben. Die auf diese Weise erhaltenen Myzelien wurden gemäß 2.6 hinsichtlich ihrer Lipidgehalte und Fettsäurezusammensetzungen untersucht.

2.4.1 Test diverser komplexer Standard-Nährmedien

Zunächst wurde der Einfluss diverser komplexer Standard-Nährmedien getestet. Die Herstellung der dafür genutzten Nährmedien (Tabelle 25) erfolgte analog zu 2.3.1. Die Zusammensetzungen der ebenfalls genutzten ME-, MEP- und YD-Medien finden sich in Tabelle 23. Die Kultur dauern blieben im Vergleich zum Screening (Tabelle 57) unverändert.

Tabelle 25: Zusammensetzung der getesteten Nährmedien.

Medienbestandteil	Konzentration [g/L]	Medienbestandteil	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium I (YPG)^a		Standard-Nährmedium (SNL)	
Hefeextrakt	3	Glucose-Monohydrat	30
Sojapepton	3	Asparagin-Monohydrat	4,5
Glucose-Monohydrat	30	KH ₂ PO ₄	1,5
CaCO ₃	2	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5
Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium II (YPD)		Hefeextrakt	3
Hefeextrakt	10	Spurenelementlösung	1 mL/L
Sojapepton	20	pH-Einstellung vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf pH 6,0	
Glucose-Monohydrat	20		
Adeninsulfat	0,03		
Malzextrakt-Pepton-Glucose-Medium (MPG)			
Malzextrakt	3		
Sojapepton	3		
Glucose-Monohydrat	33		
Hefeextrakt-Malzextrakt-Glucose-Medium (YMG)			
Hefeextrakt	4		
Malzextrakt	10		
Glucose-Monohydrat	4		

^a dieses Medium wurde lediglich für die Anzucht von FVE-D getestet und vor Verwendung vom unlöslichen CaCO₃ dekantiert

2.4.2 Kultivierungstemperatur

Die Pilze wurden in MPG- (FVE-D, Vorkultur 7 d) bzw. YD-Medium (MHY-FP, Vorkultur 3 d) geführt, wobei die Hauptkulturen 7 (FVE-D) bzw. 6 Tage (MHY-FP) bei 16, 24 und 37 °C inkubiert wurden.

2.4.3 Kultivierungsdauer

Beide Pilze wurden über einen längeren Zeitraum hinweg kultiviert und in regelmäßigen Abständen Hauptkulturen geerntet. FVE-D wurde 33 Tage in MPG-Nährmedium geführt und an den Tagen 7, 21 und 33 geerntet (Vorkultur 7 d). MHY-FP wurde dagegen für 14 Tage in YD-Medium kultiviert und die Myzelien nach 2, 4, 6 sowie 14 Tagen geerntet (Vorkultur 3 d).

Über den Zeitraum der Kultivierung hinweg wurde in den Kulturüberständen die Glucose-Konzentration ermittelt, indem separat dafür angesetzten Kulturen steril 1 mL-Aliquote entnommen wurden. Im Falle von FVE-D erfolgte die Probennahme bis zum achten Tag täglich, bis zum 18. Kulturtag alle zwei Tage und anschließend jeden dritten Tag. Den Kulturen von MHY-FP wurde dagegen bis zum vierten Kulturtag täglich ein Aliquot entnommen. Anschließend wurde jeden zweiten Tag beprobt. Die Aliquote wurden zentrifugiert (16.000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand 1:5 (v/v) verdünnt und der Glucose-Gehalt mittels Biosensor ermittelt.

2.4.4 Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (*Flammulina velutipes*)

2.4.4.1 Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis

Zur Kultivierung von FVE-D wurden verschiedene Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnisse (C/N-Verhältnisse) getestet. Die hierfür genutzten Vorkulturen wurden sieben Tage in MPG-Medium kultiviert, vor der Homogenisierung mittels Ultraturrax vereinigt und das Myzel mit sterilem VE-Wasser gewaschen. Als Hauptkulturmedium wurde ebenfalls MPG-Medium verwendet, wobei jedoch ausgehend vom standardmäßig genutzten Medium (Tabelle 25) 1, 3 bzw. 5 g/L Sojapepton verwendet wurden. Die Gehalte an Malzextrakt und Glucose wurden unverändert beibehalten. Die Myzelernte der Hauptkulturen erfolgte nach 21-tägiger Kultivierung.

Den Kulturen wurden bis zum zehnten Kulturtag alle zwei, danach alle drei Tage Aliquote entnommen, um analog zu 2.4.3 die Glucose-Gehalte in den Kulturüberständen zu bestimmen.

Experimenteller Teil

Das C/N-Verhältnis der verschiedenen Medien wurde mittels Elementaranalyse im Labor „Zentrale Analytik“ des Instituts für organische Chemie der JLU Gießen bestimmt.

2.4.4.2 Kohlenstoff- und Stickstoffquelle

Darüber hinaus wurde die Kultivierung von FVE-D unter Verwendung diverser Kohlenstoff- und Stickstoffquellen untersucht. Der Pilz wurde sieben Tage in ME-Vorkultur geführt, die Myzelien vereinigt, mit sterilem VE-Wasser gewaschen und nach Homogenisierung in MPG/MPC-Hauptkulturen verschiedener Zusammensetzungen (Tabelle 26) überführt. Die Myzelien wurden nach weiteren sieben Tagen in Hauptkultur geerntet.

Tabelle 26: Nährmedienzusammensetzung mit variiertes Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle.

Medienbestandteil	Konzentration [g/L]	Medienbestandteil	Konzentration [g/L]
Malzextrakt-Pepton-Glucose-Medium (MPG Pepton/Protein)^a		Malzextrakt-Pepton-Kohlenstoff-Medium (MPC Kohlenstoff-Quelle)^c	
Malzextrakt	3 g	Malzextrakt	3 g
Pepton/Protein ^a	3 g	Sojapepton	3 g
Glucose-Monohydrat	33 g	Kohlenstoff-Quelle ^c	1 Glucose-Äquivalent

pH-Einstellung vor dem Autoklavieren
mit 1 M HCl bzw. NaOH auf pH 6,2^b

^a neben dem üblicherweise genutzten Pepton aus Soja fanden Casein-, Erbsen-, Fleisch-, Gelatine-, Lactalbumin-, Milch- und Saubohnen-pepton sowie Milchprotein und Sojaprotein Anwendung. Das jeweilige Medium wird künftig mit der Abkürzung MPG und der nachgestellten Pepton-/ Proteinart, z.B. MPG Casein, abgekürzt. Bei „MPG“ ohne Zusatz handelt es sich um das Medium mit Sojapepton

^b entspricht dem pH-Wert bei Verwendung von Sojapepton

^c als Kohlenstoff-Quelle wurden neben der üblicherweise verwendeten Glucose Cellobiose (28,5 g/L), Fructose (30,0 g/L), Lactose-Monohydrat (30,0 g/L), Maltose-Monohydrat (30,0 g/L), Saccharose (28,5 g/L), Sorbitol (30,3 g/L) und Xylose (30,0 g/L) verwendet

2.4.5 Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren

(Mortierella hyalina)

Die Supplementation mit verschiedenen Aminosäuren erfolgte lediglich für MHY-FP. Der Pilz wurde in YD-Medium geführt (Vorkultur 3 d), wobei die Hauptkulturen (4 d) zusätzlich L-Isoleucin, L-Methionin, L-Threonin oder L-Valin (jeweils 1 g/L) enthielten. Als Negativkontrolle wurde der Pilz ohne Zusätze kultiviert.

2.5 Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch *Flammulina velutipes*

Die Hauptkulturen (MPG-Nährmedium (Tabelle 25)) wurden mit 7-tägigen ME-Vorkulturen (2.3.5) inokuliert. Während der Hauptkulturführung wurde der potentielle Präkursor in unterschiedlichen „Feeding-Designs“ als Supplement zugesetzt (Tabelle 27). Die verwendete Laurinsäure wurde autoklaviert und warm in das Nährmedium pipettiert, sodass sich feste Plättchen an der Oberfläche bildeten.

Tabelle 27: „Feeding-Designs“ der verschiedenen Supplementationsexperimente mit FVE-D zur Aufklärung der Biosyntheseweges von Dodec-11-ensäure.

An-satz	Supplementation			Gesamtkonzentration [mM]	Kultur-dauer [d]
	Art	Menge [μ L]	Zeitpunkt(e) [d]		
1	12:0-1- ¹³ C	85	0	1,75	7
2	12:0-1- ¹³ C	85	3	1,75	10
3	12:0-1- ¹³ C	25	0	2,5	10
		50	3		
		50	7		
4	12:0-1- ¹³ C	85	0	1,75	21

Die Myzelien wurden wie bereits beschrieben geerntet (2.3.6), die Lipide mit *n*-Hexan extrahiert (2.6.1) und nach Transmethylierung (2.6.2.1 bzw. 2.6.2.2) auf die Fettsäurezusammensetzung hin untersucht (2.6.3). Analog wurde mit biologischen und chemischen Blindwerten verfahren, die nicht supplementiert bzw. nicht inokuliert, jedoch mit Supplement versehen und inkubiert wurden.

Darüber hinaus wurde aus nicht supplementierten Kulturen gewonnenes Myzel, das ansonsten analog zu Ansatz 1 inkubiert wurde, zur exakten Quantifizierung der gebildeten Mengen an Dodec-11-ensäure genutzt (2.6.4).

2.6 Lipid- und Fettsäureanalytik

2.6.1 Lipidextraktion

Die lyophilisierten Myzelien (2.3.6) wurden gemörsert, in Extraktionshülsen eingewogen und mit Glaswolle abgedichtet. Die Extraktion mit Petrolether (160 mL, niedrig siedend [35–65 °C]) erfolgte mittels Soxtherm[®]-Apparatur (Tabelle 28). Den Ansätzen wurden hierfür vorab Siedesteinchen hinzugefügt.

Tabelle 28: Extraktionsparameter der Soxtherm[®]-Apparatur (Petrolether).

T-Klasse	200 °C	Abdestillieren AA	6x Intervall
Extraktionstemperatur	150 °C	Extraktionszeit	2 h 0 min
Absenintervall	4 min 0 s	Abdestillieren AB	3x Intervall
Absenkimpuls	2 s	Abdestillieren AC	5 min
Kochphase	0 h 0 min	Programmdauer	2 h 41 min

Der überschüssige Petrolether wurde im Anschluss mit Stickstoff abgeblasen und die Becher der Soxtherm[®]-Apparatur bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz (ca. 45 min) getrocknet. Im Anschluss wurden die Lipide jedes Ansatzes in 3 mL Isooctan aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung (2.6.2.1 bzw. 2.6.2.2) in Braunglasgefäßen unter Stickstoff bei –20 °C gelagert.

Die Myzelien von FVE-D und MHY-FP im Zuge detaillierterer Untersuchungen (2.4) und den Supplementationsstudien (2.5) wurden analog mit 160 mL *n*-Hexan und angepassten Parametern extrahiert (Tabelle 29).

Tabelle 29: Extraktionsparameter der Soxtherm[®]-Apparatur (n-Hexan).

T-Klasse	200 °C	Abdestillieren AA	6x Intervall
Extraktionstemperatur	165 °C	Extraktionszeit	2 h 0 min
Absenintervall	3 min 30 s	Abdestillieren AB	3x Intervall
Absenkimpuls	2 s	Abdestillieren AC	5 min
Kochphase	0 h 0 min	Programmdauer	2 h 36 min

2.6.2 Synthese von Fettsäuremethylestern

2.6.2.1 Umesterung der Fettsäuren aus den fungalen Lipidextrakten mittels alkali-katalysierter Transmethylierung

Die Synthese von Fettsäuremethylestern erfolgte in Anlehnung an das Schnellverfahren (Transmethylierung unter alkali-katalysierten Bedingungen) der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (BVL 2019).

1 mL des Lipidextraktes (2.6.1) wurde mit 1 mL Isooctan verdünnt, mit 0,1 mL methanolischer Kaliumhydroxidlösung (2 M) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 2 min Standzeit wurden 2 mL einer gesättigten Kochsalzlösung zugegeben und erneut geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und über Nacht bei 4 °C über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Vor der gaschromatographischen Analyse der organischen Phase (2.6.3) wurde diese, abhängig vom Fettgehalt der jeweiligen Pilzspezies, gegebenenfalls 1:10 bzw. 1:100 (v/v) mit Isooctan verdünnt.

Als Blindwerte für die Variation der Stickstoff-Quellen wurde analog den Pilzkulturen inkubiertes Medium vakuumfiltriert und die erhaltenen Filterpapiere mit *n*-Hexan extrahiert. Die Extrakte wurden in 2 mL Isooctan aufgenommen und vollständig zur Umesterung und anschließenden gaschromatographischen Analytik (2.6.3) verwendet.

2.6.2.2 Um- und Veresterung der Fettsäuren aus den fungalen Lipidextrakten mittels Bortrifluorid-katalysierter Transmethylierung

Die aus den Supplementationsstudien (2.5) stammenden Lipidextrakte wurden zur Methylierung sowohl der veresterten als auch der freien Fettsäuren zusätzlich nach Fraatz *et al.* (2018) mit Bortrifluorid methyliert. Hierzu wurden 100 µL Lipidextrakt verwendet. Die gebildeten Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch untersucht (2.6.3).

2.6.2.3 Veresterung von Fettsäuren als Referenzsubstanzen

Neben den in Tabelle 4 gelisteten Fettsäuremethylestern dienten die dort genannten Fettsäuren als Referenzsubstanzen zur Identifizierung. Letztere wurden nach Fraatz *et al.* (2018) methyliert und gaschromatographisch analysiert (2.6.3). Dabei wurden, je nach Verfügbarkeit, 50 µg bis 10 mg der jeweiligen Fettsäure zur Methylierung eingewogen.

2.6.3 Gaschromatographische Fettsäureprofilanalyse

Die Analyse der gewonnenen Fettsäuremethylester (2.6.2) erfolgte mittels GC-MS (Tabelle 30). Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen wurde über einen Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen (Tabelle 4 bzw. 2.6.2.3) vorgenommen. Als geräteunabhängige Kenngrößen dienten dabei die Retentionsindices (RI) nach van den Dool und Kratz (1963), welche mit Hilfe der Analyse einer homologen Reihe von *n*-Alkanen für jede Substanz berechnet wurden (Formel (1)).

Tabelle 30: Geräteparameter der FAME Analyse.

Gaschromatograph	GC-MS I		
Stationäre Phase	VF-WAXms	Select FAME	DB-5ms
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (constant flow)	He (5.0), 1,0 mL/min (constant flow)	He (5.0), 1,2 mL/min (constant flow)
Injektor und Probenaufgabe	split/splitless-Inlet (Split 5:1 bis 250:1, siehe Fließtext), 250 °C, 1 µL Injektionsvolumen		
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 3 °C/min, 240 °C (12 min)	80 °C (1 min), 20 °C/min, 145 °C (30 min), 1 °C/min, 198 °C (0 min), 5 °C/min, 250 °C (15 min)	40 °C (3 min), 3 °C/min, 300 °C (10 min)
Temperatur Transferline	250 °C		
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich <i>m/z</i> 33–425		

$$RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{t_R(\text{Substanz}) - t_R(C_n)}{t_R(C_{n+1}) - t_R(C_n)} \quad (1)$$

<i>RI</i>	Retentionsindex
<i>n</i>	Anzahl der Kohlenstoffe des vor dem Analyten eluierenden Alkans
$t_R(\text{Substanz})$	Retentionszeit der Substanz
$t_R(C_n)$	Retentionszeit des vor der Substanz eluierenden Alkans
$t_R(C_{n+1})$	Retentionszeit des nach der Substanz eluierenden Alkans

Die Identifizierungen im Zuge des Screenings nach Produktionsorganismen relevanter Fettsäuren (2.3) wurde anhand einer VF-WAXms sowie einer Select FAME-Trennsäule durchgeführt.

Die Extrakte von FVE-D und MHY-FP wurden zusätzlich mittels DB-5ms analysiert. Für die Analytik weiterer FAME-Extrakte (2.4 und 2.5) wurde ausschließlich die VF-WAXms-Trennsäule verwendet. Das Splitverhältnis wurde stets abhängig von der jeweiligen Probe bzw. Referenzsubstanz gewählt, sodass eine maximale Signalintensität von $9,9 \times 10^6$ erreicht wurde.

Um vor allem für Minorbestandteile massenspektrometrische Fragmentierungsmuster zu erhalten, wurden die Proben darüber hinaus splitlos injiziert und der MS-Detektor zu Elutionszeiten intensiver Peaks ausgeschaltet.

2.6.4 Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung

Für die Lipidextraktion mittels Soxtherm[®]-Apparatur (2.6.1) wurde *n*-Hexan verwendet, wobei die Myzelien (2.5) nach Einwaage in die Extraktionshülsen mit 500 µL internem Standard (Glyceroltrionanoat 4,101 mg/mL *n*-Hexan) versetzt wurden. Nach der Transmethylierung (2.6.2.1) wurden die organischen Extrakte per GC-MS analysiert (Tabelle 31) und über eine externe Kalibrierung quantifiziert.

Tabelle 31: Geräteparameter der FAME-Analyse zur Quantifizierung von Dodec-11-ensäure.

Gaschromatograph	GC-MS II
Stationäre Phase	VF-WAXms
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufnahme	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 25:1), 250 °C, 1 µL Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 3 °C/min, 240 °C (12 min)
Temperatur Transferline	250 °C
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich <i>m/z</i> 33–425

Zur Erstellung zweier Kalibriergeraden wurden Verdünnungen aus Nonan- und Dodec-11-ensäuremethylester in Isooctan hergestellt (ca. 5 bis 30 µg/L) und ebenfalls mittels GC-MS analysiert (Tabelle 31).

2.7 Transformation, Enzymexpression und -reinigung

2.7.1 Stammhaltung

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden auf Platten mit LB-Agar (20 g/L LB-Medium, 15 g/L Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die *E. coli*-Stämme mit Antibiotika-Resistenzen wurden vor dem Gießen der Platten Kanamycin (50 µg/mL) bzw. Chloramphenicol (34 µg/mL) zugegeben.

Die Stammhaltung der (transformierten) *E. coli* erfolgte durch Anlegen von Kryokulturen. Zunächst wurde eine Übernachtskultur (37 °C, 180 U/min) aus einem emers kultivierten Klon in LB-Medium (20 g/L, ggf. unter Antibiotikum-Zusatz) angesetzt. Diesen Übernachtskulturen wurden 4 mL entnommen und zentrifugiert (3724 g, 5 min, RT). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 mL LB-Medium resuspendiert. Von der Suspension wurde je 1 mL in Kryoröhrchen gegeben und nach Zugabe von 500 µL 80%iger (v/v) Glycerol-Lösung (sterilfiltriert, Porengröße 0,22 µm) mittels Vortexer kurz durchmischt. Die Kryoröhrchen wurden eine Stunde in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.7.2 Transformationen und genetische Modifikationen

Zur Expression der *Csα*-DOX mit und ohne His-Tag wurden die Plasmide pET28a-*Csα*-DOX_C-His (Abbildung 6) und pET28a-*Csα*-DOX (Abbildung 5) genutzt. Die zur Herstellung des erstgenannten Konstrukts sowie die zur Expression notwendigen Klonierungsschritte sind als Übersicht in Abbildung 8 dargestellt.

Zur Expression der *Osα*-DOX (2.7.3) und der *Mm*CAR (2.7.4) wurden direkt einsetzbare Stämme von den Projektpartnern Symrise bzw. Universität Greifswald (Arbeitsgruppe Prof. Uwe T. Bornscheuer) erhalten (2.1.2.1).

Experimenteller Teil

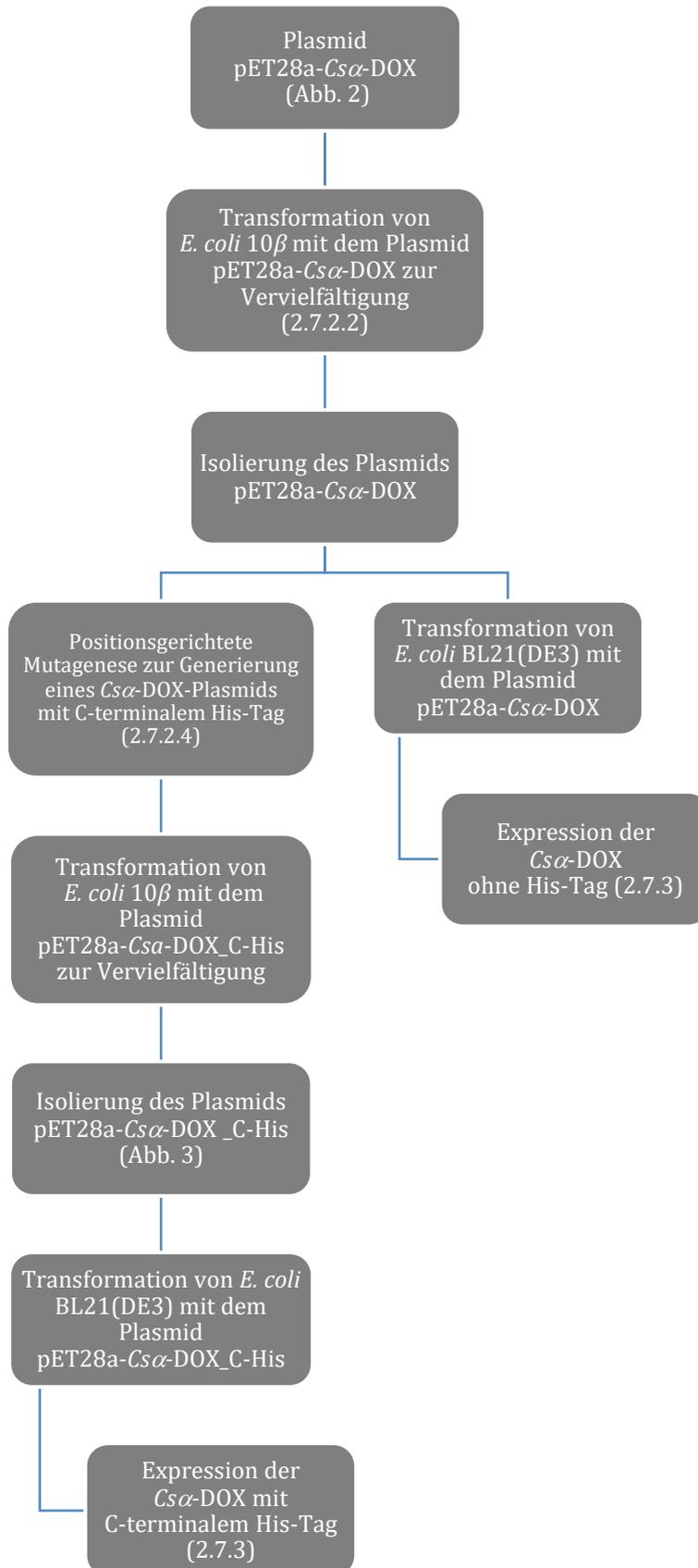


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Klonierung der *Csα-DOX* kodierenden Gensequenz und der anschließenden Expression der *Csα-DOX*.

2.7.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Nach Sambrook und Green (2012) wurde aus der LB-Übernachtskultur (37 °C, 180 U/min) des entsprechenden *E. coli*-Stammes eine LB-Hauptkultur (37 °C, 180 U/min, 50 mL mit 1% Inokulum) angelegt. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,5 und 0,8 wurde die Kultur 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (1750 *g*, 4 °C, 15 min), das Zellpellet in 14 mL FD-Puffer (Tabelle 32) resuspendiert und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (1750 *g*, 4 °C, 10 min) wurde das Pellet in 3,4 mL FD-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung (2.7.2.2) zu 100 μ L-Portionen bei –80 °C eingelagert.

Tabelle 32: Zusammensetzung des FD-Puffers zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*.

Komponente	Konzentration
KCl	100 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	50 mM
Glycerol	1 M
Kaliumacetat	10 mM

2.7.2.2 Transformation von *E. coli* mit der α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica* kodierenden Gensequenz

E. coli 10 β wurde zunächst mit dem Plasmid pET28a-C α -DOX (Abbildung 5) transformiert, um eine Vervielfältigung desselben zu ermöglichen. Dazu wurden etwa 100 ng Plasmide zu chemisch kompetenten *E. coli* (2.7.2.1) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten ein Hitzeschock (42 °C, 90 s) und eine erneute Inkubation auf Eis (3 min). Nach Zugabe von 700 μ L LB-Medium wurden die *E. coli*-Kulturen für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend verschiedene Volumina auf einer Antibiotikum-LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (2.7.1). Die Transformation wurde mittels Kolonie-PCR (2.7.2.3) überprüft.

Nach der Isolierung des Plasmids pET28a-C α -DOX aus dem Aliquot einer entsprechenden Übernachtskultur (37 °C, 180 U/min) mit Hilfe des *NucleoSpin*[®] bzw. des *FastGene*[®] Plasmid Mini-Kits wurde dieses für die Transformation und Expression der C α -DOX ohne His-Tag in *E. coli* BL21(DE3) (2.7.3) bzw. für eine positionsgerichtete Mutagenese (2.7.2.4) verwendet.

Die Stammhaltung der transformierten *E. coli* erfolgte in Form von Kryokulturen (2.7.1).

Experimenteller Teil

2.7.2.3 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (*Colony-PCR*)

Einzelne Kolonien (2.7.2.2) wurden gepickt und für 10 min bei 95 °C in 50 µL sterilem Reinstwasser inkubiert, zentrifugiert (8000 g, 21 °C, 5 min) und anschließend 2,5 µL des Überstandes zur Kolonie-PCR (Tabelle 33) eingesetzt.

Tabelle 33: Zusammensetzung der Reaktionsmischung und Temperaturprogramm der *Colony-PCR*.

Bestandteile der Reaktionsmischung (10 µL)	Temperaturprogramm		
	Schritt ^a	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Phusion-Polymerase (0,25 U)	1	98	2:00
HF-Puffer	2	98	0:30
dNTPs (0,2 mM)	3	60	0:30
<i>Csα-DOX</i> Forward-Primer (0,5 µM)	4	72	0:45
<i>Csα-DOX</i> Reverse-Primer (0,5 µM)	Wiederholung von Schritt 2 bis 4 (30x)		
	5	72	5:00
	6	4	∞

^a 1: initiale Denaturierung, 2: Denaturierung, 3: Primer-Bindung, 4: Elongation, 5: finale Elongation, 6: Lagerung

Die erhaltenen Amplifikate wurden nach Behandlung mit *MidoriGreen Direct* mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Tabelle 34), 1% Agarose, 100 V, 1000 mA, 150 W).

Tabelle 34: Zusammensetzung des TAE-Puffers zur Gelelektrophorese.

Komponente	Konzentration
Tris	2 M
Eisessig	5,71% (v/v)
EDTA (pH 8,0)	50 mM

2.7.2.4 Modifikation der Gensequenz mittels *QuikChange*TM

Zur Expression einer Variante der *Csα-DOX* mit C-terminalem His-tag wurde das Plasmid pET28a-*Csα-DOX*_C-His (Abbildung 6) durch positionsgerichtete Mutagenese aus dem vervielfältigten Mutterplasmid pET28a-*Csα-DOX* (2.7.2.2) hergestellt. Hierfür wurde das Stop-Codon im Insert von pET28a-*Csα-DOX* mittels *QuikChange*TM (Agilent) deletiert. Zur PCR wurden etwa 100 ng Mutterplasmid als *Template* eingesetzt (Tabelle 35). Im Anschluss wurde die Hälfte der Amplifikate nach Behandlung mit *MidoriGreen Direct* mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (TAE-Puffer (Tabelle 34), 1% Agarose, 100 V, 1000 mA, 150 W). Mit der anderen Hälfte der PCR-Produkte erfolgte ein enzymatischer DpnI-Verdau (1 µL Enzym) in FD-Puffer

Experimenteller Teil

(50 μ L Gesamtvolumen, 200 U/min, 37 °C, 2 h). Zur Vervielfältigung wurde *E. coli* 10 β mit den nicht verdaubaren Ziel-Plasmiden transformiert und die erfolgreiche Mutagenese per Sequenzierung der isolierten Plasmide anhand des T7-Terminator-Primers überprüft (Microsynth SEQLAB, Göttingen).

Tabelle 35: Zusammensetzung der Reaktionsmischung und Temperaturprogramm des PCR-Ansatzes zur positionsgerichteten Mutagenese.

Bestandteile der Reaktionsmischung (25 μ L)	Temperaturprogramm		
	Schritt ^a	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Phusion-Polymerase (0,5 U)	1	98	2:00
HF-Puffer	2	98	0:30
dNTPs (0,2 mM)	3	68	0:30
<i>Cs</i> α -DOX QuikChange™ Forward-Primer (0,5 μ M)	4	72	3:00
<i>Cs</i> α -DOX QuikChange™ Reverse-Primer (0,5 μ M)	Wiederholung von Schritt 2 bis 4 (30x)		
^a 1: initiale Denaturierung, 2: Denaturierung, 3: Primer-Bindung, 4: Elongation, 5: finale Elongation, 6: Lagerung	5	72	15:00
	6	8	∞

2.7.3 Rekombinante Expression der α -Dioxygenasen aus *Crocospaera subtropica* und *Oryza sativa*

Die in *E. coli* 10 β vervielfältigten und anschließend isolierten Plasmide pET28a-*Cs* α -DOX und pET28a-*Cs* α -DOX_C-His wurden zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) kloniert (2.7.2). Zur Expression der *Os* α -DOX wurde ein direkt einsetzbarer *E. coli* W3110(DE3)-Stamm vom Projektpartner Symrise erhalten (2.1.2.1).

Das Anlegen von Expressionskulturen erfolgte nach dem in Abbildung 9 dargestellten Ablauf. Als Negativkontrolle wurden Kulturen von *E. coli* BL21(DE3) mitgeführt, die mit dem Leerplasmid pET28a transformiert worden waren. Zur Expression wurden 200 mL LB-Medium (20 g/L) in 1 L-Schikanekolben verwendet.

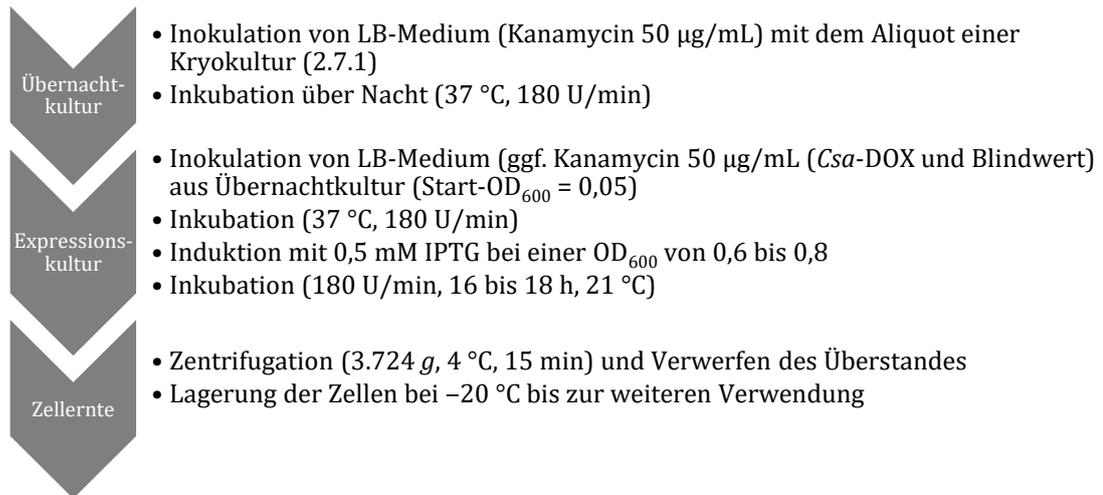


Abbildung 9: Darstellung der Arbeitsschritte zur Expression der α -DOX.

Die geernteten Zellpellets wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht (2.7.6). Im Falle der Variante mit His-Tag wurde darüber hinaus ein *Western Blot* (2.7.7) durchgeführt. Anhand ihrer His-Tags wurden die Enzyme gereinigt (2.7.5).

2.7.4 Rekombinante Expression der Carbonsäure-Reduktase aus *Mycobacterium marinum*

Zur Expression der *MmCAR* wurde ein direkt einsetzbarer *E. coli* RARE-Stamm von der Universität Greifswald erhalten (2.1.2.1). Die Expression erfolgte gemäß Abbildung 10 in 1 L-Erlenmeyerkolben mit 200 mL LB-5052-Autoinduktions-Medium (Tabelle 36) (Studier 2005).

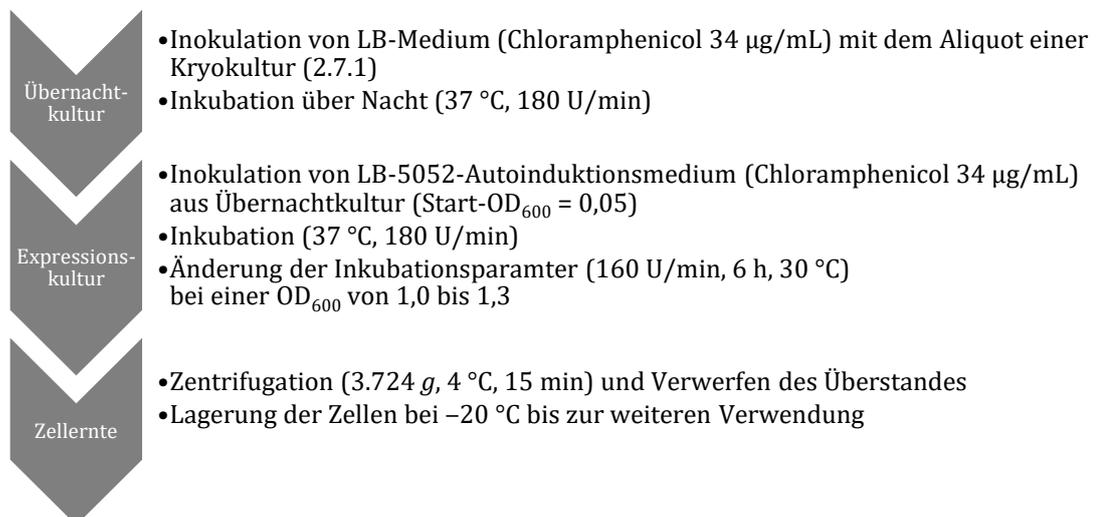


Abbildung 10: Darstellung der Arbeitsschritte zur Expression der *MmCAR*.

Experimenteller Teil

Tabelle 36: Zusammensetzung des LB-5052-Autoinduktions-Mediums.

Medienbestandteil	Konzentration
Caseinpepton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
MgSO ₄	1 mM
NPS (20x Konzentrat)	5% (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	66 g/L
KH ₂ PO ₄	136 g/L
Na ₂ HPO ₄	142 g/L
5052 (50x Konzentrat)	2% (v/v)
Glycerol	250 g/L
Glucose	25 g/L
Lactose	100 g/L

2.7.5 Reinigung der Enzyme

Die Reinigung der Enzyme erfolgte affinitätschromatographisch anhand ihrer His-Tags. Dabei wurden Puffer unterschiedlicher Zusammensetzungen verwendet (Tabelle 37). Als Grundlage diente ein 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5 (*Csα*-DOX, *MmCAR*), pH 8,0 (*Osα*-DOX)). Eine alternative Reinigung der *MmCAR* erfolgte auf Grundlage eines 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5), wobei der Aufschlusspuffer kein Triton X-100 enthielt. Die Reinigung erfolgte bei 4 °C bzw. auf Eis.

Die Zellpellets wurden zunächst in Aufschlusspuffer resuspendiert (20–25% (m/v), Nasszellgewicht) und dreimal für je 30 s mittels Ultraschallsonde (Amplitude 10%, Cyclus 3) behandelt. Die Lysate wurden zentrifugiert (3724 g, 4 °C, 15 min), der gesamte Vorgang dreimal wiederholt und die Überstände für die Reinigung mittels Protino® Ni-NTA Agarose verwendet. Dabei wurde das *gravity-flow*-Protokoll des Herstellers befolgt. Die *α*-DOX wurde zur Konzentrierung in einen 50 kDa-Zentrifugenfilter eluiert und mit 10 mL Umsetzungspuffer gewaschen. Die Elution der *MmCAR* erfolgte hingegen in einen 100 kDa-Zentrifugenfilter. Der Puffer wurde gemäß *gravity-flow*-Protokoll mittels PD 10 Entsalzungssäulen durch den jeweiligen Lagerungspuffer (Tabelle 37) ersetzt.

Tabelle 37: Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung der Enzyme.

Aufschlusspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer	Lagerungspuffer
50 mM Phosphatpuffer	50 mM Phosphatpuffer	50 mM Phosphatpuffer	50 mM Phosphatpuffer
20 mM Imidazol	40 mM Imidazol	250 mM Imidazol	
1% Triton X-100			

Experimenteller Teil

Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine SDS-PAGE (2.7.6) durchgeführt. Die Enzymkonzentration wurde photometrisch nach Bradford (1976) sowie bei 280 nm über die jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten (Tabelle 38) bestimmt, die anhand der Aminosäuresequenzen (Anhang A) mit Hilfe der Software ProtParam kalkuliert wurden (Gasteiger *et al.* 2005).

Tabelle 38: Kalkulierte molare Extinktionskoeffizienten (280 nm) der verschiedenen Enzyme.

Enzym	molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{ nm}}$ [1/M pro cm]
Cs α -DOX	96.433
Os α -DOX	103.040
MmCAR	122.995

Die gereinigte Cs α -DOX wurde biochemisch charakterisiert (2.9) und zur biotechnologischen Darstellung methylverzweigter Aldehyde (2.10.1.3) eingesetzt. Mithilfe der gereinigten Os α -DOX und MmCAR wurden fungale Lipidextrakte transformiert (2.8).

2.7.6 Denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Enzymexpression (2.7.3 bzw. 2.7.4) sowie die Reinheit der isolierten Enzyme (2.7.5) wurden mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) überprüft. Dabei wurden ein 4%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel sowie ein denaturierender Laufpuffer verwendet (Tabelle 39).

Zur Auftragung von ungereinigtem Enzym wurde ein Aliquot einer Expressionskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 eingestellt. 200 μ L wurden zentrifugiert (8000 g, 4 °C, 5 min), das Zellpellet wurde in 30 μ L denaturierendem Probenauftragspuffer (Tabelle 39) resuspendiert und aufgekocht (95 °C, 10 min). Zur Beladung der Gel-Taschen wurden 15 μ L verwendet. An gereinigtem Enzym wurden etwa 2 μ g aufgetragen.

Nach der Trennung (150 V, 150 W, pro Gel 15 (Lauffront im Sammelgel) bzw. 25 mA (Lauffront im Trenngel)) wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung und Entfärbelösung behandelt (Tabelle 39).

Experimenteller Teil

Tabelle 39: Zusammensetzung verwendeter Lösungen zur SDS-PAGE.

Komponente	Menge/Konzentration	Komponente	Menge/Konzentration
denaturierender Lower Tris-Puffer (pH 8,8)		denaturierender Upper Tris-Puffer (pH 6,8)	
Tris	181,7 g/L	Tris	60,5 g/L
SDS	4,0 g/L	SDS	4,0 g/L
Sammelgel SDS-PAGE (4%)		Trenngel SDS-PAGE (12%)	
Reinstwasser	1,95 mL	Reinstwasser	2,7 mL
denaturierender Upper-Tris-Puffer (pH 6,8)	750 µL	denaturierender Lower-Tris-Puffer (pH 8,8)	1,5 mL
Rotiphorese Gel 40	300 µL	Rotiphorese Gel 40	1,8 mL
APS (40%ige Lösung)	10 µL	APS (40%ige Lösung)	15 µL
TEMED	4 µL	TEMED	7,5 µL
denaturierender Probenauftragungspuffer SDS-PAGE (5x konzentriert)		denaturierender Laufpuffer SDS-PAGE (10x konzentriert)	
Tris-HCl (pH 6,8)	0,3 M	Glycin	144,2 g/L
SDS	10% (m/v)	SDS	10 g/L
Bromphenolblau	0,26% (m/v)	Tris	30,2 g/L
Glycerol	50% (v/v)	Coomassie-Färbelösung	
β -Mercaptoethanol	8% (v/v)	Coomassie Blau R250	0,1% (m/v)
Entfärbelösung		Eisessig	10% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)	Methanol	40% (v/v)
Ethanol	30% (v/v)		

2.7.7 Western Blot

Die Expression der Cs α -DOX mit His-Tag wurde darüber hinaus mit Hilfe eines His-Tag-spezifischen *Western Blots* überprüft. Die Überführung der Proteine vom Polyacrylamid-Gel (2.7.6) auf die PVDF-Membran erfolgte mittels einer gekühlten *Blotting*-Kammer (100 V, 1000 mA, 150 W, 1:15 h) mit *Towbin*-Puffer (Tabelle 40) (Towbin *et al.* 1979). Die Membran wurde direkt im Anschluss gewaschen, über Nacht bei 4 °C mit 5% Milchpulver in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween® 20 (TBS-T-Puffer, Tabelle 40) blockiert und für 2 h bei Raumtemperatur mit anti-His HRP inkubiert. Die Entwicklung erfolgte per Opti-4CN™-Substrat-Kit für 30 min bei Raumtemperatur.

Experimenteller Teil

Tabelle 40: Zusammensetzung verwendeter Lösungen zum Western Blot.

Towbin-Puffer (Variante) ^a		TBS-T-Puffer (pH 7,5)	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glycin	195 mM	NaCl	150 mM
Tris	25 mM	Tris-HCl	50 mM
Methanol	5% (v/v)	Tween® 20	0,1% (v/v)

^a nach Towbin *et al.* (1979)

2.7.8 Funktionstests der gereinigten Enzyme

Im Falle der gereinigten *Osα-DOX* und *MmCAR* (2.7.5) wurde vor Verwendung zur Biotransformation fungaler Lipidextrakte (2.8) ein Funktionstest durchgeführt.

Die jeweiligen Reaktionsmischungen (Tabelle 41) wurden nach der Inkubation mit 2 mL *n*-Heptan ausgeschüttelt, die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und mittels GC-FID analysiert (Tabelle 42).

Tabelle 41: Zusammensetzung und Inkubation der Reaktionsmischungen zum Funktionstest der gereinigten Enzyme.

	<i>Osα-DOX</i>	<i>MmCAR</i>
Maßstab	4 mL in 20 mL-Vial	4 mL in 20 mL-Vial
Umsetzungspuffer	Phosphatpuffer 50 mM (pH 8,0)	Phosphatpuffer 50 mM (pH 7,5)
Enzymkonzentration^a	10 µg/mL	75 µg/mL
weitere Zusätze	-	ATP 1 mM MgCl ₂ 10 mM NADPH 1 mM
Substrat (in DMSO)	Myristinsäure 2,5 mM	Laurinsäure 2,5 mM
Inkubation	Rotator (40 U/min, Mischwinkel 90°) 4 h, 37 °C	Rotator (40 U/min, Mischwinkel 90°) 24 h, 30 °C

^a Photometrische Bestimmung bei 280 nm gemäß 2.7.5

Tabelle 42: Gaschromatographische Geräteparameter der Funktionstests der gereinigten Enzyme.

Gaschromatograph	GC-FID
Stationäre Phase	HP-5
Trärgas	H ₂ (5.0), 2,0 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 10:1), 250 °C, 1 µL Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 20 °C/min, 320 °C (7 min)
FID-Parameter	250 °C, H ₂ (40 mL/min), synthetische Luft (400 mL/min) <i>make-up</i> -Gas: N ₂ (25 mL/min)

2.8 Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase

2.8.1 Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden

Ein Aldehyd-Mischstandard (Tabelle 5) wurde in einer Konzentration von 125 μg pro mL je Aldehyd in Aceton angesetzt. 50 μL dieser Stammlösung wurde mit den in Tabelle 43 genannten Lösungen *ad* 250 mL aufgefüllt.

Tabelle 43: Zur SPME-Methodenentwicklung genutzte Matrices.

Matrixlösung	Substanzen	Konzentration
Reinstwasser	-	-
Phosphatpuffer I	KH_2PO_4 / Na_2HPO_4	50 mM (pH 8,0)
	Glucose	0,5% (m/v)
Phosphatpuffer II	KH_2PO_4 / Na_2HPO_4	50 mM (pH 8,0)
	Glucose	0,5% (m/v)
	<i>Gummi arabicum</i>	0,085% (m/v)
Phosphatpuffer III	KH_2PO_4 / Na_2HPO_4	200 mM (pH 7,5)
	Glucose	0,5% (m/v)
	Triton X-100	1% (m/v)

Je 4 mL der hergestellten Lösungen wurden in 20 mL-Vials abgefüllt und zur gaschromatographischen Analyse bereitgestellt. Zunächst wurden SPME-Fasern mit fünf verschiedenen Beschichtungen (Tabelle 19) zur Extraktion der wässrigen Matrixlösung getestet (Tabelle 43). Mit der PDMS/DVB-Faser wurde darüber hinaus die Extraktion mit den Phosphatpuffern I bis III untersucht (Tabelle 44).

Ausgehend von den in Tabelle 44 genannten Standard-Extraktionsparametern wurden für die PDMS/DVB-beschichtete Faser die Parameter Extraktionstemperatur (50, 60 und 75 $^{\circ}\text{C}$), Extraktionszeit (20, 45 und 60 min), Kochsalzzugabe (50, 100, 200 g/L und gesättigt) und Schüttelgeschwindigkeit (350 und 500 U/min) sukzessive variiert und dabei die jeweils besten Bedingungen für die weitere Optimierung beibehalten. Hierfür wurde die wässrige Probenmatrix verwendet und die Lösung bei zu hohen Signalintensitäten erneut 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

Experimenteller Teil

Tabelle 44: Parameter zur Methodenentwicklung der Analyse von Aldehyden mittels HS-SPME-GC-MS.

Gaschromatograph	GC-MS I	GC-MS II
Stationäre Phase	VF-WAXms	
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)	
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 10:1), 250 °C, Desorptionszeit 90 s	<i>split/splitless</i> -Inlet (splitlos), 250 °C, Desorptionszeit 90 s
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)	40 °C (3 min), 3 °C/min, 120 °C (0 min), 5 °C/min, 190 °C (0 min), 20 °C/min, 240 °C (5 min)
Temperatur Transferline	250 °C	
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich m/z 33–300	
SPME-Parameter	Faser-Beschichtungen: CAR/PDMS (1 cm x 85 µm) CW (1 cm x 60 µm) DVB/CAR/PDMS (1 cm x 50/30 µm) PDMS (1 cm x 100 µm) PDMS/DVB (1 cm x 65 µm) Inkubationszeit: 10 min Extraktionstemperatur: 40 °C Extraktionszeit: 30 min <i>bakeout</i> -Temperatur: 240 °C (CW) 250 °C (PDMS) 250 °C (PDMS/DVB) 270 °C (DVB/CAR/PDMS) 300 °C (CAR/PDMS) <i>bakeout</i> -Zeit: vor der Injektion: 5 min nach der Injektion: 10 min Rührgeschwindigkeit: 250 U/min Rührer angeschaltet: 30 s Rührer ausgeschaltet: 3 s	

2.8.2 Biotransformation fungaler Lipide

Die Lipidextrakte von FVE-D und MHY-FP (2.6.1) wurden in 20 mL-Vials eingewogen, das Isooctan unter Stickstoff abgeblasen und die Lipide 5 min mit dem jeweiligen Umsetzungspuffer im Ultraschallbad behandelt. Die Lipide (5 mg/mL) wurden anschließend mit einer kommerziellen Lipase aus *Candida rugosa* (1,1 mg/mL) und einem der gereinigten Enzyme (2.7.5), *O*s α -DOX (10 µg/mL) oder *Mm*CAR (75 µg/mL), analog zu Tabelle 41 in einer Eintopfreaktion umgesetzt.

Die Extraktion und Analyse der gebildeten Aldehyde erfolgte mittels HS-SPME-GC-MS-O (Tabelle 45). Vor den Proben wurden stets ein Faser-Blindwert sowie ein Transformations-Blindwert (inkubierte Reaktionsmischung ohne Lipid-Zusatz) analog den Proben analysiert. Die olfaktorische Evaluierung erfolgte durch einen geschulten Prüfer, der neben den Qualitäten

Experimenteller Teil

die Intensitäten der auftretenden Gerüche anhand einer Skala von 0,5 (schwach) bis 3 (stark) subjektiv bewertete.

Tabelle 45: Geräteparameter zur gaschromatographischen Analyse der aus den fungalen Lipiden gebildeten Biotransformationsprodukte.

Gaschromatograph	GC-MS/MS-O	GC-MS II
Stationäre Phase	VF-WAXms	DB-5ms
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)	
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (splitlos), 250 °C, Desorptionszeit 90 s	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 10:1 bzw. 100:1), 250 °C, Desorptionszeit 90 s
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)	40 °C (3 min), 5 °C/min, 320 °C (12 min)
Temperatur Transferline	250 °C	
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich m/z 33–425	
SPME-Parameter	Faser-Beschichtung: PDMS/DVB (1 cm x 65 µm) Inkubationszeit: 10 min Extraktionstemperatur: 60 °C Extraktionszeit: 30 min <i>bakeout</i> -Temperatur: 250 °C <i>bakeout</i> -Zeit: vor der Injektion: 5 min nach der Injektion: 10 min Rührgeschwindigkeit: 250 U/min Rührer angeschaltet: 30 s Rührer ausgeschaltet: 3 s	

Die Umsetzung der Lipide von FVE-D (5 mg) erfolgte zusätzlich in 3,8 mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) unter Zusatz von 10 mM MgCl₂, wobei die Lipide zunächst 4 h bei 40 °C mit der Lipase aus *C. rugosa* (5 U) behandelt wurden und erst anschließend durch Zugabe von 0,2 U *MmCAR* (2.7.5, Reinigung in Tris-Puffer), ATP und NADPH (je 4,5 mM) auf ein Volumen von 4,5 mL gebracht wurden. Die weitere Inkubation erfolgte für eine Dauer von 15 h bei 30 °C.

Die Enzymaktivität der *MmCAR* wurde über Formel **(2)** anhand eines photometrischen Assays bestimmt. Dazu wurde die Extinktionsabnahme von NADPH bei 340 nm aufgezeichnet, die im Zuge der Umsetzung von Dodec-11-ensäure (50 µM) bei 30 °C erfolgte. Die Reaktion wurde in den Kavitäten von Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei das Reaktionsvolumen 200 µL betrug (50 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 0,5 mM NADPH, 1,49 µg *MmCAR*¹, Fettsäure-Substrat gelöst in DMSO).

¹ photometrische Bestimmung gemäß 2.7.5 bei 280 nm

Experimenteller Teil

$$a_v = \frac{v_0}{\epsilon_{NADPH}} \cdot VF \quad (2)$$

a_v	Volumenaktivität	[U/mL]
v_0	Anfangsgeschwindigkeit	[Δ Abs/min]
ϵ_{NADPH}	experimentell ermittelter Extinktionskoeffizient von NADPH	[Abs \cdot 1/ μ M]
VF	Verdünnungsfaktor	

Nach der Umsetzung wurden die Biotransformationsansätze mit Undec-10-enal als Extraktionsstandard versetzt und dreimal mit je 4,5 mL *t*-BME ausgeschüttelt. Die organischen Extrakte wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend per GC-MS analysiert (Tabelle 46). Die Quantifizierung von Dodec-11-enal erfolgte anhand einer externen Kalibrierung. Heptanal diente als Injektionsstandard.

Tabelle 46: Geräteparameter der Quantifizierung von Dodec-11-enal.

Gaschromatograph	GC-MS II
Stationäre Phase	VF-WAXms
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufnahme	<i>split/splitless</i> -Inlet (splitlos), 250 °C, 1 μ L Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)
Temperatur Transferline	250 °C
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Einzelionen-Monitoring, Massen <i>m/z</i> 55, 70, 67, 81

2.9 Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

2.9.1 Einfluss des C-terminalen His-Tags auf die α -Dioxygenase-Aktivität

Neben den für die beiden Enzymvarianten kodierenden Stämmen wurde BL21(DE3) mit dem Leervektor pET28a als Blindwert mitgeführt. Nach der Expression und Zellernte (2.7.3) wurden die Zellpellets mit 50 mL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.5) gewaschen, in 4 mL desselben Puffers resuspendiert mit Lysozym (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert.

Im Anschluss erfolgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall-Sonde (je 5x 1 min, Cyclus 3, 10% Amplitude). Nach Zentrifugation (18.000 g , 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) wurde in den Überständen der Proteingehalt bestimmt (Bradford 1976). Unter Berücksichtigung der zuvor zugegebenen Menge an Lysozym wurden identische Proteingehalte (3,7 mg/mL) eingestellt. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden auf eine denaturierende SDS-PAGE aufgetragen (2.7.6) und die α -DOX-Aktivität gemäß 2.9.4 mittels Sauerstoff-Sonde bestimmt (Einsatz von 50 μL Rohextrakt, Myristinsäure (800 μM) als Substrat, 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 1% Triton X-100 als Umsetzungspuffer).

2.9.2 Thermofluor-Assay zur Bestimmung der Enzymstabilität (Screening)

Die Stabilität des Enzyms wurde nach Boivin *et al.* (2013) mittels Thermofluor-Assay in verschiedenen Phosphatpufferlösungen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,5–8) mit Zusätzen an NaCl und DMSO untersucht. Die Volumina der Reaktionsansätze betragen 25 μL mit einer Enzymkonzentration (2.7.5) von 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Nach Zentrifugation (2000 g , 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min) wurde der Assay mittels *Real-Time*-PCR-Cyclers durchgeführt (Tabelle 47). Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle 5 s (Absorptions-/Emissionsmaximum 470/569 nm).

Tabelle 47: Temperaturprogramm des PCR-Cyclers während des Thermofluor-Assays.

Programmstatus	Temperatur	Zeit [min:s]
Konditionierung	10 $^{\circ}\text{C}$	03:00
Gradient	1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	75:00

2.9.3 Bestimmung von Salz-, pH- und Temperaturoptimum

Zur Optimierung der Umsetzungsparameter wurden der Einfluss des pH-Wertes (6, 7, 7,5, 8, 9), der Phosphatpuffer-Konzentration (50, 100, 200, 400 mM), der Temperatur (20, 25, 30, 35,

Experimenteller Teil

40 °C) sowie des Zusatzes von Additiven (NaCl, DMSO, Triton X-100) auf die Umsetzung getestet.

Zum Test der zuerst genannten Parameter sowie des Zusatzes von NaCl (50 mM) und DMSO (2,5% (v/v)) wurden Umsetzungen im 4 mL-Maßstab in 20 mL-Vials durchgeführt. Ausgangspunkt der Optimierung war ein 50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,5. Als Substrate wurden die Carbonsäuren 11:0, 13:0 und 15:0 (jeweils 5 mM) verwendet, die nach Zugabe des Puffers 5 min im Ultraschallbad dispergiert wurden. Anschließend wurde gereinigtes (2.7.5) Enzym zugegeben (10 µg/mL), mittels Rotator (40 U/min, 90° Mischwinkel, 2 h) inkubiert und die Reaktion nach Abkühlung in Eis (3 min) durch Zugabe von 200 µL HCl (4 M) gestoppt. Die Proben wurden per HS-SPME-GC-MS analysiert (Tabelle 48). Beim Test unterschiedlicher Pufferzusammensetzungen wurden die Reaktionslösungen vor der Analyse *ad* 8 mL aufgefüllt und dabei auf identische Salz- bzw. DMSO-Konzentrationen angepasst.

Tabelle 48: Geräteparameter der Aldehyd-Analyse mittels HS-SPME-GC-MS.

Gaschromatograph	GC-MS/MS-O	
Stationäre Phase	VF-WAXms	
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)	
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 100:1), 250 °C, Desorptionszeit 90 s	
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)	
Temperatur Transferline	250 °C	
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich <i>m/z</i> 33–425	
SPME-Parameter	Faser-Beschichtung	PDMS/DVB (1 cm x 65 µm)
	Inkubationszeit	10 min
	Extraktionstemperatur	60 °C
	Extraktionszeit	30 min
	<i>bakeout</i> -Temperatur	250 °C
	<i>bakeout</i> -Zeit	vor der Injektion: 5 min nach der Injektion: 10 min
	Rührgeschwindigkeit	250 U/min
	Rührer angeschaltet	30 s
	Rührer ausgeschaltet	3 s

Der Test des Zusatzes von NaCl (50 mM) und Triton X-100 (0,1, 0,5, 1,0%) wurde im 300 µL-Maßstab mit dem Substrat Tridecansäure (5 µM) durchgeführt. Als Ausgangspunkt diente hierbei ein 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,5). Die Messungen erfolgten mittels Sauerstoffsonde gemäß 2.9.4.

2.9.4 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter erfolgte unter optimierten Bedingungen (2.9.3) anhand der Messung des Sauerstoff-Verbrauchs mittels optischer Sauerstoffsonde. Die Umsetzungen wurden dabei in den Kavitäten von Mikrotiterplatten im 300 μL -Maßstab durchgeführt. Die Durchmischung der Reaktionslösung wurde durch einen Mikrorührfisch (4 mm) mittels Mehrfachmagnetrührer gewährleistet (Tabelle 49). Vor Beginn der Messungen wurde die Sonde gemäß Herstellerangaben mit gesättigter Natriumdithionit-Lösung bzw. luftgesättigtem Reinstwasser kalibriert.

Als Blindwerte wurden Messungen ohne Zugabe der Enzymlösung (Blindwert ohne Enzym), ohne Zugabe der Fettsäuresubstratlösung (Blindwert ohne Substrat) und mit abgekochter (95 °C, 10 min) Enzymlösung (Blindwert mit inaktiviertem Enzym) in Umsetzungspuffer A und B durchgeführt.

Tabelle 49: Parameter zur Sauerstoffmessung im Zuge der enzymkinetischen Charakterisierung der Cs α -DOX.

Zusammensetzung der Reaktionslösung		Parameter Sauerstoffmessung	
Phosphatpuffer	285 μL	Messvorgang	
Umsetzungspuffer A	200 mM Phosphatpuffer 50 mM NaCl	Start	10 s vor Enzymzugabe zur Reaktionslösung
Umsetzungspuffer B	200 mM Phosphatpuffer 50 mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100	Stop	2:30 min
Substrat	7,5 μL in DMSO (div. Konzentrationen)	Messintervall	10 s
Enzymlösung (gemäß 2.7.5 gereinigt)	7,5 μL (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Durchmischung	250 U/min
		Temperatur	25 \pm 2 °C
		Programm	OxyView TX3v602

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität bezüglich 13-Methyltetradecansäure und Myristinsäure erfolgte anhand einer 200 μM DMSO-Stammlösung (entspricht 5 μM in der Reaktionslösung) in Umsetzungspuffer A. Die Ergebnisse wurden zur semi-präparativen Biotransformation der methylverzweigten Carbonsäuren (2.10.1.3) genutzt.

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m) und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) erfolgten die Messungen in Umsetzungspuffer B mit denselben Substraten mit Stammkonzentrationen von 62,5, 125, 167, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 und 8.000 μM in DMSO.

Experimenteller Teil

Die Michaelis-Konstanten (K_m) und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) wurden mittels OriginPro kalkuliert. Die katalytischen Konstanten (k_{cat}) wurden nach Formel (3) berechnet und die katalytische Effizienz als Quotient aus k_{cat} und K_m bestimmt.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{c_{Enzym}} \quad (3)$$

k_{cat}	katalytische Konstante	[1/s]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[μ M pro s]
c_{Enzym}	Enzymkonzentration	[μ M]

2.9.5 Substratspektrum

Zur Bestimmung des Substratspektrums wurde für folgende Fettsäuren (Arbeitskonzentration 100 μ M) der Sauerstoff-Verbrauch gemäß 2.9.4 analysiert: 8:0, 10:0, 10:1(9), 12:0, 12:1(5Z), 12:1(11), 14:0, 14:1(9Z), 16:0, 16:1(6Z), 16:1(9Z), 18:0, 18:1(9Z), 18:2(9Z,12Z). Die Messungen erfolgten in Umsetzungspuffer A (Tabelle 49) mit einer Enzymkonzentration von 20 μ g/mL.

2.10 Darstellung und Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Aldehyde

2.10.1 Darstellung und Isolierung der Aldehyde

Die Carbonsäuren 7:1(6), 12:1(11), 13:1(12) und 15:1(14) wurden mittels LiAlH_4 zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (2.10.1.1). Nach säulenchromatographischer Isolierung (2.10.1.4) erfolgte die selektive Oxidation zu den jeweiligen Aldehyden (2.10.1.2). Die Alkohole Oct-7-en-1-ol, Non-8-en-1-ol sowie Dec-9-en-1-ol wurden kommerziell erworben und ebenfalls als Edukte für die Oxidation zu den jeweiligen Aldehyden eingesetzt.

Die Darstellung der *iso*- und *anteiso*-methylverzweigten Aldehyde (C_{12} – C_{15}) erfolgte enzymatisch mittels rekombinanter $\text{Cs}\alpha$ -DOX aus den jeweiligen um ein Kohlenstoffatom längeren Fettsäuren (2.10.1.3). Die Isolierung der Biotransformationsprodukte wurde analog den chemischen Syntheseprodukten durchgeführt (2.10.1.4).

2.10.1.1 Reduktion von Carbonsäuren mit LiAlH_4

Als Lösungsmittel zur Reduktion der Carbonsäuren mit LiAlH_4 diente *t*-BME, der vor Verwendung getrocknet wurde. Hierfür wurden 500 mL *t*-BME mit 25 g KOH-Plätzchen versetzt und zwei Stunden gerührt. Das Gemisch wurde in einen Rundkolben filtriert und mit 2,5 g zerkleinertem, elementarem Natrium sowie zwei Spatelspitzen Benzophenon versetzt. Ein geöffneter Tropftrichter mit aufgesetztem Metallkühler und Trockenrohr wurde aufgesetzt und bis zum Farbumschlag des Benzophenons (ca. 4 h) unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde der Tropftrichter verschlossen, um das getrocknete Lösungsmittel aufzufangen.

40 mL des getrockneten *t*-BME wurden in einem 250 mL-Dreihalskolben mit Metallkühler mit einem Überschuss an LiAlH_4 versetzt. Über einen Tropftrichter wurde in 20 mL *t*-BME gelöstes Edukt unter Rühren in den Rundkolben getropft. Die entstehende Suspension wurde 4 h gerührt und halbstündig kleine Mengen an Reduktionsmittel zugegeben. Anschließend wurden über den Tropftrichter 15 mL Eiswasser zugegeben und der gebildete Niederschlag durch Zugabe von 10%iger H_2SO_4 in Lösung gebracht. Die organische Phase wurde mittels Scheidetrichter abgetrennt und die wässrige Phase zusätzlich dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, zweimal mit je 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und durch Filtration mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet (Becker und Beckert 2015). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Rotationsverdampfer und Abblasen

mit N₂ von organischem Lösungsmittel befreit. Die Isolierung des jeweiligen Syntheseproduktes erfolgte säulenchromatographisch (2.10.1.4).

2.10.1.2 Selektive Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden (Dess-Martin-Oxidation)

3,0 g Dess-Martin Periodinan wurden in 100 mL CH₂Cl₂ suspendiert und 6,5 mmol des zu oxidierenden Alkohols zugegeben. Die Suspension wurde 2 h in einem 250 mL-Rundkolben bei Raumtemperatur gerührt.

12,5 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O wurden in 80 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gelöst. Die Lösung wurde mit der Reaktionsmischung vereint und 10 min gerührt. Die organische Phase wurde mittels Scheidetrichter abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Alle organischen Phasen wurden vereint, mit 80 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie zweimal mit 40 mL VE-Wasser gewaschen und im Anschluss über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet (Dess *et al.* 1983). Der resultierende Rohextrakt wurde mittels Rotationsverdampfer und Abblasen mit N₂ von organischem Lösungsmittel befreit. Im Falle des Hept-6-enals erfolgte das Einengen per Vigreuxkolonne (55 °C Wasserbadtemperatur). Die Isolierung des jeweiligen Syntheseproduktes erfolgte säulenchromatographisch (2.10.1.4).

2.10.1.3 Biotechnologische Darstellung methylverzweigter Aldehyde

mittels α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

Die Umsetzung der methylverzweigten Fettsäuren (*iso*- und *anteiso*-C₁₃ bis C₁₆) erfolgte mittels gereinigter Cs α -DOX (2.7.5) im 4 mL-Maßstab in 20 mL-Vials unter Anwendung der zuvor optimierten Umsetzungsparameter (2.9.3, 200 mM Phosphatpuffer, 50 mM NaCl, pH 7,5, 25 °C). Das Substrat (50 μ mol) wurde vor Zugabe des Enzyms (0,25 U) im Ultraschallbad dispergiert (5 min). Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms wurde anhand der 13-Methyltetradecansäure (5 μ M) bestimmt (2.9.4).

Nach einstündiger Inkubation mittels Rotator (40 U/min, Mischwinkel 90°) wurden die Proben auf Eis abgekühlt (3 min), mit 200 μ L HCl (4 M) versetzt und dreimal mit je 4 mL *n*-Pentan/Diethylether (1:1,12 (v/v)) extrahiert. Der organische Extrakt wurde vor der säulenchromatographischen Isolierung (2.10.1.4) an der Vigreuxkolonne (43 °C Wasserbadtemperatur) eingengt und in 500 μ L *n*-Pentan aufgenommen.

2.10.1.4 Isolierung der chemischen Synthese- und Biotransformationsprodukte

Die Isolierung der synthetisierten ω 1-ungesättigten Alkohole (2.10.1.1) und Aldehyde (2.10.1.2) erfolgte säulenchromatographisch. Hierfür wurde eine Chromatographiesäule (40 cm) mit 20 g Kieselgel (über Nacht bei 105 °C getrocknet) als stationäre Phase verwendet. Die Isolierung der methylverzweigten Aldehyde erfolgte analog mit einer kleineren Chromatographiesäule (20 cm) und 7 g getrocknetem Kieselgel. Die Zusammensetzung des Fließmittels richtete sich nach dem jeweiligen Produkt (Tabelle 50).

Tabelle 50: Fließmittelzusammensetzung zur säulenchromatographischen Isolierung der synthetisierten ω 1-ungesättigten Alkohole und Aldehyde.

Zu isolierendes Syntheseprodukt	Fließmittelzusammensetzung (v/v)
Hept-6-enal	80/20 <i>n</i> -Pentan/Diethylether
Hept-6-en-1-ol	60/40 <i>n</i> -Pentan/Diethylether
Oct-7-enal	98,5/1,5 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Non-8-enal	92,5/7,5 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Dec-9-enal	95/5 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Dodec-11-enal	90/10 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Dodec-11-en-1-ol	60/40 <i>n</i> -Hexan/ <i>t</i> -BME
Tridec-12-enal	95/5 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Tridec-12-en-1-ol	80/15/5 <i>n</i> -Hexan/ <i>t</i> -BME/2-Propanol
Pentadec-14-enal	97,5/2,5 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
Pentadec-14-en-1-ol	50/50 <i>n</i> -Hexan/Diethylether
methylverzweigte Aldehyde	95/5 <i>n</i> -Pentan/Diethylether

In 15 mL-Reagenzgläsern wurden Eluat-Fraktionen von ca. 8 bis 10 mL aufgefangen und mittels GC-FID (Tabelle 51) auf Gegenwart und Reinheit der jeweiligen Zielsubstanz geprüft. Fraktionen, die die entsprechende Verbindung in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereint und mittels Rotationsverdampfer bzw. im Falle des Hept-6-enals und der methylverzweigten Aldehyde per Vigreux-Kolonne (43 °C Wasserbadtemperatur) eingeeengt. Lösungsmittelreste wurden durch Abblasen mit N₂ entfernt. Die isolierten Reinsubstanzen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C in Braunglas-Vials gelagert.

Experimenteller Teil

Tabelle 51: Geräteparameter zur Analyse der Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigung von ω 1-ungesättigten Syntheseprodukten und methylverzweigten Biotransformationsprodukten.

Gaschromatograph	GC-FID
Stationäre Phase	HP-INNOWax
Trägergas	H ₂ (5.0), 2,0 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 10:1), 250 °C, 1 μ L Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 20 °C/min, 240 °C (5 min)
FID-Parameter	250 °C, H ₂ (40 mL/min), synthetische Luft (400 mL/min) <i>make-up</i> -Gas: N ₂ (25 mL/min)

2.10.2 Gaschromatographische Charakterisierung und Strukturanalyse der isolierten Substanzen

Die Reinheit der isolierten Verbindungen (2.10.1.4) wurde gaschromatographisch untersucht. Hierfür wurde je Substanz eine Lösung (ca. 1 mg/mL) in *n*-Pentan/Diethylether (1:1,12 (v/v)) angesetzt und mittels GC-MS analysiert (Tabelle 52, rechts).

Über die Analyse einer homologen Reihe von *n*-Alkanen wurden nach van den Dool und Kratz (1963) die RIs der Verbindungen für die polare VF-WAX-Trennsäule bestimmt (Formel **(1)**). Ein entsprechend angesetzter Mischstandard sowie Mischstandards der kommerziell erworbenen ω 1-ungesättigten Alkohole und Carbonsäuren (Konzentrationen je ca. 0,1 mg/mL) wurden zur Bestimmung der RIs anhand einer unpolaren DB-5-Trennsäule genutzt (Tabelle 52).

Tabelle 52: Geräteparameter zur Abschätzung der Reinheit und Bestimmung der RIs.

Gaschromatograph	GC-MS I	GC-MS II
Stationäre Phase	DB-5ms	VF-WAXms
Trägergas	He (5.0), 1,2 mL/min (<i>constant flow</i>)	
Injektor und Probenaufgabe	<i>split/splitless</i> -Inlet (Split 10:1–200:1), 250 °C, 1 μ L Injektionsvolumen	
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 300 °C (10 min)	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (12 min)
Temperatur Transferline	250 °C	
MS-Parameter	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Totalionenscan, Massenbereich <i>m/z</i> 33–300	

Für die methylverzweigten Aldehyde wurde darüber hinaus die akkurate Masse mittels *atmospheric pressure chemical ionization-time of flight*-Massenspektrometrie (APCI-TOF-MS) bestimmt (Tabelle 53).

Tabelle 53: Geräteparameter der APCI-TOF-MS.

Ionenquellengas 1 (GS1)	15 psi
Ionenquellengas 2 (GS2)	30 psi
Curtain Gas (CUR)	25 psi
Temperatur (TEM)	400,0 °C
Ion Spray Voltage Floating (ISVF)	5500,0 V
Flussrate	100,00 µL/min
Declustering Potential (DP)	60,00 V
Kollisionsenergie (CE)	5,00 V
TOF-Massen	90 bis 500 Da
Polarität	Positiv

Neben den massenspektrometrischen Untersuchungen wurden zur Strukturanalyse kernspinresonanzspektroskopische Experimente (^1H - und ^{13}C -NMR, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ *correlated spectroscopy* (COSY), *heteronuclear single-quantum coherence* (HSQC) und *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC)) bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierfür wurden ca. 20 mg jeder isolierten ω 1-ungesättigten Substanz bzw. die Gesamtmenge der isolierten methylverzweigten Aldehyde in ein NMR-Röhrchen eingewogen und in ca. 600 µL deuteriertem Chloroform (0,03% TMS (v/v)) gelöst. Die NMR-Analysen wurden im Labor „Zentrale Analytik“ des Instituts für organische Chemie der JLU Gießen durchgeführt.

2.10.3 Sensorische Charakterisierung der ω 1-ungesättigten Aldehyde

2.10.3.1 Bestimmung der sensorischen Reinheit mittels GC-FID-O

Von jeder isolierten ω 1-ungesättigten Verbindung (2.10.1.4) wurde eine Lösung in *n*-Pentan/Diethylether (1:1,12 (v/v)) (ca. 1 mg/mL) angesetzt. Diese wurden auf ihre olfaktorische Reinheit hin untersucht, da enthaltene Fremdstoffe die sensorischen Untersuchungen (2.10.3.2 und 2.10.3.4) stören bzw. beeinflussen könnten. Die Aldehyd-Lösungen wurden schrittweise mit *n*-Pentan/Diethylether (1:1,12 (v/v)) verdünnt, die Verdünnungen durch einen geschulten Prüfer mittels GC-FID-O analysiert (Tabelle 54) und über Formel (4) der olfaktorische Reinheitsfaktor (*ORF*) berechnet. Dieser gibt den Verdünnungsfaktor zwischen den beiden Verdünnungsstufen an, bei denen der Analyt gerade noch wahrnehmbar war (VF_o) und keine geruchsaktive Kontaminante mehr detektierbar war (VF_u).

Experimenteller Teil

Tabelle 54: Geräteparameter zur Überprüfung der sensorischen Reinheit der isolierten ω 1-ungesättigten Aldehyde (GC-FID-O).

Gaschromatograph	GC-FID-O
Stationäre Phase	VF-WAXms
Trägergas	H ₂ (5.0), 2,2 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufgabe	<i>cool on column</i> (COC)-Inlet (40 °C, <i>track oven</i>), 1 μ L Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 10 °C/min, 240 °C (7 min)
Detektor-Parameter	FID (250 °C, H ₂ (40 mL/min), synthetische Luft (400 mL/min), <i>make-up-Gas</i> : N ₂ (25 mL/min)) ODP (Transferline 250 °C, Mischkammer 150 °C)

$$ORF = \frac{VF_o}{VF_u} \quad (4)$$

- ORF olfaktorischer Reinheitsfaktor
- VF_o Verdünnungsfaktor der Lösung,
bei der der Analyt gerade noch olfaktorisch wahrnehmbar war
- VF_u Verdünnungsfaktor der Lösung
ohne Wahrnehmung von Fremdsubstanzen

2.10.3.2 Bestimmung der Geruchsqualitäten

Die isolierten Aldehyde (2.10.1.4) wurden einem Panel zur Bestimmung der Geruchsqualitäten präsentiert. Die Panellisten wurden wöchentlich auf das Erkennen bzw. Bestimmen von Geruchsattributen trainiert.

Die isolierten ω 1-ungesättigten Aldehyde wurden zu Konzentrationen von 20 mg/mL in Ethanol gelöst und jeweils 1:40.000 (v/v) mit VE-Wasser auf eine Konzentration von 500 μ g/L verdünnt. 10 mL dieser Lösungen wurden in 35 mL-Schnappdeckelgläser gefüllt. Die verschlossenen Gefäße wurden sieben Prüfern (4 weiblich, 3 männlich im Alter von 24 bis 32 Jahren) zur Bewertung ausgehändigt. Die Prüfer sollten zunächst ohne Absprache für jede Verbindung assoziierte Geruchsattribute sammeln.

Anschließend wurden mit dem gesamten Panel Begriffe für die Bewertung aller Verbindungen definiert. Anhand frischer Proben wurden die Prüfer dazu aufgefordert, jede Substanz mit den zuvor festgelegten Attributen zu bewerten und denselben Intensitäten von 1 (schwach) bis 5 (stark wahrnehmbar) zuzuordnen.

2.10.3.3 Bestimmung der Geruchsschwellen in Luft

Die Bestimmung der Geruchsschwellen in Luft erfolgte nach Ullrich und Grosch (1987). Dafür wurden zwei Mischstandards der ω 1-ungesättigten Aldehyde sowie Alkohole (je 1 mg/mL) mit (2E)-Dec-2-enal (für die Aldehyde) bzw. (2E)-Hex-2-enal (für die Alkohole) als interne Standards (je 1 mg/mL) in *t*-BME angesetzt. Um Co-Elutionen mit den Analyten auszuschließen, wurden vor dem Mischen alle Komponenten mittels GC-FID-O auf das Vorhandensein möglicher olfaktorischer Verunreinigungen hin überprüft. Die Mischungen wurden schrittweise 1:1 (v/v) verdünnt und von vier trainierten Prüfern (2 weiblich, 2 männlich im Alter von 20 bis 28 Jahren) mittels GC-FID-O analysiert (Tabelle 55), bis keine Substanzen mehr am ODP wahrnehmbar waren. Die Geruchsschwellen wurden für jeden Panellisten individuell berechnet (Formel (5)).

Tabelle 55: Geräteparameter zur Bestimmung von Geruchsschwellen in Luft (GC-FID-O).

Gaschromatograph	GC-FID-O
Stationäre Phase	VF-WAXms
Trärgas	H ₂ (5.0), 2,2 mL/min (<i>constant flow</i>)
Injektor und Probenaufgabe	<i>cool on column</i> (COC)-Inlet (40 °C, <i>track oven</i>), 1 µL Injektionsvolumen
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C/min, 240 °C (7 min) [40 °C (3 min), 5 °C/min, 180 °C (0 min), 30 °C/min, 240 °C (12 min)] ^a
Detektor-Parameter	FID (250 °C, H ₂ (40 mL/min), synthetische Luft (400 mL/min), <i>make-up</i> -Gas: N ₂ (25 mL/min)) ODP (Transferline 250 °C, Mischkammer 150 °C)

^a Temperaturprogramm, das für die Bestimmung der Geruchsschwellen der methylverzweigten Aldehyde (2.10.3.4) verwendet wurde

$$OT_{\text{aer}} = \frac{OT_{\text{IST}} \cdot \beta_X \cdot VF_{\text{IST}}}{\beta_{\text{IST}} \cdot VF_X} \quad (5)$$

$OT(X)_{\text{aer}}$	Geruchsschwellenwert in Luft	[ng/L]
OT_{IST}	Geruchsschwelle des internen Standards in Luft $OT_{(E)\text{-Dec-2-enal}} = 2,7 \text{ ng/L}$ bzw. $OT_{(E)\text{-Hex-2-enal}} = 34 \text{ ng/L}$ ^a	[ng/L]
β_X	Konzentration der Substanz X im Mischstandard	[mg/mL]
β_{IST}	Konzentration des internen Standards im Mischstandard	[mg/mL]
VF_X	Kleinste Verdünnungsstufe, bei der die Substanz X gerade noch wahrnehmbar ist	
VF_{IST}	Kleinster Verdünnungsstufe, bei der der interne Standard gerade noch wahrnehmbar ist	

^a nach Teranishi *et al.* (1974)

2.10.3.4 Bestimmung der Geruchsschwellen in Wasser

Die Bestimmung der Geruchsschwellen in Wasser erfolgte in Anlehnung an Czerny *et al.* (2008). Zunächst wurden ethanolische Lösungen der Analyten hergestellt. Diese Stammlösungen (Tabelle 56) wurden mit Ethanol in sieben Schritten weiter 1:3 (v/v) verdünnt. Diese acht ethanolischen Lösungen wurden je 1:2000 (v/v) mit VE-Wasser verdünnt, je 10 mL der resultierenden wässrigen Lösungen in 35 mL-Schnappdeckelgläser abgefüllt und diese anschließend verschlossen. Die Gläser (Probe A) wurden mit jeweils zwei ethanolisch-wässrigen Lösungen (Probe B) mit dreistelligen Zufallszahlen kodiert und in Form von Tripletts in absteigender Konzentration und zufällig alternierender Aufstellung einem Panel zur Bewertung dargebracht. Die Probanden wurden aufgefordert, die Proben orthonasal abzuriechen und die pro Triplet abweichende Probe auf einem Prüfbogen zu notieren. Zur Unterscheidung zwischen Wahrnehmungs- und Erkennungsschwelle sollten die Probanden darüber hinaus die letzte Probe notieren, bei der sie den Geruch noch qualitativ erkennen konnten.

Tabelle 56: Konzentrationen der eingesetzten ethanolischen Stammlösungen zur Bestimmung der Geruchsschwellen ω 1-ungesättigter Aldehyde in Wasser.

Kettenlänge ω 1-ungesättigtes Aldehyd	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	0,60	0,60	0,060	0,067	0,20	2,0	2,0

Das Sensorik-Panel bestand aus 51 Prüfern (31 weiblich, 20 männlich) im Alter zwischen 16 und 43 Jahren. Einige der Prüfer nahmen regelmäßig an institutsinternen Sensorikschulungen teil, überwiegend handelte es sich allerdings um ungeschulte Laien. Pro Substanz prüften 24 Personen auf Unterschied.

Die Auswertung erfolgte gemäß DIN EN ISO 4120:2007. Dabei wurden die 24 Proben-Tripletts einer Konzentrationsstufe pro Substanz als Dreieckstest angesehen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt. Nach Czerny *et al.* (2008) wurden nur diejenigen Antworten gewertet, bei denen die abweichende Probe entlang der absteigenden Konzentrationsreihe ohne Unterbrechung korrekt identifiziert wurde. Die Geruchsschwelle bildete dabei der Mittelwert zwischen der niedrigsten von den Referenzen unterscheidbaren und der höchsten nicht unterscheidbaren Konzentration des jeweiligen Aldehyds (Formel (6)). Als Fehlerangabe dient die halbe Spannweite der beiden zuvor genannten Konzentrationen.

$$OT_{aq} = \frac{(\beta_x + \beta_{x-1})}{2} \quad (6)$$

OT_{aq}	Geruchsschwellenwert in wässriger Lösung	[$\mu\text{g/L}$]
β_x	Niedrigste vom Panel von der Referenz unterscheidbare Konzentration des Aldehyds	[$\mu\text{g/L}$]
β_{x-1}	Höchste vom Panel von der Referenz nicht unterscheidbare Konzentration des Aldehyds	[$\mu\text{g/L}$]

2.10.4 Sensorische Charakterisierung der methylverzweigten Aldehyde

Die Geruchsattribute der methylverzweigten Aldehyde wurden von sechs wöchentlich geschulten Panellisten (3 weiblich, 3 männlich im Alter von 23 bis 28 Jahren) durch eine einfach beschreibende Prüfung anhand der isolierten Reinsubstanzen bestimmt. Zusätzlich wurden sie während der gaschromatographischen Analyse im Zuge der Schwellenwert-Bestimmung in Luft (siehe unten) am ODP erfasst.

Die Bestimmung der Geruchsschwellen der methylverzweigten Aldehyde und der entsprechenden unverzweigten Vertreter in Luft erfolgte analog zu 2.10.3.3 durch drei geschulte Panellisten (2 weiblich, 1 männlich im Alter von 27 bis 32 Jahren). Die Quantifizierung der Aldehyde zur Berechnung der Geruchsschwellen erfolgte über dieselbe GC-Methode mittels externer Kalibrierung. Dazu wurden die unverzweigten Aldehyde genutzt, von denen angenommen wurde, dass sie identische *Response*-Faktoren aufwiesen wie ihre jeweiligen methylverzweigten Pendanten. Decanal diente als Injektionsstandard.

2.11 Entsorgung von S1-Abfällen und Chemikalien

2.11.1 Sterilisierung und Entsorgung von S1-Abfällen

Alle S1-Abfälle wurden sterilisiert (15 min, 135 °C). Flüssige Abfälle wurden (ggf. nach Filtration) über das Laborabwasser, feste Abfälle über den Laborabfall entsorgt.

2.11.2 Entsorgung von Chemikalien

Chemikalien- und Lösungsmittelabfälle wurden in den vorgesehenen Behältnissen in den Laboren des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie gesammelt und über die zentrale Entsorgungseinrichtung der Justus-Liebig-Universität Gießen entsorgt.

3 Ergebnisse

3.1 Screening verschiedener Pilz-Spezies mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren

3.1.1 Wachstum der einzelnen Spezies und Lipidgehalte der gebildeten Myzelien

38 verschiedene Pilz-Spezies wurden gemäß 2.3 kultiviert. Sie wiesen sowohl in Emers- (beispielhaft Abbildung 11), als auch in Submerskultur (beispielhaft Abbildung 12) deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihre Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit auf.

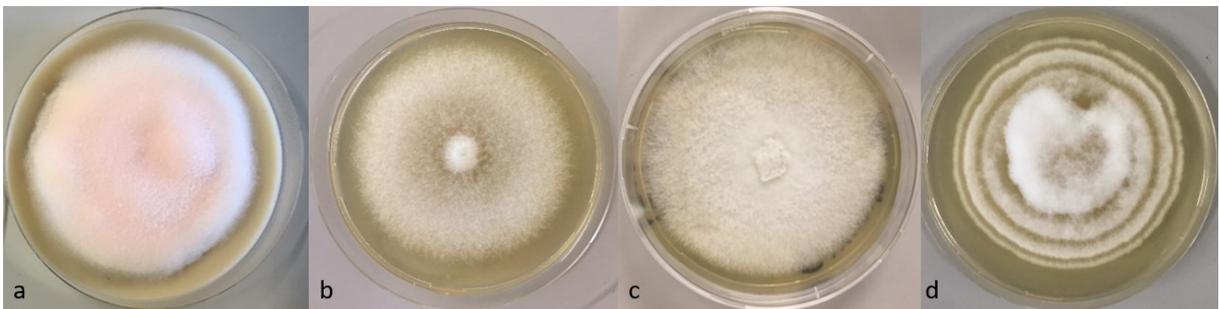


Abbildung 11: Emerskulturen verschiedener Pilz-Spezies: a) CZE, b) FVE-D, c) GAP und d) MHY-FP.

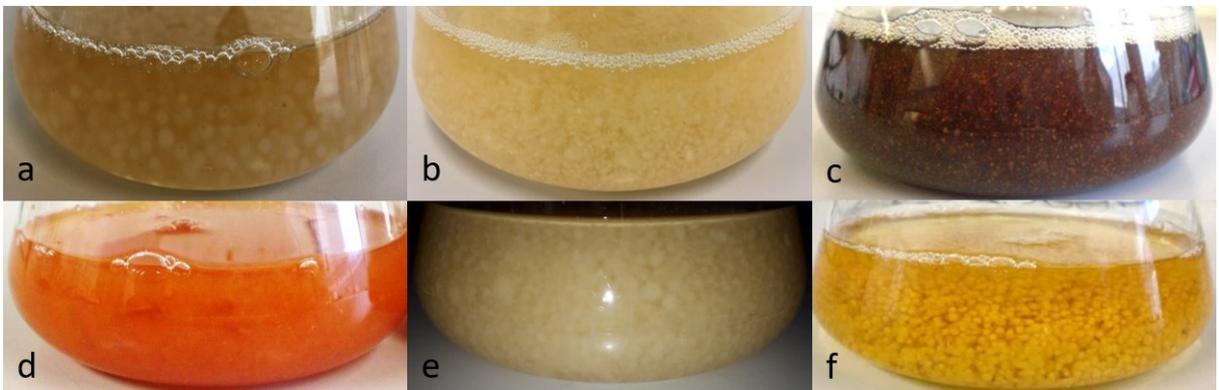


Abbildung 12: Submerse Hauptkulturen verschiedener Pilz-Spezies: a) CZE, b) FVE-D, c) INRA, d) LSU, e) MHY-FP und f) MES.

Tabelle 57 gibt eine detaillierte Übersicht über die unterschiedlichen Kultivierungsdauern und die währenddessen produzierten Myzel-BTM. Darüber hinaus wurden die Myzelien auf ihre Lipidgehalte hin untersucht (2.6.1) (Tabelle 57). Zunächst wurde für jeden Pilz eine Einfachbestimmung durchgeführt. Im Falle interessanter Fettsäureprofile (3.1.2) wurden weitere Bestimmungen nachgezogen, sodass für alle relevanten Pilze, je nach Verfügbarkeit an BTM, mindestens eine Doppelbestimmung vorlag.

Ergebnisse

Tabelle 57: Kultivierungsdauer (emers, submerse Vorkultur (sub VK), submerse Hauptkultur (sub HK)), produzierte Biotrockenmasse und Lipidgehalt der jeweiligen Pilzmyzelien.

Mikroorganismus	(Unter-) Abteilung ^a	Nährmedium	Kultivierungsdauer [d]			BTM [g/L] ^b	Lipidgehalt [g/100 g]
			emers	sub VK	sub HK		
AAE3	Basidio	ME(A)	8	10	4	2,67 ± 0,08	1,29 ± 0,08 ^d
CZE	Asco	PD(A)	35	5	3	2,15 ± 0,05	23,3 ± 0,4 ^e
COD	Basidio	MEP(A)	14	10	6	2,8 ± 0,1	1,29 ± 0,05 ^e
CHET-N	Ento	YM(A)	6	3	5	7,6 ± 0,3	25,3 ± 0,9 ^d
FVE-D	Basidio	ME(A)	6	12	4	2,34 ± 0,07	2,8 ± 0,4 ^d
FFO	Basidio	ME(A)	6	9	4	1,99 ± 0,02	3,7 ± 0,2 ^f
FPI-D	Basidio	ME(A)	6	6	3	3,02 ± 0,01	3,0 ± 0,3 ^d
GAP	Basidio	ME(A)	6	8	4	2,8 ± 0,1	1,69 ± 0,09 ^f
GLU	Basidio	MEP(A)	7	8	4	2,3 ± 0,2	2,6 ± 0,4 ^f
INRA	Basidio	MEP(A)	10	14	4	2,99 ± 0,08	1,24 ± 0,03 ^d
LVI-FP	Asco	ME(A)	70	7	4	4,69 ± 0,08	3,74 ± 0,08 ^e
LSU	Basidio	ME(A)	5	9	7	2,93 ± 0,03	3,21 ± 0,08 ^d
LED	Basidio	ME(A)	7	10	4	1,01 ± 0,03	3,0 ^c
LPE	Basidio	MEP(A)	4	2	1	5,0 ± 0,1	2,61 ± 0,04 ^e
MEX	Basidio	ME(A)	32	17	7	1,91 ± 0,04	2,3 ± 0,2 ^d
MPR	Basidio	MEP(A)	13	13	7	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,9 ^d
MES	Asco	ME(A)	6	8	6	5,39 ± 0,05	14,4 ± 0,6 ^e
MSP	Mucor	YG(A)	4	3	4	5,6 ± 0,2	25,4 ± 0,1 ^e
MAL-FP	Mucor	YG(A)	9	4	3	7,8 ± 0,3	18,1 ± 0,6 ^e
MHY-FP	Mucor	YG(A)	7	3	3	3,54 ± 0,07	29 ± 1 ^d
MIS	Mucor	YG(A)	20	3	3	6,8 ± 0,3	26,8 ± 0,4 ^e
MSC	Basidio	ME(A)	13	8	7	3,0 ± 0,2	2,02 ± 0,09 ^d
NFA	Asco	MEP(A)	21	3	3	4,1 ± 0,2	2,0 ^c
PSTI	Basidio	MEP(A)	24	17	7	4,53 ± 0,02	3,11 ± 0,04 ^d
PIG-F	Basidio	MEP(A)	14	9	3	2,23 ± 0,03	1,9 ± 0,3 ^d
PBE	Basidio	MEP(A)	6	8	4	2,22 ± 0,02	3,5 ^c
PDR	Basidio	MEP(A)	25	7	2	2,8 ± 0,2	2,4 ± 0,3 ^d
PER	Basidio	ME(A)	11	6	3	1,86 ± 0,02	2,0 ^c
POS	Basidio	ME(A)	6	9	8	1,67 ± 0,01	2,6 ^c
POSQ	Basidio	ME(A)	24	18	13	2,2 ± 0,1	4,3 ± 0,4 ^e
PPI	Basidio	MEP(A)	13	10	4	3,98 ± 0,07	2,09 ± 0,06 ^d
PCIN	Basidio	ME(A)	12	7	4	3,0 ± 0,1	1,38 ± 0,03 ^d
PYCO	Basidio	ME(A)	8	7	2	2,19 ± 0,01	2,7 ^c
RAZ	Mucor	ME(A)	3	3	2	2,87 ± 0,06	14 ± 1 ^e
SHI	Basidio	MEP(A)	9	6	3	3,52 ± 0,06	2,39 ± 0,04 ^e
STRU	Basidio	MEP(A)	9	6	4	3,7 ± 0,4	1,54 ± 0,07 ^d
TVE	Basidio	ME(A)	4	3	6	2,47 ± 0,05	2,0 ^e
WCO-C	Basidio	ME(A)	5	7	5	4,03 ± 0,03	1,12 ± 0,07 ^d

^a Asco = Ascomycota, Basidio = Basidiomycota, Ento = Entomophthoromycotina, Mucor = Mucoromycotina

^b die Einheit versteht sich als g pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum); den Werten liegt mindestens eine Dreifachbestimmung zugrunde; als Fehler ist der Standardfehler angegeben

^c Einfachbestimmung; ^d Doppelbestimmung; ^e Dreifachbestimmung; ^d Vierfachbestimmung

Ergebnisse

Aus den erhaltenen Myzel-BTM und den ermittelten Lipidgehalten wurde die Lipidausbeute pro Liter Nährmedium berechnet. Abgesehen von einigen sehr lipidreichen Spezies (CZE, CHET-N, MES, MSP, MAL-FP, MHY-FP, MIS und RAZ) betrug diese in der Regel 25 bis 100 mg pro Liter Hauptkulturmedium (Abbildung 13).

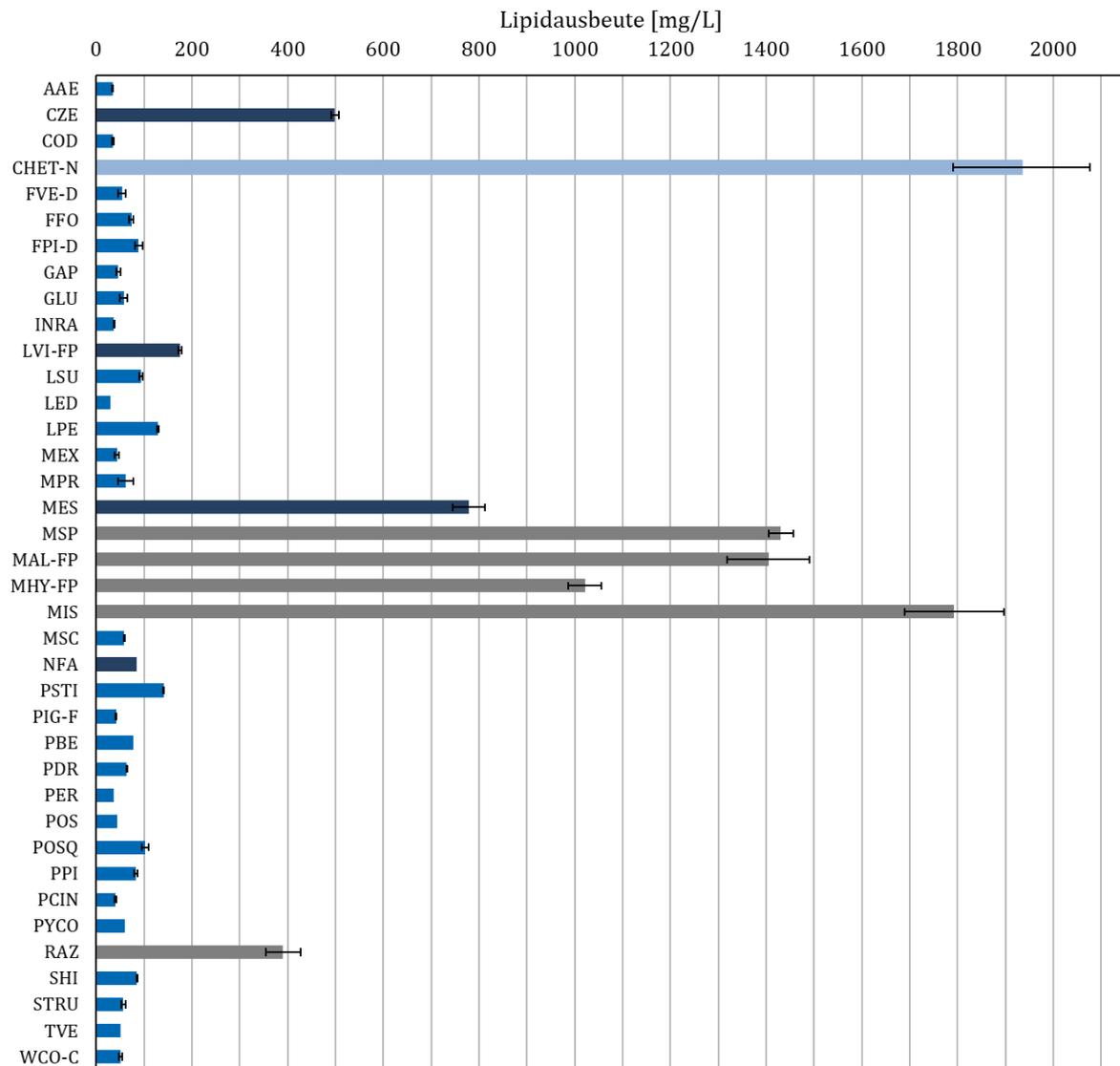


Abbildung 13: Lipidausbeuten der 38 untersuchten Pilzspezies pro Liter Hauptkulturmedium (blau: Basidiomycota, dunkelblau: Ascomycota, hellblau: Entomophthoromycotina, grau: Mucoromycotina). Im Falle von Mehrfachbestimmungen erfolgt die Fehlerangabe in Form des Standardfehlers.

3.1.2 Fettsäureprofile

Nach der Lipidextraktion wurden die Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern umgeestert (2.6.2.1) und deren Profile mittels GC-MS bestimmt (2.6.3). Bedingung für eine eindeutige Identifizierung war zunächst die Übereinstimmung der RIs nach van den Dool und Kratz (1963)

Ergebnisse

mit denjenigen authentischer Referenzsubstanzen auf zwei unterschiedlichen GC-Trennsäulen (VF-WAXms und Select FAME). Die Fettsäureprofile von FVE-D und MHY-FP wurden zusätzlich anhand einer dritten Trennsäule (DB-5ms) verifiziert. Die RIs (VF-WAXms, Select FAME und DB-5ms) aller untersuchten Referenzverbindungen finden sich in Tabelle A 1 (Anhang B). Darüber hinaus wurde eine gute Übereinstimmung des erhaltenen massenspektrometrischen Fragmentierungsmusters mit einem in der NIST-Datenbank hinterlegten Massenspektrum gefordert (R-Match > 850).

Im Folgenden finden sich die Fettsäureprofile für die 38 untersuchten Pilzspezies in alphabetischer Reihenfolge (Tabellen 58 bis 95). Vorläufig identifizierte Verbindungen sind entsprechend gekennzeichnet. Je nach Spezies wurden 8 bis 40 verschiedene Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₆ bis C₂₆ nachgewiesen. Darunter befanden sich sowohl gesättigte als auch (mehrfach) ungesättigte Verbindungen, die zum Teil konjugierte Doppelbindungen oder auch Methylverzweigungen aufwiesen. Die Ausbeuten wurden durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet.

Tabelle 58: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von AAE3. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,03
2	14:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,06 ± 0,0
3	15:0	0,4	0,4	0,4	± 0,0	0,1 ± 0,0
4	16:0	18,0	19,7	18,9	± 0,9	6,5 ± 0,1
5	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,03
6	17:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,03
7	18:0	0,8	1,2	1,0	± 0,1	0,3 ± 0,0
8	18:1(9Z)	1,6	1,5	1,5	± 0,02	0,5 ± 0,0
9	18:1(11Z)	2,1	2,2	2,2	± 0,05	0,7 ± 0,0
10	18:2(9Z,12Z)	76,7	74,3	76	± 1	26 ± 2
11	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,02	0,03 ± 0,0
12	20:2(11Z,14Z)	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,03
13	24:0 ⁺	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,03

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

Ergebnisse

Tabelle 59: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von CZE. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,5 ± 0,0
2	14:1(5Z)	< 0,1	0,0	0,0	< 0,1		< 0,5
3	15:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
4	16:0	29,6	29,7	29,6	29,6	± 0,0	148 ± 2
5	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
6	16:1(9Z)	1,1	1,1	1,0	1,1	± 0,0	5,3 ± 0,1
7	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
8	17:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
9	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
10	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
13	18:0	4,2	4,4	4,5	4,3	± 0,1	21,6 ± 0,1
14	18:1(9Z) ⁺	38,8	38,4	38,7	38,6	± 0,1	193 ± 3
15	18:1(11Z) ⁺	0,6	0,7	0,7	0,6	± 0,0	3,2 ± 0,0
16	18:2(9Z,12Z)	19,3	19,3	19,2	19,3	± 0,0	96 ± 2
17	19:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
18	18:3(9Z,12Z,15Z)	5,8	5,9	5,9	5,9	± 0,9	29,4 ± 0,3
19	20:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,5 ± 0,0
20	20:1(9Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
21	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
22	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
23	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
24	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
25	23:0	0,0	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,5
26	24:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,5

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 60: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von COD. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert			
1	6:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
2	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
3	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
4	14:0	0,3	0,2	0,4	0,3	± 0,1	0,1	± 0,0
5	15:0	0,4	0,4	0,5	0,4	± 0,0	0,2	± 0,0
6	16:0	17,1	16,3	18,3	17,2	± 0,6	6,2	± 0,5
7	16:1(7Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,05	± 0,0
8	16:1(9Z)	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,08	± 0,0
9	16:1(11Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,04	± 0,0
10	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
11	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
12	17:0	0,2	0,2	0,4	0,3	± 0,1	0,09	± 0,0
13	17:1(8Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
14	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
15	17:2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
16	17:2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
17	18:0	2,3	2,7	3,4	2,8	± 0,3	1,0	± 0,1
18	18:1(9Z)	4,1	5,8	6,8	5,5	± 0,8	2,0	± 0,3
19	18:1(11Z)	3,9	5,4	3,8	4,4	± 0,5	1,5	± 0,1
20	18:2(9Z,12Z) [†]	67,0	64,5	61,2	64	± 2	23	± 2
21	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
22	18:3(9Z,12Z,15Z) [†]	0,7	0,7	0,7	0,7	± 0,0	0,2	± 0,0
23	konjugierte 18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
24	18:3 [‡]	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,07	± 0,0
25	20:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,07	± 0,0
26	20:2(11Z,14Z)	0,1	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,06	± 0,0
27	18:3(9Z,11E,13E)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
28	22:0 [†]	0,2	0,2	0,3	0,3	± 0,0	0,09	± 0,0
29	24:0	0,3	0,2	0,7	0,4	± 0,2	0,1	± 0,1
30	24:1(15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04	
Summe Unbekannte		2,3	1,9	2,0	2,1	± 0,1	0,7	± 0,1

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 61: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von CHET-N. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	<i>i</i> 12:0 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
2	12:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	3,4 ± 0,2
3	<i>α</i> 13:0 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
4	13:0	1,1	1,2	1,2	± 0,0	22 ± 2
5	<i>i</i> 14:0	37,5	36,6	37,1	± 0,6	716 ± 5
6	14:0	6,3	6,0	6,2	± 0,2	119 ± 5
7	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
8	<i>α</i> 15:0	16,9	15,6	16,2	± 0,9	313 ± 10
9	15:0	5,4	5,4	5,4	± 0,0	105 ± 8
10	<i>i</i> 14:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
11	<i>i</i> 16:0	5,8	6,5	6,2	± 0,5	120 ± 15
12	16:0	9,5	9,8	9,7	± 0,2	187 ± 17
13	16:1(9Z)	0,3	0,3	0,3	± 0,0	5,9 ± 0,6
14	16:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
15	<i>α</i> 17:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	6,6 ± 0,4
16	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
17	17:0	0,1	0,1	0,1	± 0,0	2,7 ± 0,3
18	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
19	17:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
20	<i>i</i> 18:0 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
21	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
22	18:0	0,6	0,7	0,6	± 0,1	12 ± 2
23	18:1(9Z)	0,9	1,2	1,0	± 0,2	20 ± 4
24	18:1(11Z)	3,4	3,8	3,6	± 0,3	71 ± 9
25	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
26	18:2(9Z,12Z)	0,4	0,4	0,4	± 0,0	7,5 ± 0,6
27	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
28	18:3(6Z,9Z,12Z)	0,5	0,5	0,5	± 0,0	9 ± 1
29	19:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
30	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
31	20:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
32	PUFA [‡]	0,1	0,1	0,1	± 0,0	2,8 ± 0,2
33	20:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
34	20:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
35	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
36	20:3(8Z,11Z, 14Z)	0,5	0,6	0,5	± 0,0	11 ± 1
37	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	8,5	9,3	8,9	± 0,6	173 ± 20
38	20:5(5Z,8Z,11Z,11Z,17Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	2,3 ± 0,1
39	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9
40	24:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	6,3 ± 0,5
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,9

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 62: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
2	10:0	0,1	0,3	0,2	± 0,1	0,1 ± 0,0
3	11:0	0,1	0,3	0,2	± 0,1	0,1 ± 0,0
4	12:0	5,5	13,7	10	± 4	5 ± 2
5	12:1(5Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
6	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
7	13:0	0,3	0,6	0,5	± 0,2	0,2 ± 0,1
8	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
9	14:0	1,9	3,4	2,7	± 0,7	1,4 ± 0,2
10	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
11	15:0	1,9	2,9	2,4	± 0,5	1,3 ± 0,1
12	16:0	22,7	24,7	24	± 1	13 ± 1
13	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
14	16:1(9Z)	0,5	0,6	0,6	± 0,1	0,3 ± 0,0
15	16:1(11Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,05 ± 0,0
16	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
17	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	0,2	< 0,1		< 0,05
18	17:0	0,3	0,2	0,3	± 0,0	0,1 ± 0,0
19	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
20	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
21	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
22	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
23	18:0	6,8	3,9	5	± 2	3 ± 1
24	18:1(9Z)	15,9	11,7	14	± 2	8 ± 2
25	18:1(11Z)	0,9	0,7	0,8	± 0,1	0,4 ± 0,1
26	18:2(9Z,12Z)	37,3	32,5	35	± 2	19 ± 4
27	18:2 ^{‡,†}	0,9	0,7	0,8	± 0,1	0,4 ± 0,1
28	18:3(9Z,12Z, 15Z) [†]	3,5	2,6	3,0	± 0,4	1,7 ± 0,5
29	20:0	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,07 ± 0,0
30	23:0	0,1	0,2	0,1	± 0,0	0,06 ± 0,0
31	24:0	0,6	0,1	0,4	± 0,3	0,2 ± 0,2
Summe Unbekannte		< 0,1	0,1	< 0,1		< 0,05

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 63: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von FFO. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]					mittlere Ausbeute [mg/L] [#]		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Mittelwert			
1	14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,08	± 0,0
2	15:0	0,9	1,3	1,2	1,1	1,1	± 0,1	0,8	± 0,1
3	16:0	14,0	11,9	12,2	12,0	12,5	± 0,5	9,1	± 0,3
4	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
5	16:1(9Z)	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	± 0,0	0,2	± 0,0
6	16:1(11Z)	2,5	2,0	2,8	2,0	2,3	± 0,2	1,7	± 0,2
7	7Me-16:1(6Z) [‡]	0,5	0,9	0,8	0,9	0,8	± 0,1	0,6	± 0,1
8	17:0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0
9	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
10	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
13	18:0	0,2	0,6	0,5	0,5	0,5	± 0,1	0,3	± 0,1
14	18:1(9Z)	11,6	13,1	11,9	12,7	12,3	± 0,4	9,0	± 0,7
15	18:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2	± 0,0
16	18:2(9Z,12Z) [‡]	60,3	58,1	56,9	57,6	58,2	± 0,7	43	± 2
17	18:2 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
18	18:3(9Z,12Z,15Z) [‡]	9,0	10,6	12,1	11,5	10,8	± 0,7	8,0	± 0,9
19	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
20	20:2(11Z,14Z)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	± 0,0	0,09	± 0,0
21	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	
22	24:0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,08	± 0,0
23	24:1(15Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,07	± 0,0
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,07	

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 64: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von FPI-D. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	14:0	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
2	15:0	0,5	0,6	0,6	± 0,1	0,5 ± 0,0
3	15:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
4	16:0	7,5	8,3	7,9	± 0,4	7,0 ± 0,3
5	16:1(7Z)	0,1	0,2	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
6	16:1(9Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
7	16:1(11Z)	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,09
8	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
9	17:0	1,2	1,4	1,3	± 0,1	1,1 ± 0,0
10	17:1(8Z) [‡]	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
11	17:1(9Z)	0,2	0,3	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
13	17:2 [‡]	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
14	18:0	2,6	2,9	2,7	± 0,2	2,4 ± 0,1
15	18:1(9Z)	20,3	20,2	20,2	± 0,0	18 ± 2
16	18:2(9Z,12Z)	64,7	61,9	63	± 1	56 ± 7
17	18:2 [‡]	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
18	19:1 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
19	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,3	1,5	1,4	± 0,1	1,2 ± 0,1
20	20:1(11Z)	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
21	20:2(11Z,14Z)	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
22	24:0	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
23	25:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,09
24	26:0	0,1	0,4	0,2	± 0,1	0,2 ± 0,1
25	26:1 [‡]	0,1	0,3	0,2	± 0,1	0,2 ± 0,1

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 65: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von GAP. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]					mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
2	12:1(5Z) ⁺	< 0,1	0,0	0,0	0,0	< 0,1		< 0,05
3	13:0	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
4	14:0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,0 ± 0,0		0,5 ± 0,0
5	15:0	2,2	2,7	2,9	3,0	2,7 ± 0,2		1,2 ± 0,1
6	16:0	19,7	18,2	20,0	19,1	19,2 ± 0,4		8,9 ± 0,7
7	16:1(7Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
8	16:1(9Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0		0,05 ± 0,0
9	16:1(11Z)	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8 ± 0,0		0,4 ± 0,0
10	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
11	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
12	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
13	17:0	2,1	3,0	3,5	3,2	3,0 ± 0,3		1,4 ± 0,1
14	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	0,0	0,0	0,0	< 0,1		< 0,05
15	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
16	17:2 [‡]	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2 ± 0,0		0,1 ± 0,0
17	18:0	5,1	6,4	7,2	7,6	6,6 ± 0,5		3,0 ± 0,3
18	18:1(9Z)	5,1	6,2	6,3	7,7	6,3 ± 0,5		2,9 ± 0,3
19	18:1(11Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0		0,1 ± 0,0
20	18:2(9Z,12Z)	62,6	58,8	55,1	54,8	58 ± 2		27 ± 3
21	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
22	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
23	19:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
24	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,4	0,6	0,7	0,6	0,6 ± 0,1		0,3 ± 0,0
25	20:0	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
26	20:1(11Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
27	20:2(11Z,14Z)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1 ± 0,0		0,06 ± 0,0
28	20:5 (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) ⁺	< 0,1	0,2	0,0	0,0	< 0,1		< 0,05
29	22:0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,1 ± 0,0		0,06 ± 0,0
30	22:2(13Z,16Z) ⁺	< 0,1	0,0	0,0	0,0	< 0,1		< 0,05
31	23:0	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
32	24:0	0,2	0,3	0,5	0,7	0,4 ± 0,1		0,2 ± 0,0
33	25:0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1 ± 0,0		0,05 ± 0,0
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 66: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von GLU. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]					mittlere Ausbeute [mg/L] [#]			
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Mittelwert				
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
2	14:0	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	± 0,1	0,4	± 0,1	
3	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
4	15:0	1,4	1,6	1,3	1,3	1,4	± 0,1	0,8	± 0,1	
5	16:0	18,2	12,4	12,7	12,8	14	± 1	8	± 2	
6	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
7	16:1(9Z)	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	± 0,1	0,2	± 0,0	
8	16:1(11Z)	5,5	3,5	4,8	4,6	4,6	± 0,4	2,8	± 0,6	
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
10	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
11	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
12	17:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0	
13	17:1(8Z) [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
14	17:1(9Z)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	± 0,0	0,07	± 0,0	
15	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
16	17:2 [‡]	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,09	± 0,0	
17	18:0	0,8	1,4	1,3	1,2	1,2	± 0,1	0,7	± 0,1	
18	18:1(9Z)	12,6	14,0	15,3	14,6	14,1	± 0,6	8	± 1	
19	18:1(11Z)	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	± 0,1	0,2	± 0,1	
20	18:1(13Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
21	18:2(9Z,12Z)	58,3	62,7	58,5	60,1	60	± 1	34	± 4	
22	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
23	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
24	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
25	18:3 (9Z,12Z,15Z)	0,4	0,9	0,8	0,7	0,7	± 0,1	0,4	± 0,0	
26	20:0	< 0,1	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
27	20:1(11Z)	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,09	± 0,0	
28	20:2(11Z,14Z)	0,2	0,5	0,5	0,5	0,4	± 0,1	0,2	± 0,0	
29	22:0	0,0	0,0	< 0,1	0,0	< 0,1				
30	22:1(13Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
31	22:2(13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
32	24:0	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0	
33	24:1(15Z)	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,09	± 0,0	
34	25:0	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1				
35	25:1(16Z) [‡]	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	± 0,1	0,1	± 0,0	
36	26:1(17Z) [‡]	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,1	± 0,0	
Summe Unbekannte		0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	± 0,0	0,09	± 0,0	

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 67: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von INRA. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	12:0	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,04
2	14:0	0,1	0,2	0,1	± 0,0	0,05 ± 0,0
3	15:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,06 ± 0,0
4	16:0	16,3	15,1	15,7	± 0,6	5,8 ± 0,4
5	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
6	16:1(9Z)	0,1	0,2	0,1	± 0,0	0,05 ± 0,0
7	16:1(10Z) [‡]	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,04 ± 0,0
8	16:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,08 ± 0,0
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
10	16:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
11	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
12	17:0	0,1	0,2	0,1	± 0,1	0,05 ± 0,0
13	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
15	18:0	1,6	2,0	1,8	± 0,2	0,7 ± 0,1
16	18:1(9Z)	3,0	4,6	3,9	± 0,8	1,4 ± 0,3
17	18:1(11Z)	3,4	2,7	3,1	± 0,4	1,1 ± 0,2
18	18:2(9Z,12Z) [†]	73,4	72,0	72,7	± 0,7	27,0 ± 0,9
19	18:2 ^{‡,†}	0,4	1,2	0,8	± 0,4	0,3 ± 0,2
20	18:2 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
21	18:2 [‡]	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,04
22	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,5	0,6	0,6	± 0,1	0,2 ± 0,0
23	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
24	20:1(11Z)	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,04
25	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
26	18:3(9Z,11E,13E)	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,04
27	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
28	18:3 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,04
29	18:3 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
30	22:1(13Z)	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,04
31	24:0	0,0	0,2	0,1	± 0,1	0,04 ± 0,0
Summe Unbekannte		0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,04 ± 0,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 68: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von LVI-FP. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert			
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
2	14:0	0,4	0,5	0,5	0,5	± 0,0	0,8	± 0,0
3	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
4	15:0	0,9	1,1	0,9	1,0	± 0,1	1,7	± 0,1
5	16:0	27,9	28,7	28,7	28,4	± 0,3	49,8	± 0,8
6	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
7	16:1(9Z)	1,1	1,2	1,1	1,1	± 0,0	1,9	± 0,1
8	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
9	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
10	17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,2	± 0,0
11	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
12	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
13	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
15	18:0	5,2	4,8	5,1	5,0	± 0,1	8,8	± 0,3
16	18:1(9Z) [†]	31,2	30,7	31,4	31,1	± 0,2	55	± 1
17	18:1(11Z) [†]	0,8	0,6	0,7	0,7	± 0,0	1,2	± 0,1
18	18:2(9Z,12Z)	30,5	30,8	30,5	30,6	± 0,1	54	± 1
19	18:3 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
20	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
21	20:0	0,2	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,3	± 0,1
22	20:1(9Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
23	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
24	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
25	21:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
26	22:0	0,3	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,4	± 0,1
27	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
28	22:2(13Z,16Z)	0,1	0,0	0,0	< 0,1		< 0,2	
29	23:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
30	24:0	0,7	0,6	0,4	0,6	± 0,1	1,0	± 0,2
31	25:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,2	

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 69: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von LSU.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%] ^x	Ausbeute [mg/L] [#]
1	15:0	0,2	0,2
2	16:0	11,1	10,4
3	16:1(11Z)	0,4	0,3
4	7Me-16:1(6Z) [‡]	0,2	0,2
5	17:0	0,8	0,7
6	18:0	1,2	1,1
7	18:1(9Z)	17,0	15,9
8	18:2(9Z,12Z)	69,2	65,1

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

Tabelle 70: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von LED.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	6:0	< 0,1	< 0,03
2	8:0	< 0,1	< 0,03
3	10:0	< 0,1	< 0,03
4	12:0	< 0,1	< 0,03
5	14:0	0,7	0,2
6	15:0	0,4	0,1
7	16:0	25,2	7,6
8	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,03
9	16:1(11Z)	0,1	0,04
10	17:0	0,3	0,08
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,03
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,03
13	18:0	4,9	1,5
14	18:1(9Z)	4,3	1,3
15	18:1(11Z)	0,1	0,03
16	18:2(9Z,12Z)	62,4	18,9
17	20:0	< 0,1	< 0,03
18	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,03
19	22:0	< 0,1	< 0,03
20	24:0	0,8	0,2
21	25:0	< 0,1	< 0,03
Summe Unbekannte		0,3	0,09

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

Ergebnisse

Tabelle 71: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von LPE. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert			
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
2	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
3	14:0	1,3	1,5	1,5	1,4	± 0,0	1,8	± 0,1
4	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
5	15:0	0,1	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2	± 0,0
6	16:0 [†]	38,3	38,4	36,9	37,9	± 0,5	49	± 1
7	16:1(7Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
8	16:1(9Z) [†]	1,0	1,0	1,0	1,0	± 0,0	1,3	± 0,0
9	16:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
10	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
11	17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0
12	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
13	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
15	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
16	18:0	3,5	3,5	3,8	3,6	± 0,1	4,7	± 0,1
17	18:1(9Z) [†]	21,9	22,5	22,8	22,4	± 0,3	29,0	± 0,6
18	18:1(11Z) [†]	1,2	1,1	1,1	1,1	± 0,0	1,5	± 0,1
19	18:2(9Z,12Z)	29,4	28,9	29,0	29,1	± 0,2	37,6	± 0,6
20	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
21	18:3(9Z,12Z,15Z)	2,1	2,0	2,3	2,1	± 0,1	2,8	± 0,1
22	20:0	0,1	0,1	0,2	0,2	± 0,0	0,2	± 0,0
23	20:1(9Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
24	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
25	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
26	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
27	22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,3	± 0,0
28	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
29	23:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,13	
30	24:0	0,2	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,3	± 0,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 72: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MEX. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
2	i14:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
3	14:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,07 ± 0,0
4	15:0	1,7	2,0	1,9	± 0,1	0,8 ± 0,0
5	16:0	20,6	20,9	20,7	± 0,2	8,9 ± 0,8
6	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
7	16:1(11Z)	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,06 ± 0,0
8	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
9	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
10	17:0	0,8	0,8	0,8	± 0,0	0,3 ± 0,0
11	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
13	17:2 [‡]	0,4	0,5	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
14	18:0	1,2	0,9	1,0	± 0,2	0,4 ± 0,1
15	18:1(9Z)	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
16	18:2(9Z,12Z)	74,0	73,8	73,9	± 0,1	32 ± 3
17	19:1(10Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
18	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,06 ± 0,0
19	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
20	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
21	23:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
22	24:0	0,3	0,2	0,3	± 0,0	0,1 ± 0,0
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 73: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MPR. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	6:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
2	8:0 [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
3	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
4	14:0	0,2	< 0,1	< 0,1		< 0,06
5	α 15:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
6	15:0	0,7	0,7	0,7	$\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$
7	16:0	23,8	24,8	24,3	$\pm 0,5$	14 ± 4
8	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
10	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
11	17:0	1,7	1,9	1,8	$\pm 0,1$	1,0 $\pm 0,3$
12	17:1(9Z)	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
13	17:2 [‡]	0,7	0,6	0,7	$\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$
14	18:0	2,4	2,3	2,3	$\pm 0,1$	1,3 $\pm 0,3$
15	18:1(9Z)	3,5	1,1	2	± 1	1,1 $\pm 0,3$
16	18:2(9Z,12Z) [†]	65,7	67,5	66,6	$\pm 0,9$	38 ± 11
17	18:2 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
19	18:3(6Z,9Z,12Z) [†]	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,06
20	19:1 [†]	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,06
21	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
22	18:2(9Z,11E) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
23	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
24	20:1(11Z)	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,06
25	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
26	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,06
27	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
28	23:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
29	24:0	0,5	0,6	0,5	$\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,1$
30	25:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
Summe Unbekannte		0,2	0,2	0,2	$\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle 74: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MES.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	14:0	< 0,1	< 0,8
2	16:0	20,1	156,8
3	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,2
4	18:0	7,1	55,4
5	18:1(9Z)	29,9	232,9
6	18:2(9Z,12Z)	42,7	331,9
7	20:0	< 0,1	< 0,8
8	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,8

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

Ergebnisse

Tabelle 75: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MSP. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
2	13:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
3	14:0	2,8	2,9	2,0	2,6 ± 0,3	37	± 3
4	14:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
5	15:0	0,8	0,9	0,4	0,7 ± 0,2	10	± 2
6	16:0	35,4	36,3	34,9	35,5 ± 0,4	508	± 7
7	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
8	16:1(9Z)	0,2	0,3	0,2	0,2 ± 0,0	3,5	± 0,2
9	17:0	1,1	1,1	0,5	0,9 ± 0,2	13	± 2
10	17:1(9Z)	0,3	0,3	0,1	0,2 ± 0,0	3,3	± 0,6
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
13	18:0	8,5	8,2	8,7	8,5 ± 0,1	122	± 5
14	18:1(9Z) [†]	32,5	30,6	33,4	32,1 ± 0,8	461	± 23
15	18:1(11Z) [†]	0,9	0,9	0,9	0,9 ± 0,0	13,1	± 0,3
16	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
17	18:2(9Z,12Z)	2,7	3,5	2,4	2,9 ± 0,3	41	± 4
18	18:3(6Z,9Z,12Z) [†]	1,4	1,6	1,2	1,4 ± 0,1	20	± 1
19	19:0 ^{+,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
20	19:1 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
21	20:0	0,2	0,2	0,2	0,2 ± 0,0	2,4	± 0,1
22	20:1(11Z)	1,1	1,1	1,1	1,1 ± 0,0	15,8	± 0,6
23	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
24	20:3(5Z,11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
25	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,9	0,9	0,7	0,8 ± 0,1	11,8	± 0,6
26	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	8,0	8,3	7,1	7,8 ± 0,4	112	± 2
27	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
28	22:0	0,4	0,4	0,4	0,4 ± 0,0	5,5	± 0,3
29	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
30	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,2	0,2	0,2	0,2 ± 0,0	2,7	± 0,3
31	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
32	24:0	1,6	1,4	1,5	1,5 ± 0,1	22	± 1
33	24:1(15Z)	0,3	0,3	0,3	0,3 ± 0,0	4,2	± 0,5
34	25:0	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0	1,6	± 0,3
35	26:0	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0	1,6	± 0,1

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 76: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MAL-FP. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
2	13:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
3	14:0	1,6	1,5	1,5	1,5	± 0,0	21 ± 2
4	14:1(11Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
5	15:0	0,4	0,4	0,4	0,4	± 0,0	5,2 ± 0,2
6	16:0 [†]	24,0	25,1	26,1	25,1	± 0,6	353 ± 17
7	16:1(7Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
8	16:1(9Z)	0,2	0,3	0,3	0,3	± 0,0	3,9 ± 0,1
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
10	17:0	0,3	0,4	0,4	0,4	± 0,0	5,0 ± 0,1
11	17:1(9Z)	< 0,1	0,2	0,1	0,1	± 0,0	1,7 ± 0,1
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
13	18:0	6,4	6,5	6,6	6,5	± 0,1	92 ± 5
14	18:1(9Z) [†]	16,0	20,6	17,6	18	± 1	252 ± 5
15	18:1(11Z) [†]	0,7	0,8	0,8	0,7	± 0,0	10,3 ± 0,2
16	18:2(9Z,12Z)	12,6	12,8	12,6	12,7	± 0,0	179 ± 10
17	18:3(6Z,9Z,12Z)	2,5	2,2	2,2	2,3	± 0,1	32 ± 3
18	19:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
19	20:0	0,3	0,3	0,3	0,3	± 0,0	4,2 ± 0,3
20	20:1(11Z)	0,5	0,6	0,5	0,5	± 0,0	7,4 ± 0,5
21	20:2(11Z,14Z)	0,5	0,4	0,3	0,4	± 0,1	5 ± 1
22	20:3(5Z,11Z,14Z)	0,3	0,2	0,2	0,2	± 0,0	2,8 ± 0,7
23	20:3(8Z,11Z,14Z)	2,5	2,2	2,00	2,2	± 0,1	31 ± 4
24	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	24,8	19,4	21,5	22	± 2	311 ± 41
25	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
26	22:0	1,3	1,3	1,3	1,3	± 0,0	18 ± 1
27	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
28	22:2(13Z,16Z)	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	2,7 ± 0,2
29	24:0 [†]	4,1	3,8	4,3	4,1	± 0,1	57 ± 4
30	24:1(15Z) [†]	0,4	0,3	0,3	0,3	± 0,0	4,5 ± 0,6
31	25:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4
32	26:0	0,4	0,4	0,5	0,4	± 0,0	6,1 ± 0,3
33	26:1(17Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,4

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 77: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	
2	13:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	
3	14:0	2,0	2,0	2,1	2,0	± 0,0	21 ± 1
4	15:0	2,3	2,5	2,1	2,3	± 0,1	23 ± 2
5	16:0 [†]	27,0	27,1	27,5	27,2	± 0,1	278 ± 14
6	16:1(7Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
7	16:1(9Z)	0,5	0,5	0,6	0,6	± 0,0	5,7 ± 0,4
8	17:0	4,4	4,6	3,7	4,3	± 0,3	44 ± 3
9	17:1(9Z)	2,1	2,3	2,0	2,1	± 0,1	22 ± 2
10	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
12	18:0	4,7	4,8	4,3	4,6	± 0,1	47 ± 2
13	18:1(9Z) [†]	42,9	41,7	42,0	42,2	± 0,4	431 ± 16
14	18:1(11Z) [†]	0,7	0,7	0,6	0,7	± 0,0	7,0 ± 0,3
15	18:2(9Z,12Z)	4,3	4,3	4,7	4,4	± 0,1	45 ± 3
16	18:3(6Z,9Z,12Z)	1,4	1,4	1,4	1,4	± 0,0	14,5 ± 0,8
17	19:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
18	19:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
19	19:1 [‡]	1,2	1,4	1,2	1,2	± 0,1	13 ± 1
20	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
21	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
22	20:1(11Z)	0,5	0,5	0,6	0,5	± 0,0	5,6 ± 0,6
23	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
24	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,7	0,7	0,8	0,8	± 0,0	7,8 ± 0,7
25	21:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
26	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	3,7	3,8	4,2	3,9	± 0,2	40 ± 3
27	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
28	22:0	< 0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	1,0 ± 0,2
29	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
30	22:2(13Z,16Z)	0,1	0,1	0,2	0,1	± 0,0	1,4 ± 0,3
31	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
32	24:0	0,4	0,4	0,6	0,5	± 0,1	4,9 ± 0,7
33	24:1(15Z)	0,3	0,5	0,5	0,4	± 0,0	4,3 ± 0,7
34	25:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0
35	26:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 78: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MIS. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
2	14:0	1,2	0,9	1,0	1,0	± 0,1	19 ± 2
3	15:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
4	16:0	29,6	29,9	29,7	29,7	± 0,1	533 ± 30
5	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
6	16:1(9Z)	1,4	1,8	1,7	1,7	± 0,1	29,6 ± 0,9
7	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
8	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
9	17:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
10	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
11	18:0	6,7	3,5	3,6	5	± 1	85 ± 24
12	18:1(9Z) [†]	55,5	51,9	53,3	54	± 1	963 ± 74
13	18:1(11Z) [†]	1,0	1,1	1,0	1,0	± 0,0	18 ± 1
14	18:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
15	18:2(9Z,12Z)	3,4	8,5	7,3	6	± 2	112 ± 23
16	18:3(6Z,9Z,12Z)	0,7	1,8	1,5	1,3	± 0,3	23 ± 5
17	18:3(9Z,12Z,15Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
18	20:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	2,2 ± 0,1
19	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
20	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
21	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8
22	24:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 1,8

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 79: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von MSC. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]*			mittlere Ausbeute [mg/L]#	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	6:0	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,06
2	8:0 [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
3	9:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
4	10:0	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,06
5	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
6	14:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
7	15:0	1,7	1,6	1,6	± 0,0	1,0 ± 0,0
8	16:0	23,5	23,8	23,7	± 0,2	13,9 ± 0,1
9	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
10	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
11	16:1(11Z)	0,3	0,2	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
12	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
13	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	0,0	< 0,1		< 0,06
14	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
15	17:0	0,4	0,3	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
16	17:1(8Z) ^{‡,†}	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
17	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
18	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
19	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
20	18:0	6,8	5,9	6,4	± 0,4	3,7 ± 0,3
21	18:1(9Z)	5,0	3,7	4,3	± 0,6	2,5 ± 0,4
22	18:1(11Z)	0,4	0,4	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
23	18:2(9Z,12Z)	58,1	63,0	61	± 3	35,5 ± 0,9
24	18:2 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
25	18:3 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
26	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
27	18:3(6Z,9Z,11E) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
28	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
29	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
30	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
31	22:0	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
32	23:0	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,09 ± 0,0
33	24:0	1,8	1,5	1,6	± 0,2	1,0 ± 0,1
34	25:0 [†]	0,4	0,3	0,4	± 0,1	0,2 ± 0,0
Summe Unbekannte		0,7	0,6	0,6	± 0,1	0,4 ± 0,0

* die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 80: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von NFA. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
2	14:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
3	15:0	0,4	0,5	0,4	± 0,0	0,4 ± 0,0
4	16:0	22,3	22,5	22,4	± 0,1	18,9 ± 0,1
5	16:1(9Z)	0,9	0,9	0,9	± 0,0	0,7 ± 0,0
6	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
7	17:0	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,08 ± 0,01
8	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
9	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
10	18:0 [†]	2,9	3,1	3,0	± 0,1	2,5 ± 0,1
11	18:1(9Z) [†]	18,2	19,1	18,7	± 0,4	15,7 ± 0,3
12	18:1(11Z) [†]	0,8	0,3	0,5	± 0,3	0,5 ± 0,2
13	18:2(9Z,12Z)	49,0	48,1	48,5	± 0,4	40,9 ± 0,4
14	18:3(9Z,12Z,15Z)	4,6	4,5	4,5	± 0,0	3,8 ± 0,0
15	20:0 [†]	< 0,1	0,1	< 0,1		< 0,08
16	20:1(11Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
17	22:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
18	24:0 [†]	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
19	24:1(15Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 81: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PSTI. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%] ^x			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	6:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
2	8:0 [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
3	10:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
4	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
5	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
6	14:0	0,4	0,4	0,4	± 0,0	0,6 ± 0,0
7	14:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
8	15:0	1,4	1,6	1,5	± 0,1	2,1 ± 0,1
9	15:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
10	15:1 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
11	16:0	23,4	23,0	23,2	± 0,2	32,6 ± 0,0
12	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
13	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
14	16:1(11Z)	1,1	0,8	0,9	± 0,1	1,3 ± 0,2
15	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
16	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
17	17:0	0,7	0,8	0,7	± 0,0	1,0 ± 0,1
18	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
19	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
20	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
21	18:0	9,8	9,2	9,5	± 0,3	13,4 ± 0,3
22	18:1(9Z)	5,7	4,9	5,3	± 0,4	7,5 ± 0,5
23	18:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,3 ± 0,0
24	18:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
25	18:2(9Z,12Z)	54,2	56,0	55,1	± 0,9	78 ± 2
26	18:2 [‡]	1,2	0,9	1,0	± 0,1	1,5 ± 0,2
27	18:3(9Z,12Z,15Z) [†]	0,4	0,6	0,5	± 0,1	0,7 ± 0,1
28	19:1(10Z) ^{+†}	0,7	0,8	0,8	± 0,1	1,1 ± 0,1
29	20:0	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
30	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
31	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
32	21:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
33	22:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,4 ± 0,0
34	23:0	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
35	24:0	1,2	0,9	1,0	± 0,1	1,5 ± 0,2
36	24:1(15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
Summe Unbekannte		0,6	0,6	0,6	± 0,0	0,9 ± 0,0

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativer nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 82: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PIG-F. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	14:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
2	15:0	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,06 ± 0,0
3	16:0	19,7	19,4	19,5	± 0,1	8 ± 1
4	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
5	16:1(11Z)	0,5	0,4	0,5	± 0,0	0,2 ± 0,0
6	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
7	17:0	0,3	0,2	0,3	± 0,0	0,1 ± 0,0
8	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
9	18:0	2,1	2,1	2,1	± 0,0	0,9 ± 0,1
10	18:1(9Z)	0,8	0,8	0,8	± 0,0	0,3 ± 0,1
11	18:1(11Z)	0,9	0,8	0,8	± 0,0	0,3 ± 0,0
12	18:2(9Z,12Z)	75,4	75,8	75,6	± 0,2	32 ± 5
13	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
14	24:0 ⁺	0,0	< 0,1	< 0,1		< 0,04

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Tabelle 83: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PBE.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	7:0 ⁺	< 0,1	< 0,08
2	14:0	0,2	0,1
3	15:0	0,7	0,6
4	16:0	9,3	7,3
5	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,08
6	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,08
7	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,08
8	17:0	0,6	0,4
9	17:1(9Z)	0,3	0,2
10	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,08
11	18:0	0,8	0,7
12	18:1(9Z)	18,4	14,4
13	18:1(9Z,12Z)	67,3	52,4
14	18:2 [‡]	0,1	0,1
15	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,5	1,2
16	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,08
17	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,08
18	24:0	0,1	0,09
Summe Unbekannte		0,1	0,1

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 84: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PDR.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	14:0	0,1	0,08
2	15:0	< 0,1	< 0,07
3	16:0	19,0	12,7
4	16:1(7Z) [†]	< 0,1	< 0,07
5	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,07
6	18:0	5,2	3,5
7	18:1(9Z)	38,9	25,9
8	18:2(9Z,12Z)	36,1	24,0
9	20:0	< 0,1	< 0,07
10	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,07
11	22:0	< 0,1	< 0,07
12	24:0	0,3	0,2

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

Tabelle 85: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PER.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	14:0	0,1	0,04
2	15:0	1,1	0,4
3	16:0	17,2	6,2
4	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,04
5	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,04
6	16:1(11Z)	1,4	0,5
7	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,04
8	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,04
9	17:0	0,3	0,1
10	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,04
11	18:0	0,7	0,3
12	18:1(9Z)	2,9	1,1
13	18:2(9Z,12Z)	75,8	27,5
14	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,04
15	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,04
16	24:0	< 0,1	< 0,04
Summe Unbekannte		0,1	0,05

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

Ergebnisse

Tabelle 86: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von POS.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	14:0	0,2	0,1
2	15:0	1,1	0,5
3	16:0	16,2	7,1
4	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,04
5	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,04
6	16:1(11Z)	1,4	0,6
7	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,04
8	17:0	0,2	0,1
9	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,04
10	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,04
11	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,04
12	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,04
13	18:0	2,0	0,9
14	18:1(9Z)	15,2	6,6
15	18:2(9Z,12Z)	63,1	27,6
16	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,04
17	20:0	< 0,1	< 0,04
18	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,04
19	24:0	0,1	0,06
Summe Unbekannte		0,2	0,08

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

Ergebnisse

Tabelle 87: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von POSQ. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
2	13:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	
3	14:0	0,5	0,4	0,5	0,5	± 0,0	0,5 ± 0,1
4	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
5	15:0	1,8	1,8	1,9	1,9	± 0,1	2,0 ± 0,2
6	16:0 [†]	22,7	23,5	20,5	22,3	± 0,9	24 ± 1
7	16:1 ^{‡,†}	< 0,1	0,0	0,0	< 0,1		< 0,1
8	16:1(7Z) [†]	0,2	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
9	16:1(9Z) [†]	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
10	16:1(11Z)	0,2	0,2	0,3	0,3	± 0,1	0,3 ± 0,1
11	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
12	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
13	17:0	0,5	0,5	0,7	0,6	± 0,0	0,6 ± 0,1
14	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
15	17:1(9Z)	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,2 ± 0,0
16	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
17	18:0	2,7	2,5	3,1	2,8	± 0,2	3,0 ± 0,4
18	18:1(9Z)	28,5	29,8	28,1	28,8	± 0,5	31 ± 2
19	18:2(9Z,12Z)	38,7	37,2	40,3	38,8	± 0,9	42 ± 4
20	19:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
21	19:1 [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
22	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,3	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,3 ± 0,0
23	20:0	0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,2 ± 0,0
24	20:1(11Z)	< 0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
25	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
26	21:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,1
27	22:0	0,8	0,8	0,9	0,8	± 0,0	0,9 ± 0,1
28	22:1(13Z)	0,2	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
29	23:0	0,2	0,2	0,3	0,2	± 0,0	0,3 ± 0,0
30	24:0	1,0	0,9	1,2	1,0	± 0,1	1,1 ± 0,2
31	24:1(15Z)	0,3	0,2	0,3	0,3	± 0,0	0,3 ± 0,0
32	25:0	0,1	< 0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
Summe Unbekannte		0,1	0,1	0,1	0,1	± 0,3	0,1 ± 0,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 88: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PPI. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
2	i14:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
3	14:0	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
4	α15:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
5	15:0	0,4	0,4	0,4	± 0,0	0,3 ± 0,0
6	16:0	13,6	14,0	13,8	± 0,2	11,4 ± 0,4
7	16:1(9Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
8	16:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
10	16:2(9Z,12Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,08 ± 0,0
11	17:0	0,6	0,6	0,6	± 0,0	0,5 ± 0,0
12	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
13	17:2 [‡]	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
14	18:0	4,1	4,0	4,1	± 0,0	3,4 ± 0,2
15	18:1(9Z)	1,0	0,8	0,9	± 0,1	0,8 ± 0,1
16	18:1(11Z)	9,8	11,4	10,6	± 0,8	8,8 ± 0,3
17	18:2(9Z,12Z)	67,6	66,0	66,8	± 0,8	55 ± 3
18	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
19	20:0	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
20	20:2(11Z,14Z) ⁺	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,1 ± 0,0
21	18:3(9Z,11E,13E)	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0
22	22:0	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,2 ± 0,0
23	23:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,08
24	24:0	0,6	0,7	0,6	± 0,1	0,5 ± 0,0
Summe Unbekannte		0,6	0,5	0,5	± 0,0	0,4 ± 0,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

Ergebnisse

Tabelle 89: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PCIN. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0	0,1	0,2	0,2	± 0,1	0,07 ± 0,0
2	10:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
3	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
4	14:0	0,6	0,7	0,6	± 0,1	0,3 ± 0,0
5	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
6	15:0	0,4	0,4	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
7	16:0	20,6	21,6	21,1	± 0,5	8,6 ± 0,4
8	16:1(7Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,07 ± 0,0
9	16:1(9Z)	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,1 ± 0,0
10	16:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
11	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
12	17:0	0,4	0,5	0,5	± 0,0	0,2 ± 0,0
13	17:1(9Z)	0,1	0,2	0,2	± 0,0	0,06 ± 0,0
14	18:0	2,7	3,4	3,0	± 0,4	1,2 ± 0,2
15	18:1(9Z)	33,8	33,3	33,6	± 0,2	13,7 ± 0,2
16	18:2(9Z,12Z)	40,1	38,4	39,2	± 0,9	16,0 ± 0,0
17	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
18	20:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04
19	20:2(11Z,14Z)	0,2	0,0	< 0,1		< 0,04
20	24:0	0,5	0,6	0,5	± 0,1	0,2 ± 0,0
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,04

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

Ergebnisse

Tabelle 90: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von PYCO.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,06
2	14:0	0,2	0,1
3	15:0	1,7	1,0
4	16:0	20,2	12,0
5	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,06
6	16:1(9Z)	0,2	0,1
7	16:1(11Z)	0,3	0,2
8	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,06
9	7Me-16:1(6Z) [‡]	< 0,1	< 0,06
10	17:0	0,3	0,2
11	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,06
12	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,06
13	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,06
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,06
15	18:0	1,2	0,7
16	18:1(9Z)	26,1	15,5
17	18:2(9Z,12Z)	48,0	28,5
18	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,06
19	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,06
20	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,06
21	22:0	< 0,1	< 0,06
22	23:0	< 0,1	< 0,06
23	24:0	0,4	0,2
24	25:0 [†]	0,7	0,4
25	26:0	0,3	0,2
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,06

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 91: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von RAZ. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%] ^x					mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Mittelwert		
1	12:0	0,0	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
2	14:0	0,2	0,4	0,6	0,4	0,4	± 0,1	1,6 ± 0,3
3	14:1 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
4	15:0	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
5	16:0	13,3	13,0	15,3	13,9	13,9	± 0,5	54 ± 5
6	16:1(7Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
7	16:1(9Z)	1,9	1,6	2,4	1,7	1,9	± 0,2	7,2 ± 0,5
8	17:0	0,0	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
9	17:1(9Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
10	18:0	19,2	22,6	20,0	23,5	21,3	± 1,0	85 ± 12
11	18:1(9Z) [†]	58,6	45,2	44,4	44,7	48	± 4	186 ± 12
12	18:1(11Z) [†]	1,7	1,0	1,2	1,0	1,2	± 0,2	4,5 ± 0,2
13	18:2 [‡]	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
14	18:2(9Z,12Z) [†]	3,4	7,5	6,9	7,5	6	± 1	26 ± 6
15	18:2 ^{‡,†}	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
16	18:3(6Z,9Z,12Z)	1,1	3,4	3,4	3,6	2,9	± 0,6	12 ± 3
17	20:0	0,2	0,8	0,6	0,8	0,6	± 0,2	2,5 ± 0,8
18	20:1(11Z)	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	± 0,1	1,2 ± 0,3
19	20:2(11Z,14Z)	0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,4
20	22:0	0,1	0,6	0,5	0,7	0,5	± 0,1	2,0 ± 0,6
21	24:0	0,3	1,4	1,2	0,1	0,7	± 0,3	3 ± 1
22	26:0	0,0	1,1	1,9	1,2	1,1	± 0,4	4 ± 2
Summe Unbekannte		0,0	0,6	0,7	0,1	0,4	± 0,2	1,4 ± 0,7

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Tabelle 92: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von SHI.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%] ^x	Ausbeute [mg/L] [#]
1	14:0	0,2	0,2
2	15:0	0,2	0,1
3	16:0	19,8	16,6
4	16:1(9Z)	0,7	0,6
5	17:0	< 0,1	< 0,08
6	18:0	1,5	1,2
7	18:1(9Z)	20,0	16,8
8	18:2(9Z,12Z)	56,6	47,5
9	24:0	0,8	0,7
10	25:0	0,2	0,1
11	26:0	0,2	0,1

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

Ergebnisse

Tabelle 93: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von STRU. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
2	14:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
3	14:0	0,35	0,30	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
4	15:0	0,5	0,4	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
5	16:0	17,2	17,5	17,4	± 0,2	9,9 ± 0,7
6	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
7	16:1(9Z)	0,1	0,2	0,2	± 0,0	0,08 ± 0,0
8	16:1(11Z)	0,2	0,2	0,2	± 0,0	0,09 ± 0,0
9	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
10	17:0	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
11	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
12	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
13	17:2 [‡]	0,2	0,1	0,2	± 0,0	0,09 ± 0,0
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
15	18:0	3,2	1,9	2,6	± 0,7	1,5 ± 0,5
16	18:1(9Z)	4,8	5,2	5,0	± 0,2	2,8 ± 0,1
17	18:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
18	18:2(9Z,12Z)	68,6	71,5	70	± 2	40 ± 2
19	18:3(9Z,12Z,15Z)	0,3	0,3	0,3	± 0,0	0,2 ± 0,0
20	18:2(10E,12Z)	2,1	1,0	1,6	± 0,6	0,9 ± 0,4
21	20:0 [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
22	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
23	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
24	22:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,06
25	24:0	0,6	0,4	0,5	± 0,1	0,3 ± 0,1
Summe Unbekannte		0,9	0,3	0,6	± 0,3	0,4 ± 0,2

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

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

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

Ergebnisse

Tabelle 94: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von TVE.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	12:0 ⁺	< 0,1	< 0,06
2	14:0	0,3	0,1
3	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,06
4	15:0	0,7	0,4
5	16:0	21,1	10,6
6	16:1(7Z)	0,2	0,09
7	16:1(9Z)	0,1	0,06
8	16:1(11Z)	0,3	0,1
9	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,06
10	17:0	0,2	0,09
11	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,06
12	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,06
13	18:0	1,3	0,6
14	18:1(9Z) [†]	11,9	6,0
15	18:1(11Z) [†]	0,1	0,06
16	18:2(9Z,12Z)	59,5	30,0
17	18:3(9Z,12Z,15Z) [†]	3,2	1,6
18	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,06
19	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,06
20	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z) [†]	< 0,1	< 0,06
21	22:0	< 0,1	< 0,06
22	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,06
23	24:0	0,2	0,1
24	24:1(15Z)	0,2	0,07
Summe Unbekannte		0,4	0,2

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Ergebnisse

Tabelle 95: Mittels GC-MS analysiertes Fettsäureprofil von WCO-C. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Nr.	Fettsäure	Anteil [%] ^x			mittlere Ausbeute [mg/L] [#]	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Mittelwert		
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
2	10:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
3	12:0 ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
4	14:0	0,3	0,2	0,2	± 0,1	0,09 ± 0,0
5	15:0	0,5	0,5	0,5	± 0,0	0,2 ± 0,0
6	16:0	15,6	14,7	15,2	± 0,4	6,8 ± 0,2
7	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
8	16:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
9	16:1(11Z)	< 0,1	0,1	< 0,1		< 0,05
10	16:2(7Z,10Z)	0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
11	17:0	0,5	0,6	0,5	± 0,0	0,2 ± 0,0
12	17:1(8Z) [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
13	17:1(9Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
14	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
15	18:0	3,5	2,9	3,2	± 0,3	1,4 ± 0,0
16	18:1(9Z)	3,5	3,1	3,3	± 0,2	1,5 ± 0,0
17	18:2(9Z,12Z)	75,5	77,2	76,4	± 0,8	34 ± 3
18	18:2 [‡]	0,2	< 0,1	0,1	± 0,0	0,05 ± 0,0
19	18:3(9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1		< 0,05
20	20:1(11Z,14Z) [†]	0,1	0,1	0,1	± 0,0	0,05 ± 0,0
21	24:0	0,3	0,4	0,4	± 0,0	0,2 ± 0,0
Summe Unbekannte		0,1	0,2	0,1	± 0,0	0,1 ± 0,0

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

3.2 Einfluss der Kulturparameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren

3.2.1 Test diverser komplexer Standard-Nährmedien

FVE-D und MHY-FP wurden zunächst submers in diversen Nährmedien kultiviert, um ein möglichst optimales Ausgangsmedium für die Produktion der Zielverbindungen zu identifizieren (2.4.1).

3.2.1.1 *Flammulina velutipes*

Das Nährmedium beeinflusste sowohl die Menge der gebildeten BTM als auch deren Lipidgehalt (Abbildung 14).

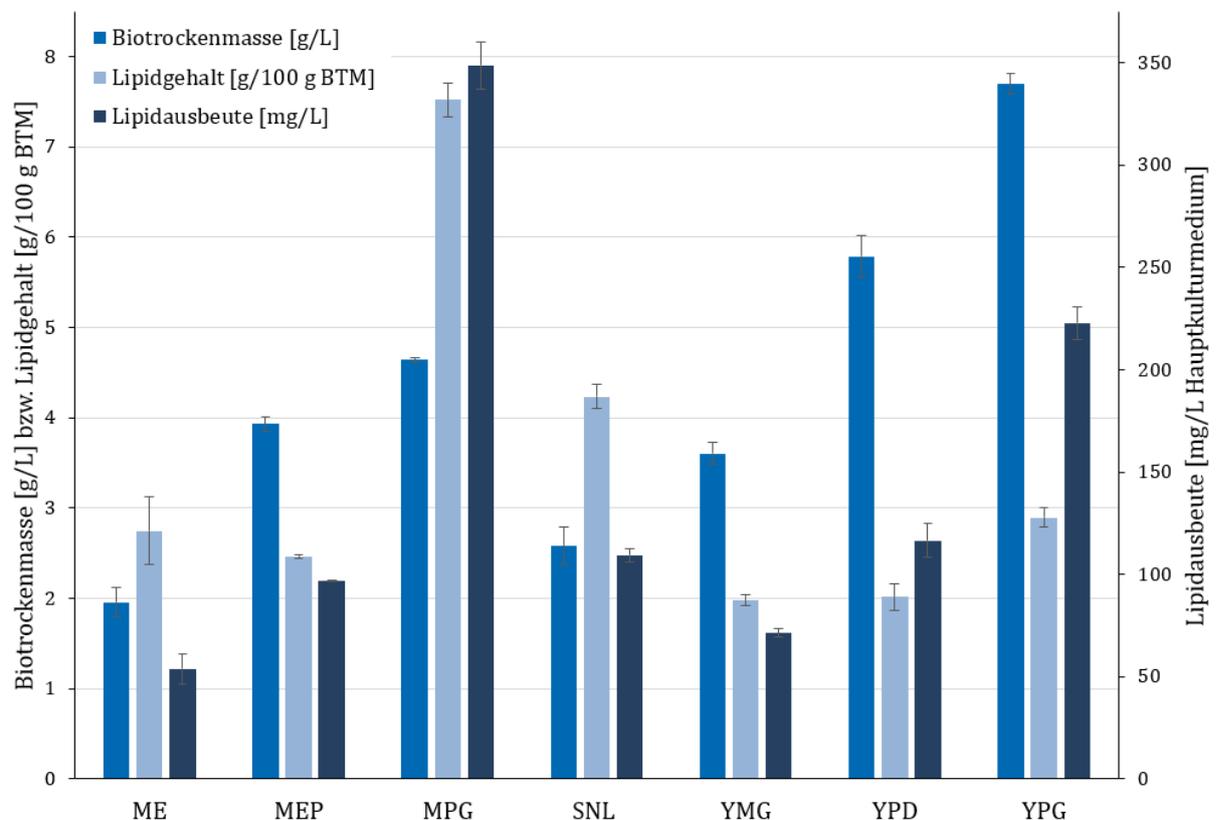


Abbildung 14: Produktion von Biotrockenmasse, Lipidgehalt und -ausbeute von FVE-D in Abhängigkeit des Nährmediums. Den Werten liegen mindestens biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Darüber hinaus waren Auswirkungen sowohl auf die qualitative wie auch quantitative Bildung von Fettsäuren und somit auch deren Ausbeuten zu beobachten (Tabellen A 2 und A 3 (Anhang C.1) sowie auszugsweise Tabelle 96).

Ergebnisse

Tabelle 96: Ausbeuten relevanter Fettsäuren im Myzel von FVE-D in Abhängigkeit des Nährmediums. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die Mittelwerte der biologischen Doppelbestimmungen dargestellt. Die primäre Zielverbindung ist rot eingefärbt. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Fettsäure	Fettsäureausbeute [mg/L Hauptkulturmedium] ^a						
	ME	MEP	MPG	SNL	YMG	YPD	YPG
12:1(5Z)	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
12:1(11)	n. d.	n. d.	15,1	< 0,1	n. d.	n. d.	0,2
16:1(9Z)	0,3	0,5	1,1	0,3	0,3	0,7	1,0
16:1(11Z)	0,3	0,2	0,6	0,2	0,0	0,0	0,2
16:2(9Z,12Z)	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
17:1(9Z)	0,0	0,1	0,3	0,1	0,0	0,1	0,2
17:2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2
17:2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1(11Z)	0,8	2,5	2,5	2,2	0,7	1,3	2,3

^a die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

3.2.1.2 *Mortierella hyalina*

Die Wahl des Nährmediums hatte auch im Falle von MHY einen großen Einfluss auf die Menge der gebildeten BTM und deren Lipidgehalt (Abbildung 15).

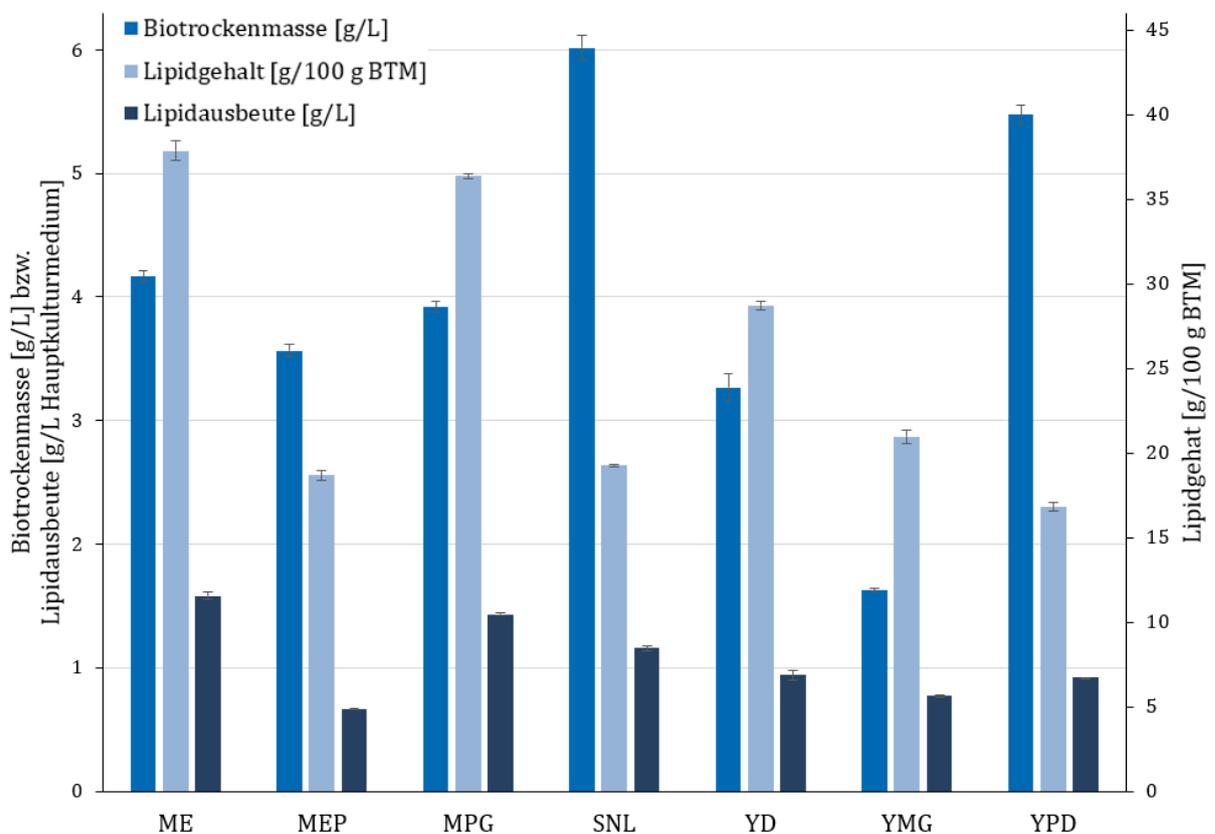


Abbildung 15: Produktion von Biotrockenmasse, Lipidgehalt und -ausbeute von MHY-FP in Abhängigkeit des Nährmediums. Den Werten liegen mindestens biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

Ergebnisse

Das Nährmedium beeinflusste auch die Fettsäurebiosynthese, sodass sich die Fettsäureprofile qualitativ wie auch quantitativ unterschieden (Tabellen A 10 und A 11 (Anhang C.2) sowie auszugswise Tabelle 97).

Tabelle 97: Ausbeuten relevanter Fettsäuren im Myzel von MHY-FP in Abhängigkeit des Nährmediums. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die Mittelwerte der biologischen Dreifachbestimmungen dargestellt. Die primäre Zielverbindung ist rot eingefärbt. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Fettsäure	Fettsäureausbeute [mg/L Hauptkulturmedium] ^a						
	ME	MEP	MPG	SNL	YD	YMG	YPD
14:1(9Z)	n. d.	0,0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1
16:1(9Z)	7,9	2,1	4,5	2,2	4,4	3,2	2,4
16:2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
16:2(7Z,10Z)	0,1	0,1	n. d.	n. d.	n. d.	0,1	n. d.
17:1(9Z)	1,9	5,9	2,3	1,8	43,6	3,6	25,9
17:2	0,2	0,7	0,4	0,4	1,0	0,4	5,4
17:2	0,1	0,4	0,0	0,1	1,2	0,2	0,3
18:1(11Z)	9,4	3,6	10,3	4,7	5,1	4,4	6,2

^a die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

3.2.2 Kultivierungstemperatur

FVE-D und MHY-FP wurden bei 16, 24 und 37 °C kultiviert (2.4.2), um den Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Wachstum der Pilze und die Ausbeuten der Zielsubstanzen zu untersuchen.

3.2.2.1 *Flammulina velutipes*

Bei der Kultivierung bei 37 °C war (auch nach längerer Kultivierung) kein Myzelwachstum feststellbar. Im Vergleich zur Standardkultivierungstemperatur von 24 °C produzierte der Pilz bei 16 °C mehr Biomasse und wies einen höheren Lipidgehalt auf, was eine erhöhte Ausbeute an Lipiden und auch der primären Zielverbindung Dodec-11-ensäure zur Folge hatte (Abbildung 16). Daneben waren bei 16 °C die relativen Anteile dieser Verbindung, einiger weiterer kurzkettiger Fettsäuren (12:0, 14:0) und Linolensäure erhöht. Dagegen wurden weniger langkettige Säuren (18:0, 22:0, 23:0, 24:0) gebildet (Tabelle A 4 (Anhang C.1)).

Ergebnisse

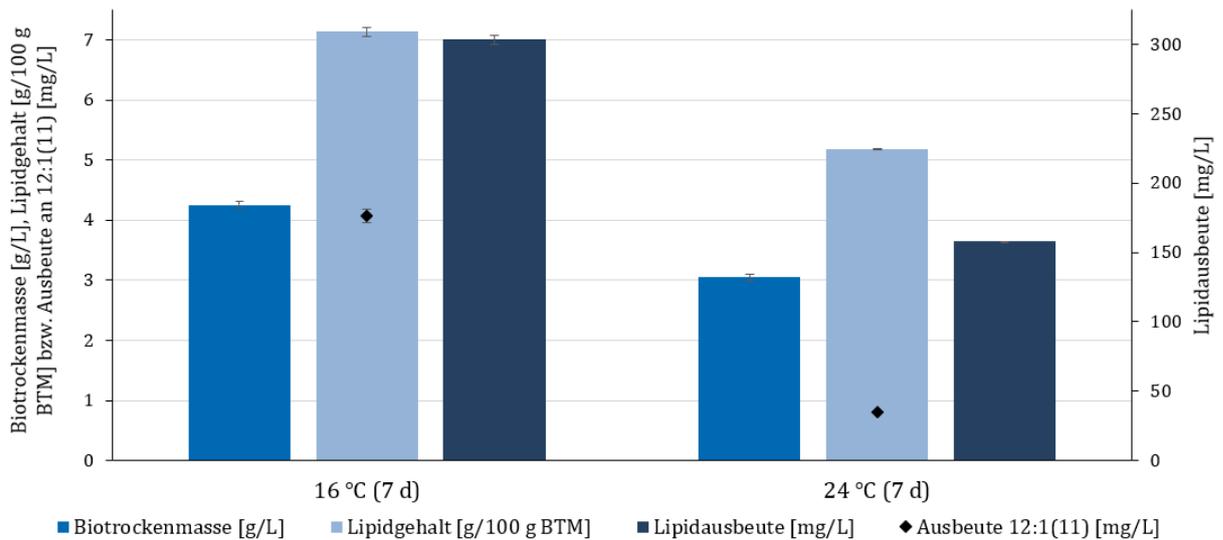


Abbildung 16: Produktion von Biotrockenmasse, Lipidgehalt und -ausbeute von FVE-D in Abhängigkeit der Kultivierungstemperatur. Die Ausbeute an 12:1(11) wurde durch den relativen Anteil am Fettsäureprofil berechnet. Den Werten liegen biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

3.2.2.2 *Mortierella hyalina*

Analog zu FVE-D war bei der Kultivierung von MHY-FP bei 37 °C kein Myzelwachstum feststellbar. Im Vergleich zur standardisierten Kultivierung bei 24 °C ergaben sich bei 16 °C nur marginale Unterschiede bezüglich der Bildung von Biomasse, Lipidgehalt und -ausbeute. Auch die Ausbeuten der primären Zielverbindung (9Z)-Heptadec-9-ensäure waren nahezu identisch (Abbildung 17). Abgesehen von minimalen Unterschieden waren die Fettsäureverteilungen bei beiden Temperaturen ebenfalls gleich (Tabelle A 12 (Anhang C.2)).

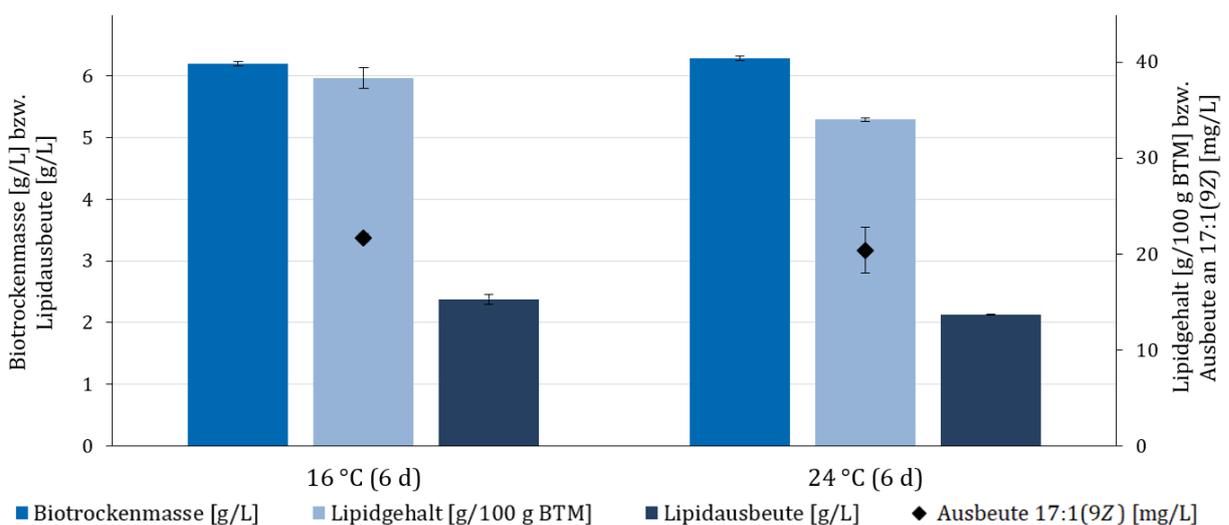


Abbildung 17: Produktion von Biotrockenmasse, Lipidgehalt und -ausbeute von MHY-FP in Abhängigkeit der Kultivierungstemperatur. Die Ausbeute an 17:1(9Z) wurde durch den relativen Anteil am Fettsäureprofil berechnet. Den Werten liegen biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form des Standardfehlers.

3.2.3 Kultivierungsdauer

Um den Einfluss der Kultivierungsdauer zu untersuchen, wurden Kulturen über einen längeren Zeitraum hinweg kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (2.4.3).

3.2.3.1 *Flammulina velutipes*

FVE-D wurde in MPG-Nährmedium kultiviert und nach 7, 21 und 33 Tagen geerntet. Dabei ließ sich erkennen, dass der Pilz innerhalb der ersten sieben Kulturstage den Großteil der Biomasse bildete und diese im weiteren Verlauf nur noch leicht zunahm (bis Kulturtag 21 auf ca. 4 g/L). Die Lipidproduktion (bis ca. 10,5 g/100 g BTM) erfolgte vor allem zwischen Kulturtag 7 und 21 (Abbildung 18). Das Fettsäureprofil unterlag je nach Kulturdauer Schwankungen, jedoch waren keine festen Muster erkennbar. Der Anteil der neben Dodec-11-ensäure möglicherweise interessanten ungesättigten Fettsäuren im Bereich C₁₂ bis C₁₈ blieb stets unverändert bei überwiegend < 0,1% (Tabelle A 5 (Anhang C.1)).

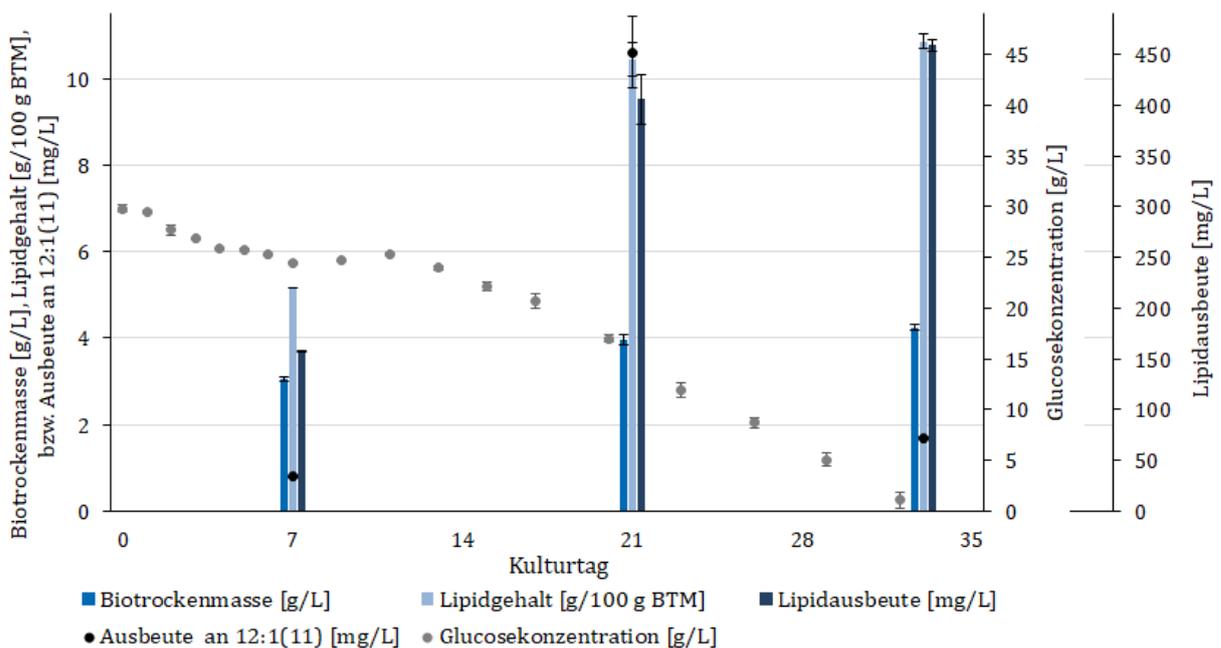


Abbildung 18: Produktion von Biotrockenmasse, Lipidgehalt des Myzels sowie Ausbeute an Lipiden und 12:1(11) durch FVE-D. Daneben ist die Glucosekonzentration im Kulturüberstand angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler der biologischen Doppelbestimmungen.

3.2.3.2 *Mortierella hyalina*

MHY-FP wurde 14 Tage kultiviert und die Myzelien nach 2, 4, 6, 10 sowie 14 Tagen geerntet. Die Bildung der Biomasse erfolgte vorwiegend in den ersten sechs Kulturtagen (bis etwa 6 g/L). Diese blieb bis zum zehnten Kulturtag nahezu konstant, wobei die Glucose aus dem Nährmedium bereits an Tag 8 nahezu vollends aufgebraucht war. Der Lipidgehalt und damit auch die Lipidausbeute stiegen hingegen noch bis zum zehnten Kulturtag auf etwa 35 g/100 g BTM bzw. 2 g/L leicht an. An Kulturtag 14 war eine Abnahme an Biomasse und Lipidgehalt zu beobachten (Abbildung 19).

Hinsichtlich des relativen Anteils der Zielverbindung (9Z)-Heptadec-9-ensäure am Fettsäureprofil ließ sich eine Abnahme von Kulturtag 2 (2,6%) bis 10 (0,6%) feststellen (Tabelle A 13 (Anhang C.2)). Durch die gegenläufige Entwicklung der Lipidausbeute wurde die maximale Ausbeute von 17:1(9Z) an den Kulturtagen 4 bis 6 ermittelt (Abbildung 19).

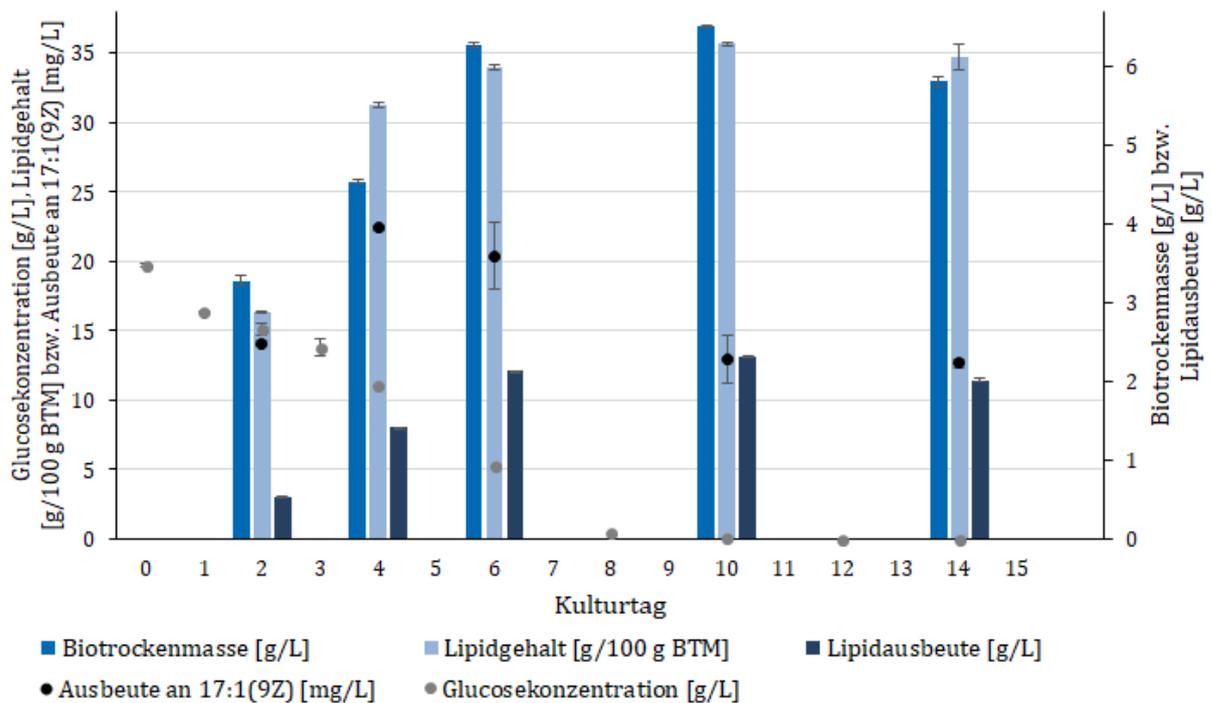


Abbildung 19: Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Produktion an Biotrockenmasse, Lipidgehalt sowie Ausbeute an Lipiden und 17:1(9Z) durch MHY-FP. Daneben ist die Glucosekonzentration im Kulturüberstand des Pilzes aufgetragen. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler der biologischen Doppelbestimmungen.

3.2.4 Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (*Flammulina velutipes*)

Für FVE-D sollte der Einfluss der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie deren Verhältnis näher untersucht werden. Der Pilz wurde hierfür über die Dauer von 21 Tagen in MPG-Medien unterschiedlicher C/N-Verhältnisse kultiviert (2.4.4.1). Dasselbe Medium wurde zur 7-tägigen Kultivierung genutzt und wahlweise die Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle variiert (2.4.4.2).

3.2.4.1 Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis

Die Elementaranalyse ergab die C/N-Verhältnisse der verwendeten Medien (Tabelle 98).

Tabelle 98: Ergebnisse der Elementaranalyse der Nährmedien unter Angabe der C/N-Verhältnisse.

Medium	Kohlenstoffgehalt [g/L]	Stickstoffgehalt [g/L]	C/N-Verhältnis
niedriges C/N-Verhältnis (5 g Pepton)	15,3	0,64	25
mittleres C/N-Verhältnis (3 g Pepton)	14,5	0,40	35
hohes C/N-Verhältnis (1 g Pepton)	13,6	0,17	80

Aus der Analyse der Glucose-Gehalte im Kulturüberstand war ersichtlich, dass alle Kulturen bis zum Erntezeitpunkt mit ausreichend Glucose versorgt waren. Ab Tag 4 war der bis zur Ernte anhaltende Trend zu beobachten, dass der Pilz mit steigendem Stickstoff-Gehalt im Medium (sinkendes C/N) mehr Glucose verbrauchte (Abbildung 20), was mit einer verstärkten Bildung an Biomasse einherging. Gleichzeitig wurde dabei jedoch die geringste relative Menge an Lipiden gebildet. Eine gesteigerte Lipidakkumulation erfolgte dagegen im Stickstoff-ärmeren Medium mit höherem C/N-Verhältnis (Abbildung 21).

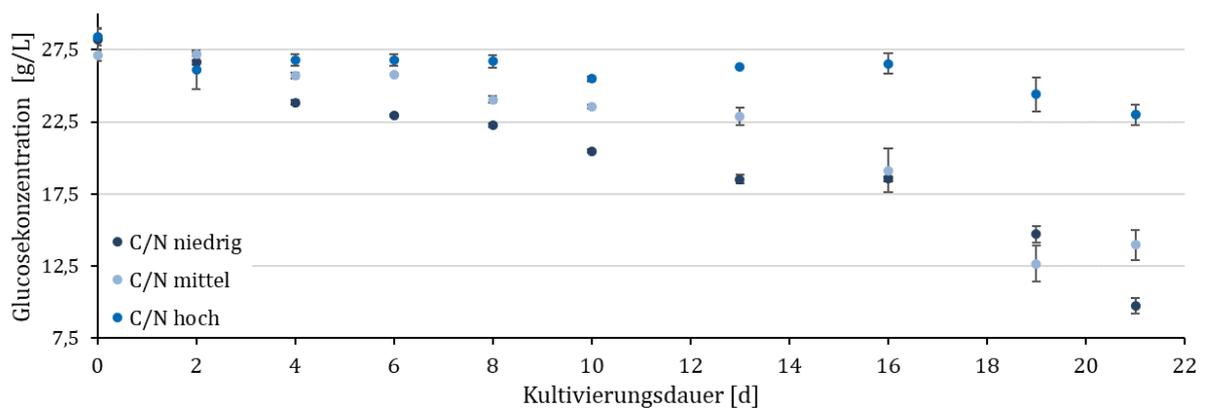


Abbildung 20: Glucoseverbrauch bei der Kultivierung von FVE-D in MPG-Medium in Abhängigkeit des verwendeten C/N-Verhältnisses. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die Fehlerangabe erfolgt in Form des Standardfehlers.

Ergebnisse

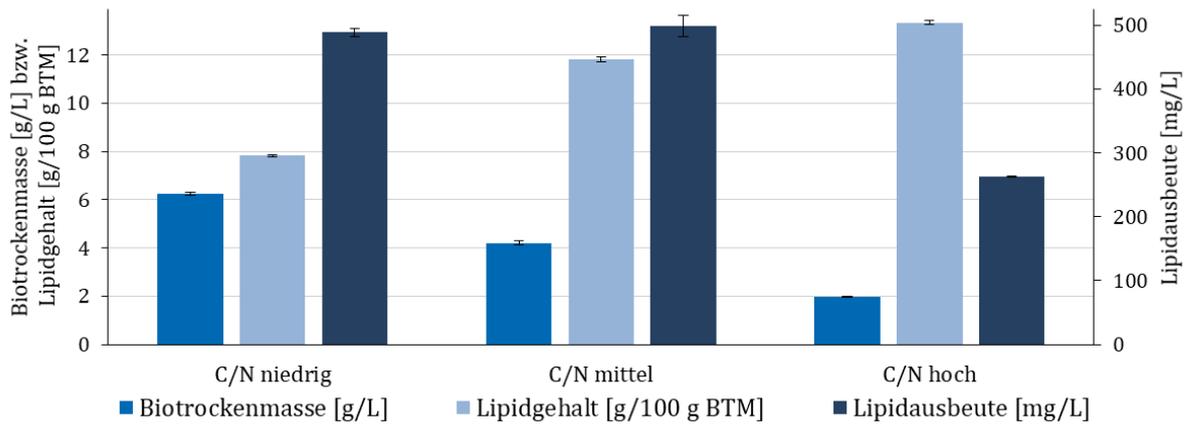


Abbildung 21: Biotrockenmassen, Lipidgehalte und -ausbeuten für FVE-D nach 21-tägiger Kultivierung in Abhängigkeit des C/N-Verhältnisses des verwendeten Nährmediums. Den BTM liegen biologische Vierfach-, den Lipiden biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Fehlerangabe erfolgt in Form des Standardfehlers.

3.2.4.2 Kohlenstoffquelle

Die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen beeinflussten die Bildung an Biomasse, aber auch den Lipidgehalt der Myzelien. Die höchste Lipidausbeute wurde durch die Zugabe von Saccharose erzielt. Bei Verwendung des Nährmediums ohne Zugabe einer weiteren Kohlenstoffquelle (Blindwert) wurden die geringsten Ausbeuten erhalten (Tabelle 99).

Tabelle 99: Ausbeute an Biotrockenmasse und Lipiden für FVE-D in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle. Der BTM liegen biologische Vierfach-, den Lipiden biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die Fehlerangabe erfolgt in Form des Standardfehlers.

Kohlenstoffquelle	BTM [g/L] [#]	Lipidgehalt [g/100 g BTM]	Lipidausbeute [mg/L] [#]
Zuckeralkohole			
Sorbitol	2,48 ± 0,02	6,3 ± 0,1	156,2 ± 0,7
Monosaccharide			
Fructose	2,77 ± 0,02	7,5 ± 0,2	208 ± 7
Glucose	3,06 ± 0,06	7,0 ± 0,0	215 ± 4
Xylose	2,82 ± 0,03	6,2 ± 0,0	175 ± 3
Disaccharide			
Cellobiose	2,34 ± 0,01	6,3 ± 0,2	148 ± 5
Lactose	2,41 ± 0,01	4,7 ± 0,0	113 ± 1
Maltose	2,35 ± 0,02	8,2 ± 0,1	193 ± 3
Saccharose	3,15 ± 0,04	7,0 ± 0,5	221 ± 15
Blindwert			
ohne weitere C-Quelle	1,47 ± 0,05	4,5 ± 0,1	66 ± 2

[#] die Einheit versteht sich als g bzw. mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum); die Ausbeute an 12:1(11) wurde durch den relativen Anteil am Fettsäureprofil berechnet

Ergebnisse

Die Analyse der Fettsäureprofile ergab für die meisten Zielverbindungen lediglich eine geringfügige Variation der quantitativen Verhältnisse. Eine Steigerung über einen relativen Anteil von > 0,1% wurde für die meisten Zielverbindungen nicht erreicht. Ausnahmen bildeten die primäre Zielverbindung 12:1(11) sowie 16:1(9Z), 16:1(11Z) und 18:1(11Z), die durch die Kohlenstoffquelle stärker beeinflusst wurden. Bei Verwendung von Maltose wurde mit etwa 10 mg/L die höchste Ausbeute an Dodec-11-ensäure erreicht (Tabellen A 6 und A 7 (Anhang C.1) sowie für 12:1(11) auszugsweise Tabelle 100).

Tabelle 100: Ausgewählte Fettsäureausbeuten aus dem Myzel von FVE-D, kultiviert unter Verwendung von MPC-Medium mit diversen Kohlenstoffquellen. Den angegebenen Werten liegen biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die primäre Zielverbindung ist rot eingefärbt.

Fettsäure	Fettsäureausbeute [mg/L] [#]								
	Sor	Fru	Glc	Xyl	Cel	Lac	Mal	Sac	Blindwert
12:1(5Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,07
12:1(11)	2,3	1,3	1,8	0,4	2,7	1,1	9,9	2,1	0,2
16:1(9Z)	0,4	0,6	0,7	0,7	0,3	0,3	0,5	0,8	0,2
16:1(11Z)	0,3	0,4	0,4	0,4	< 0,2	0,2	0,3	0,5	< 0,07
16:2(9Z,12Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,07
17:1(9Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,07
17:2 [‡]	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,07
17:2 [‡]	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,07
18:1(11Z)	1,5	2,2	2,2	2,1	1,4	1,3	1,5	2,3	0,6

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum); die Ausbeute von 12:1(11) wurde durch den relativen Anteil am Fettsäureprofil berechnet; den Werten liegt eine Doppelbestimmung zugrunde

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

3.2.4.3 Stickstoffquelle

Auch die Verwendung diverser Stickstoffquellen wirkte sich unterschiedlich auf die Bildung von Biomasse und deren Lipidgehalt aus. Fleischpepton lieferte die höchste Ausbeute an Lipiden (Tabelle 101).

Tabelle 101: Ausbeute an Biotrockenmasse und Lipiden für FVE-D in Abhängigkeit der verwendeten Stickstoffquelle. Der BTM liegt eine biologische Vierfach-, den Lipiden eine biologische Doppelbestimmung zugrunde. Die Fehlerangabe erfolgt in Form des Standardfehlers.

Stickstoffquelle	BTM [g/L] [#]	Lipidgehalt [g/100 g BTM]	Lipidausbeute [mg/L] [#]
Caseinpepton	2,97 ± 0,06	6,0 ± 0,1	178,9 ± 0,1
Erbsenpepton	2,80 ± 0,04	6,2 ± 0,1	174 ± 3
Fleischpepton	2,05 ± 0,02	12,9 ± 0,4	265 ± 8
Gelatinepepton	1,53 ± 0,03	10,0 ± 0,1	153 ± 4

Ergebnisse

Tabelle 101 (Fortsetzung)

Stickstoffquelle	BTM [g/L] [#]	Lipidgehalt [g/100 g BTM]	Lipidausbeute [mg/L] [#]
Lactalbuminpepton	3,08 ± 0,02	6,1 ± 0,1	187 ± 3
Milchpepton	2,87 ± 0,03	5,7 ± 0,3	165 ± 11
Milchprotein	2,29 ± 0,06	5,5 ± 0,0	126 ± 4
Saubohnenpepton	2,83 ± 0,02	5,2 ± 0,1	146 ± 5
Sojapepton	3,31 ± 0,02	6,7 ± 0,1	221 ± 4
Sojaprotein	1,50 ± 0,02	8,0 ± 0,2	121 ± 2

[#] die Einheit versteht sich als g bzw. mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum)

Die Analyse der Fettsäureprofile ergab ähnliche Ergebnisse wie bei Variation der Kohlenstoffquelle: Für die meisten Zielverbindungen ergaben sich lediglich geringe Variationen der quantitativen Verhältnisse. Ausnahmen bildeten die primäre Zielverbindung 12:1(11) sowie 16:1(9Z), 16:1(11Z) und 18:1(11Z) (Tabellen A 8 und A 9 (Anhang C.1) sowie auszugsweise Tabelle 102).

Die Untersuchung der Medien-Blindwerte ergab, dass praktisch keine Lipide als Verunreinigungen in den verwendeten Stickstoffquellen vorhanden waren.

Tabelle 102: Ausgewählte Fettsäureausbeuten aus dem Myzel von FVE-D, kultiviert unter Verwendung von MPG-Medium mit diversen Stickstoffquellen. Den angegebenen Werten liegen biologische Doppelbestimmungen zugrunde. Die primäre Zielverbindung ist rot eingefärbt.

Fettsäure	Fettsäureausbeute [mg/L] [#]									
	Casein-pepton	Erbsen-pepton	Fleisch-pepton	Gelatine-pepton	Lact-albumin-pepton	Milch-pepton	Milch-protein	Sau-bohnen-pepton	Soja-pepton	Soja-protein
12:1(5Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,1
12:1(11)	< 0,2	< 0,2	7,6	1,5	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	0,9	2,3
16:1(9Z)	0,7	0,4	< 0,3	0,2	0,6	0,4	0,4	0,4	0,8	0,2
16:1(11Z)	0,4	< 0,2	< 0,3	< 0,2	0,5	0,2	< 0,1	0,2	0,4	0,1
16:2(9Z,12Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,1
17:1(9Z)	< 0,2	< 0,2	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,1
17:2 [‡]	< 0,2	< 0,2	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,1
17:2 [‡]	< 0,2	< 0,2	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,2	< 0,1
18:1(11Z)	2,3	2,0	1,6	0,9	2,4	2,0	1,2	1,8	2,6	1,4

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum); die Ausbeute von 12:1(11) wurde durch den relativen Anteil am Fettsäureprofil berechnet; den Werten liegt eine Doppelbestimmung zugrunde

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

3.2.5 Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren

(Mortierella hyalina)

Zur Steigerung der Ausbeute an (9Z)-Heptadec-9-ensäure wurde das YD-Medium für MHY-FP mit verschiedenen Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren supplementiert (2.4.5). Im Vergleich zur nicht supplementierten Kultur wurden Erhöhungen, aber auch Erniedrigungen des Anteils dieser Verbindung am Fettsäureprofil erhalten. Eine besonders deutliche Steigerung wurde bei Verwendung von L-Isoleucin erzielt (Abbildung 22). Gleichzeitig waren die Anteile weiterer ungeradzahliger (15:0, 17:0 und 19:1) zugunsten mehrerer geradzahliger Fettsäuren (14:0, 16:0, 18:0 und 18:1(9Z)) vermindert (Tabelle A 14 (Anhang C.2) zeigt die vollständigen Fettsäureprofile). Die Bildung an Biomasse bzw. Lipiden wurde durch die Supplemente nur geringfügig beeinflusst (Tabelle 103), sodass die Ausbeute für 17:1(9Z) bei Supplementierung mit L-Isoleucin bei ca. 70 mg/L lag.

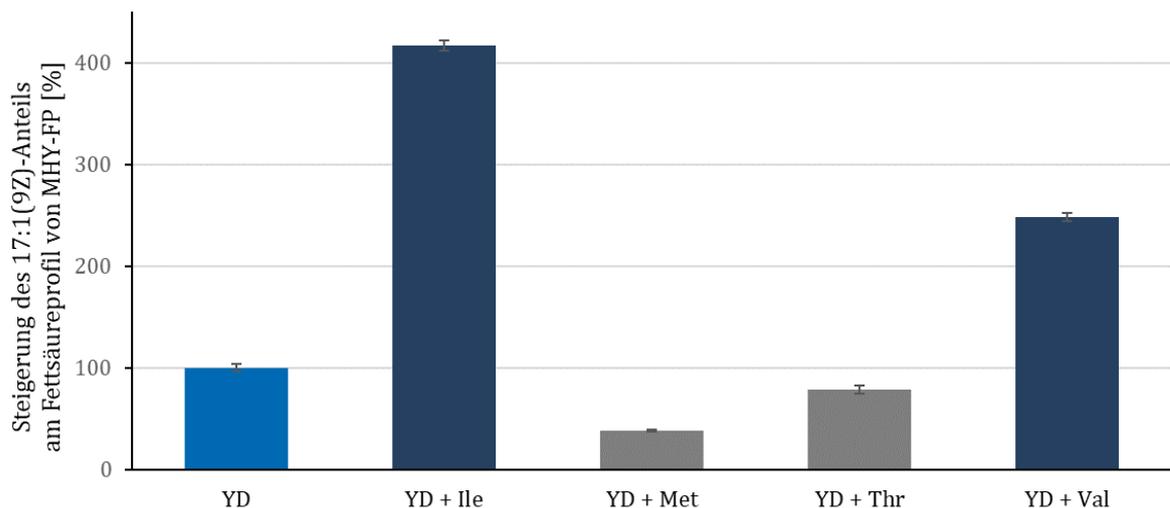


Abbildung 22: Steigerung des Anteils der 17:1(9Z) am Fettsäureprofil von MHY-FP. Die Werte stellen den Vergleich mit dem Anteil in MHY-FP dar, der in nicht supplementiertem YD-Medium gebildet wurde. Der Pilz wurde in unter Zusatz verschiedener Aminosäuren kultiviert. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler der biologischen Dreifachbestimmungen.

Tabelle 103: Ausbeute an Biotrockenmasse und Lipiden für MHY-FP in Abhängigkeit der supplementierten Aminosäuren. Den Werten liegen biologische Dreifachbestimmungen zugrunde. Die Fehlerangabe erfolgt in Form des Standardfehlers.

Medium	BTM [g/L] [#]	Lipidgehalt [g/100 g BTM]	Lipidausbeute [g/L] [#]
YD	3,79 ± 0,06	28,1 ± 0,3	1,06 ± 0,01
YD + Ile	3,56 ± 0,03*	28,5 ± 0,1	1,02 ± 0,01*
YD + Met	4,16 ± 0,03*	24,7 ± 0,1*	1,03 ± 0,01*
YD + Thr	4,08 ± 0,05*	27,9 ± 0,0	1,14 ± 0,02*
YD + Val	3,65 ± 0,04	29,4 ± 0,2*	1,07 ± 0,01

[#] die Einheit versteht sich als g pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum)

* in Bezug auf das Myzel aus nicht supplementierter YD-Kultur unterscheidet sich der markierte Wert signifikant ($\alpha = 5\%$)

3.3 Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung

Die Quantifizierung von Dodec-11-ensäure in den Myzelien von FVE-D erfolgte neben der herkömmlichen Methode (3.1.2, Tabellen 58 bis 95) zur Abschätzung der Fettsäureausbeuten mittels externer Kalibrierung (2.6.4). Nach gaschromatographischer Analyse der Kalibrierlösungen wurden durch Auftragung der Signalintensitäten gegen die Konzentrationen von Nonan- bzw. Dodec-11-ensäuremethylester Kalibriergeraden mit jeweils sehr hohen Bestimmtheitsmaßen ($R^2 > 0,999$) erhalten (Abbildung 23).

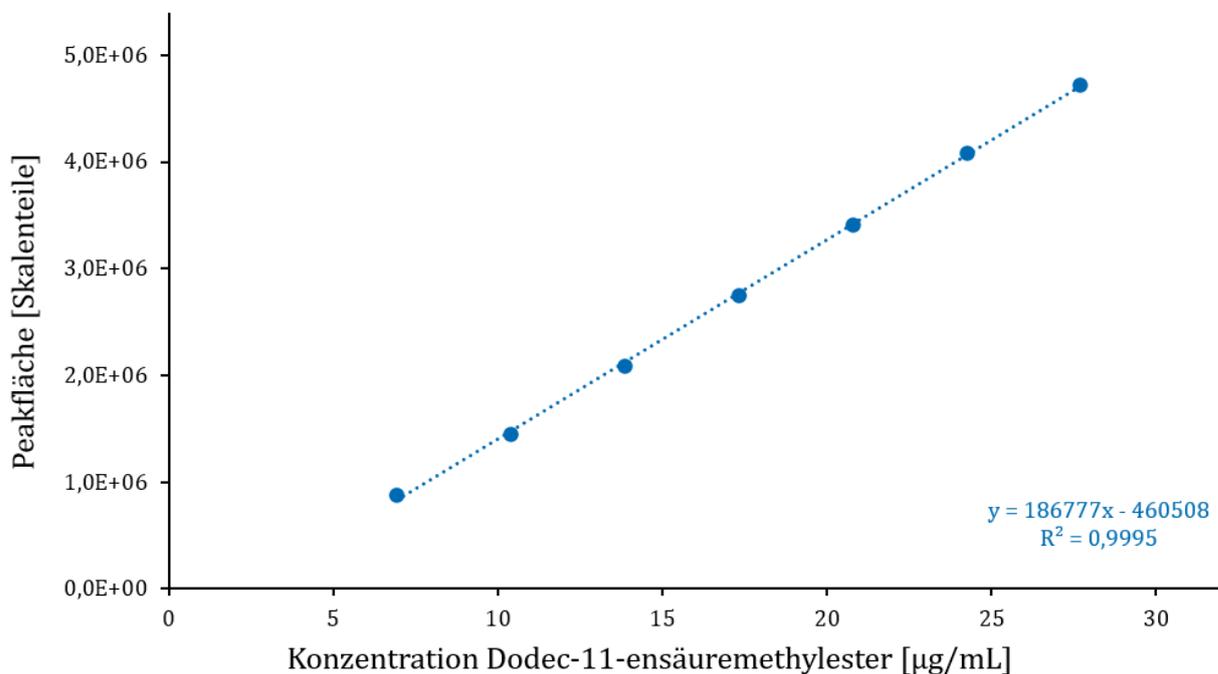


Abbildung 23: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2) zur Quantifizierung von 12:1(11) in Form des Methylesters im Myzel von FVE-D. Aufgetragen sind die Signalintensitäten gegen die Konzentrationen der verschiedenen Kalibrierlösungen.

Der aus dem internen Standard Glyceroltrioleat gebildete Nonansäuremethylester wurde zur Berechnung der Wiederfindungen von 60,9% (Bestimmung 1) bzw. 85,7% (Bestimmung 2) verwendet. Für beide Myzelien wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Wiederfindungen Gehalte von 2,78 ($\pm 0,00$) mg pro Gramm Myzel (BTM, biologischer Ansatz 1) bzw. 2,99 ($\pm 0,00$) mg pro Gramm Myzel (BTM, biologischer Ansatz 2) an Dodec-11-ensäure bestimmt. Dies entsprach Ausbeuten von 10,7 bzw. 11,7 mg/L Hauptkulturmedium.

3.4 Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch *Flammulina velutipes*

Um Hinweise zur Biosynthese von Dodec-11-ensäure in FVE-D zu gewinnen, wurden Submerskulturen des Pilzes in unterschiedlichen *Feeding-Designs* mit dem potentiellen Präkursor Laurinsäure versetzt (2.5). Diese bildete auf den Medien Flocken (Abbildung 24), die im Laufe der Kultivierung verschwanden. Im Vergleich zu den Blindwerten ohne Supplementierung wurde stets ein verlangsamtes Wachstum, teilweise auch eine dunklere Färbung festgestellt. Daneben zeichneten sich die supplementierten Kulturen durch die Bildung großer Pellets (Durchmesser > 5 mm) aus (Abbildungen 25 und 26).



Abbildung 24: Medium mit Laurinsäure-Flocken zur Kultivierung von FVE-D.



Abbildung 25: FVE-D in Submerskultur. Links: Nicht supplementierte Kultur. Rechts: Mit Laurinsäure supplementierte Kultur (Ansatz 1).

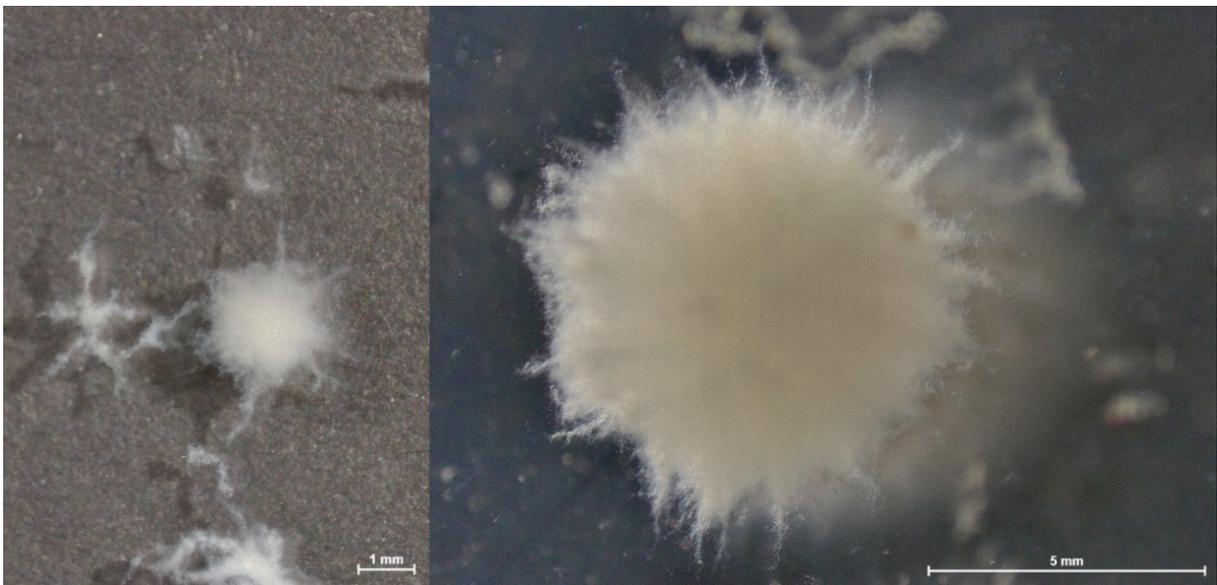


Abbildung 26: Vergleich der Pellets/Filamente aus einer nicht supplementierten (links) und einem Pellet aus einer mit Laurinsäure supplementierten Kultur (rechts) von FVE-D. Aufgenommen mittels Stereomikroskop.

Ergebnisse

Die Fettsäureprofilanalysen (2.6) zeigten unabhängig von der gewählten Methylierungsmethode, dass es im Falle aller Supplemente nicht zu einer verstärkten, sondern vielmehr zu einer verminderten Bildung von Dodec-11-ensäure kam. Im Falle von Ansatz 1 (Tabelle 27) lag der relative Anteil sogar bei $< 0,1\%$. Gleichzeitig waren in den entsprechenden Ansätzen erhöhte Anteile an Laurinsäure erkennbar. Die Analyse der chemischen Blindwerte zeigte bei Veresterung mittels Bortrifluorid das Vorliegen von Laurinsäure, jedoch keine Dodec-11-ensäure.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen zeigten, dass in den Myzelien der Ansätze 1 bis 4 (Supplementation mit $12:0-1-^{13}\text{C}$, Tabelle 27) in unterschiedlichen Anteilen sowohl ^{12}C - als auch ^{13}C -markierte Dodec-11-ensäure enthalten war (Abbildung 27, Berechnung gemäß Anhang D). In Ansatz 1 machte diese Verbindung zwar weniger als $0,1\%$ der enthaltenen Fettsäuren aus, jedoch bestanden mehr als 85% davon aus der ^{13}C -markierten Säure.

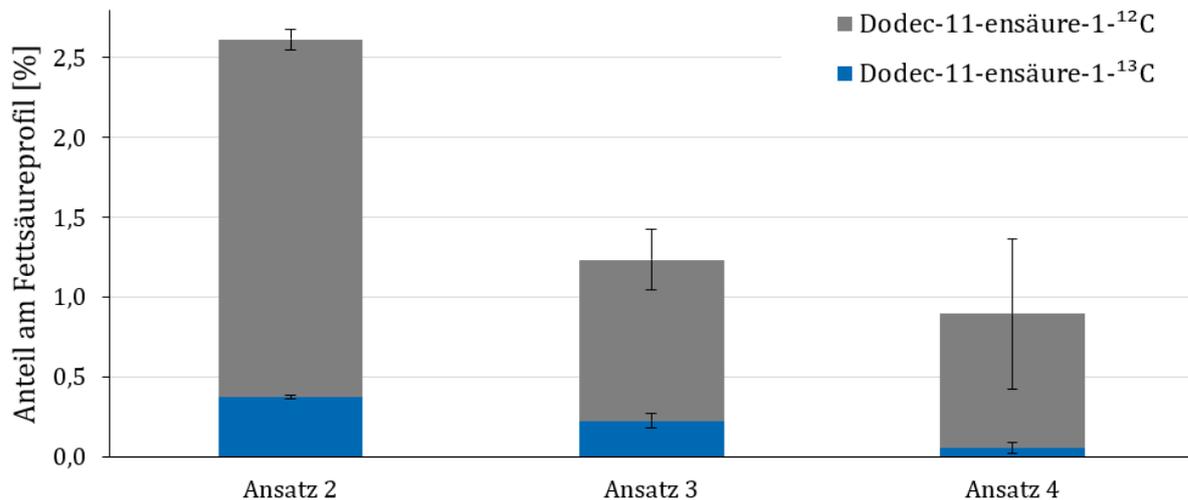


Abbildung 27: Relative Anteile von Dodec-11-ensäure an den Fettsäureprofilen der FVE-D-Myzelien aus den mit $12:0-1-^{13}\text{C}$ supplementierten Kulturen. In Ansatz 1 lag der Anteil von Dodec-11-ensäure bei $< 0,1\%$, weshalb keine grafische Darstellung erfolgte (siehe Fließtext).

Für jeden Balken ist der entsprechende Anteil an ^{13}C -markierter Fettsäure (Berechnung als Näherung gemäß Anhang D) dokumentiert. Den dargestellten Ergebnissen liegen biologische Duplikate zugrunde. Die Angabe der Fehler erfolgt in Form der Standardfehler.

3.5 Transformation, Enzymexpression und -reinigung

3.5.1 Transformationen und genetische Modifikationen

3.5.1.1 Transformation von *E. coli* mit der α -Dioxygenase

aus *Crocospaera subtropica* kodierenden Gensequenz

Die Transformation der chemisch kompetenten Zellen von *E. coli* 10 β mit dem Plasmid pET28a-C α -DOX in resultierte in optisch erkennbaren Kolonien auf den mit Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten (Abbildung 28). Die Kolonien wurden zusätzlich mittels *Colony*-PCR auf die Aufnahme des Plasmids hin überprüft (3.5.1.2).

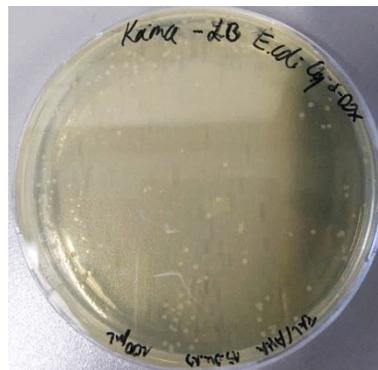


Abbildung 28: LB-Agarplatte mit *E. coli* 10 β , der mit pET28a-C α -DOX transformiert wurde.

3.5.1.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (*Colony*-PCR)

Für die *Colony*-PCR wurden 10 Klone (3.5.1.1) verwendet und im Anschluss gelelektrophoretisch untersucht (Abbildung 29). Für die weiteren Arbeiten wurde Klon Nr. 9 verwendet.

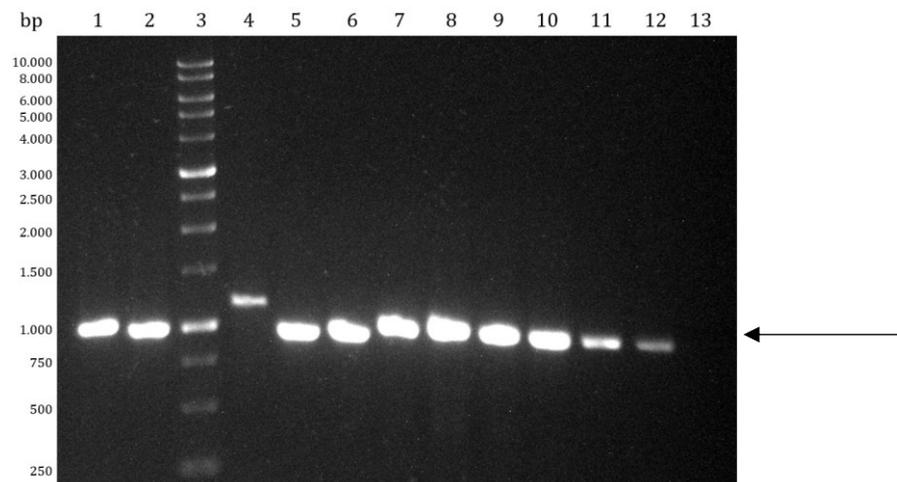


Abbildung 29: Agarosegel mit den Amplifikaten der *Colony*-PCR (10 ausgewählte Kolonien der in Abbildung 28 dargestellten LB-Agarplatte) unter UV-Licht (312 nm). 1: Klon 1, 2: Klon 2, 3: 1 kbp DNA-Leiter, 4–11: Klone 3–10, 12: Positivkontrolle (pET28a-C α -DOX), 13: Negativkontrolle (ddH₂O). Die Markierung zeigt die erwartete Bandenhöhe (Positivkontrolle) an.

3.5.2 Rekombinante Expression und Reinigung der Enzyme

3.5.2.1 α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

Die SDS-PAGE (2.7.6) der Zellpellets der Expressionskulturen (BL21(DE3)+pET-28a-Cs α -DOX, BL21(DE3)+pET-28a-Cs α -DOX_C-His) zeigten im Vergleich zum mitgeführten Blindwert BL21 (DE3)+pET-28a verdickte Banden bei ca. 70 kDa (Abbildung 31, links). Der *Western Blot* mit anti-His HRP (2.7.7), welcher mit einem Zellpellet der Expressionskultur BL21(DE3)+pET-28a-Cs α -DOX_C-His durchgeführt wurde, zeigte nach der Entwicklung eine deutlich gefärbte Bande auf etwa derselben Höhe (Abbildung 32).

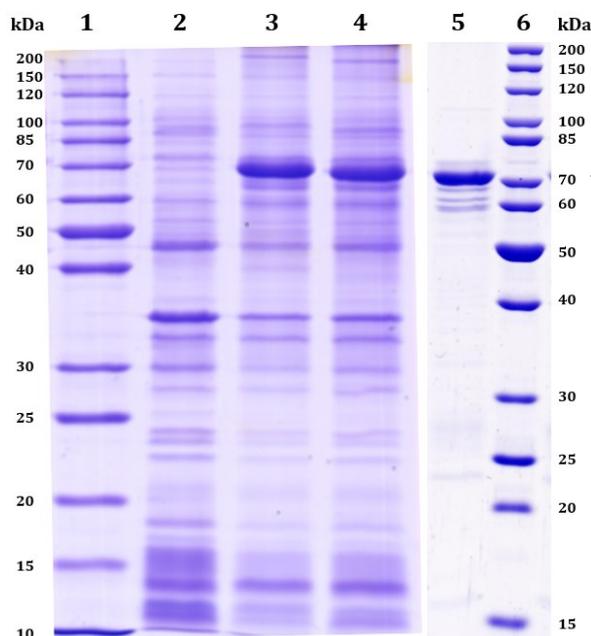


Abbildung 31: SDS-PAGE der Cs α -DOX nach heterologer Expression und Reinigung. 1 und 6: Protein-Leiter, 2–4: Zellpellets von BL21(DE3)+pET-28a (Blindwert), BL21(DE3)+pET-28a-Cs α -DOX, BL21 (DE3)+pET-28a-Cs α -DOX_C-His (Variante mit His-Tag), 5: gereinigte Cs α -DOX mit His-Tag. Die Markierung zeigt die ungefähre Bandenhöhe der kalkulierten molekularen Masse der Cs α -DOX von 69,9 kDa an.

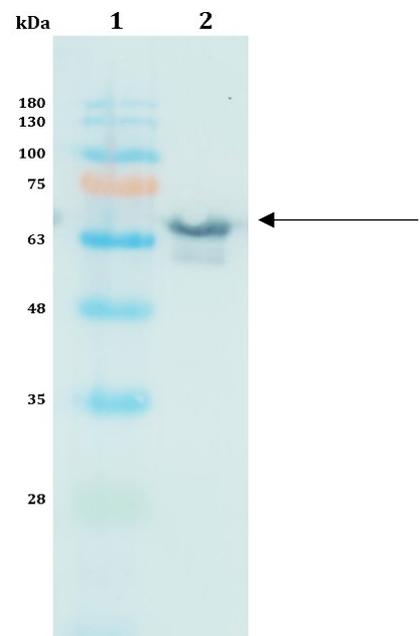


Abbildung 32: PVDF-Membran des Western Blots von Cs α -DOX. 1: Protein-Leiter, 2: Zellpellet von BL21(DE3)+pET-28a-Cs α -DOX_C-His (Variante mit C-terminalem His-Tag). Die Markierung zeigt die ungefähre Bandenhöhe der kalkulierten molekularen Masse der Cs α -DOX von 69,9 kDa an.

Mit zunehmender Konzentration war während der Aufarbeitung eine Rotfärbung der Enzym-Lösung zu beobachten. Besonders intensiv war diese im Zentrifugenfilter (Abbildung 33), etwas schwächer aber auch während des Pufferwechsels anhand der PD 10-Säulen erkennbar. Die Reinheit des Enzyms wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Das aufgetragene Enzym lieferte neben einigen schwach ausgeprägten Banden eine deutlich verdickte Bande auf derselben

Ergebnisse

Höhe wie die intensivste Bande der Zellpellet-Auftragungen (Abbildung 31, rechts). Die Ausbeute an $Cs\alpha$ -DOX betrug ca. 1 μ g Enzym pro Milliliter Expressionskultur.

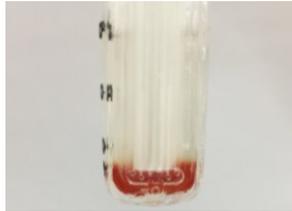


Abbildung 33: Roter Rückstand im 50 kDa-Zentrifugenfilter während der Reinigung der $Cs\alpha$ -DOX.

3.5.2.2 α -Dioxygenase aus *Oryza sativa*

Die Zellpellets der Expressionskulturen von W3110(DE3)+pET-28a-Hok- $Os\alpha$ -DOX wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Im Vergleich zum mitgeführten Blindwert W3110(DE3) enthielten die aufgetragenen Proben intensiv ausgeprägte Banden auf der Höhe von etwa 70 kDa (Abbildung 34).

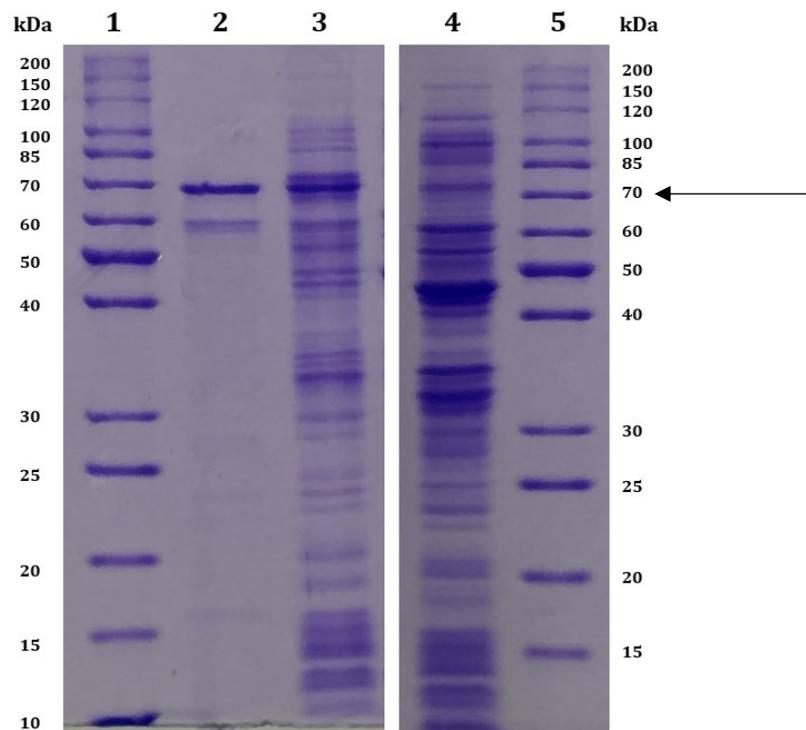


Abbildung 34: SDS-PAGE der $Os\alpha$ -DOX nach heterologer Expression und Reinigung. 1 und 5: Protein-Leiter, 2: gereinigte $Os\alpha$ -DOX mit His-Tag, 3 und 4: Zellpellets von W3110(DE3)+pET-28a-Hok- $Os\alpha$ -DOX und W3110(DE3) (Blindwert). Die Markierung zeigt die ungefähre Bandenhöhe der kalkulierten molekularen Masse der $Os\alpha$ -DOX von 72,9 kDa an.

Analog zur α -DOX aus *Crocospaera subtropica* (3.5.2.1) war während der Reinigung des Enzyms eine rote Färbung zu beobachten. Die Auftragung der gereinigten $Os\alpha$ -DOX auf der SDS-

Ergebnisse

PAGE wies neben einigen sehr schwach erkennbaren Hintergrundbanden eine deutliche Bande auf, die im Bereich der verdickten Bande der Zellpellets lag (Abbildung 34). Pro Milliliter Expressionskultur wurden etwa 3 µg *Osα*-DOX gewonnen.

3.5.2.3 Carbonsäure-Reduktase aus *Mycobacterium marinum*

Die Expression der *MmCAR* wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE überprüft, indem die Zellpellets der Expressionskulturen von RARE+pACYCDuet-*MmCAR*-BsSfp aufgetragen wurden. Diese enthielten im Vergleich zum Blindwert W3110(DE3)² eine intensive Bande auf der Höhe von etwa 130 kDa, die auch nach der Reinigung mit Abstand am deutlichsten hervorstach (Abbildung 35). Neben dieser wurden nur wenige, sehr schwache Proteinbanden als Hintergrund detektiert. Die Enzymausbeute betrug etwa 10 µg *MmCAR* pro Milliliter Expressionskultur.

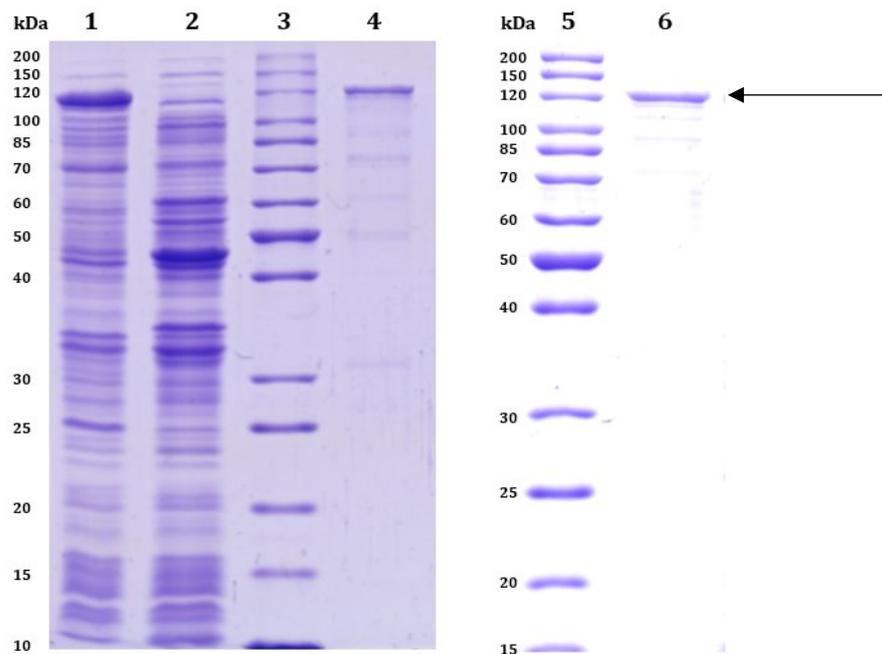


Abbildung 35: SDS-PAGE der *MmCAR* nach heterologer Expression und Reinigung. 1 und 2: Zellpellets von RARE+pACYCDuet-*MmCAR*-BsSfp und W3110(DE3) (Blindwert), 3 und 5: Protein-Leiter, 4: gereinigte *MmCAR* (Phosphatpuffer), 6: gereinigte *MmCAR* (Tris-Puffer). Die Markierung zeigt die ungefähre Bandenhöhe der kalkulierten molekularen Masse der *MmCAR* von 129,4 kDa an.

² Da der für die Expression genutzte RARE-Stamm nicht zur Verfügung stand, wurde der phylogenetisch sehr nah mit diesem verwandte W3110(DE3) (Zhang und Lin 2012) als Blindwert herangezogen.

3.5.3 Funktionstests der gereinigten Enzyme

Vor der Biotransformation der fungalen Lipide (3.6.2) wurden die isolierte *Os α -DOX* und *MmCAR* auf ihre Funktionsfähigkeit hin überprüft (2.7.8). Die resultierenden Chromatogramme zeigten neben den nicht quantitativ umgesetzten Fettsäure-Substraten neue Peaks, bei denen es sich nach Abgleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen um Tri- (*Os α -DOX*) bzw. Dodecanal (*MmCAR*) handelte (Abbildung 36, beispielhaft für *MmCAR*).

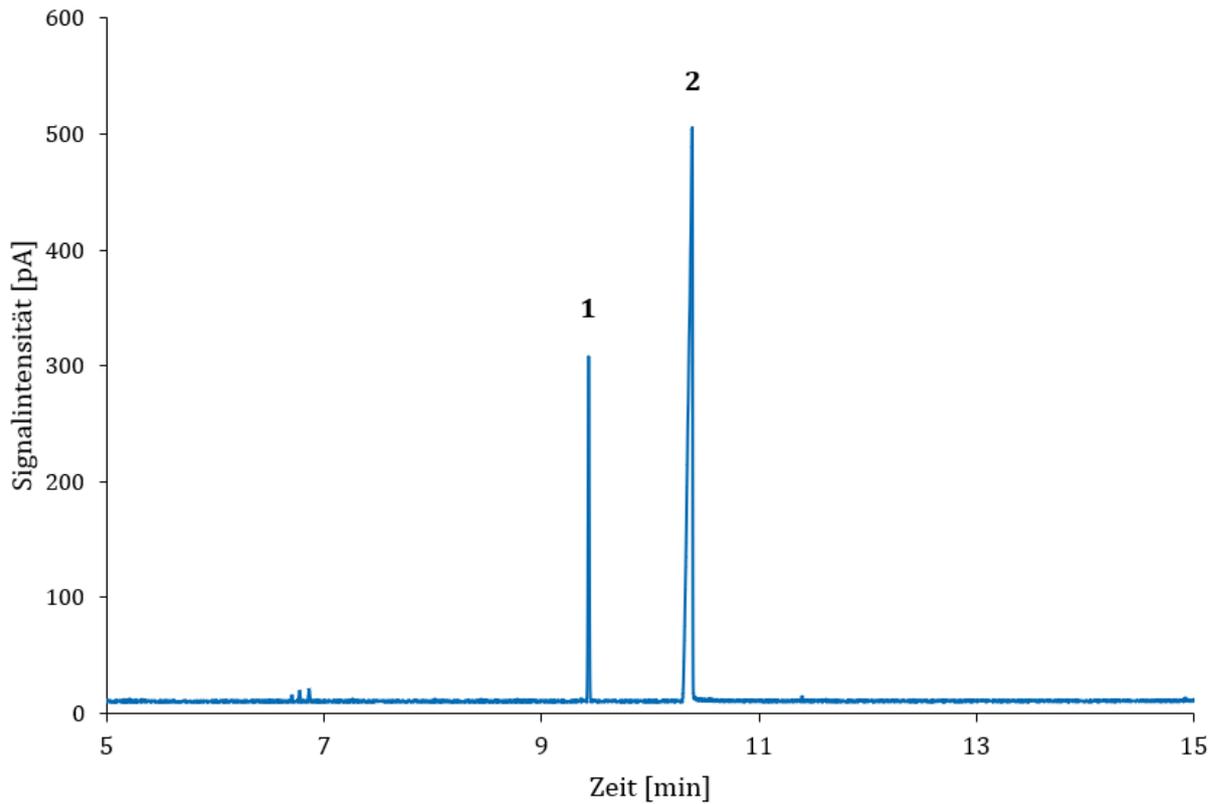


Abbildung 36: Chromatogramm (GC-FID) des organischen Extraktes eines Aktivitätstests der *MmCAR* mit 1: Dodecanal und 2: Laurinsäure.

3.6 Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase

3.6.1 Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden

3.6.1.1 Wahl der Adsorbens-Beschichtung

Zunächst wurde das Extraktionsvermögen fünf verschiedener SPME-Fasern aus wässriger Probenmatrix getestet (2.8.1). Von diesen zeigten die DVB/CAR/PDMS- und PDMS/DVB-Faser für alle Analyten insgesamt die höchste Sensitivität. Mithilfe der CAR/PDMS-Faser waren kurzket- tige Aldehyde gut extrahierbar. Für die schwerflüchtigen Analyten war dieses Adsorbens je- doch ungeeignet (Abbildung 37). Sowohl die CW-, als auch die PDMS-Faser besaßen für alle Analyten nur ein geringes Extraktionsvermögen (Daten nicht dargestellt). Ungesättigte Alde- hyde wurden im Vergleich zu ihren gesättigten Analoga schlechter extrahiert. Dieser Effekt war in erster Linie für kurz- bis mittelkettige Vertreter zu beobachten (Abbildung 38).

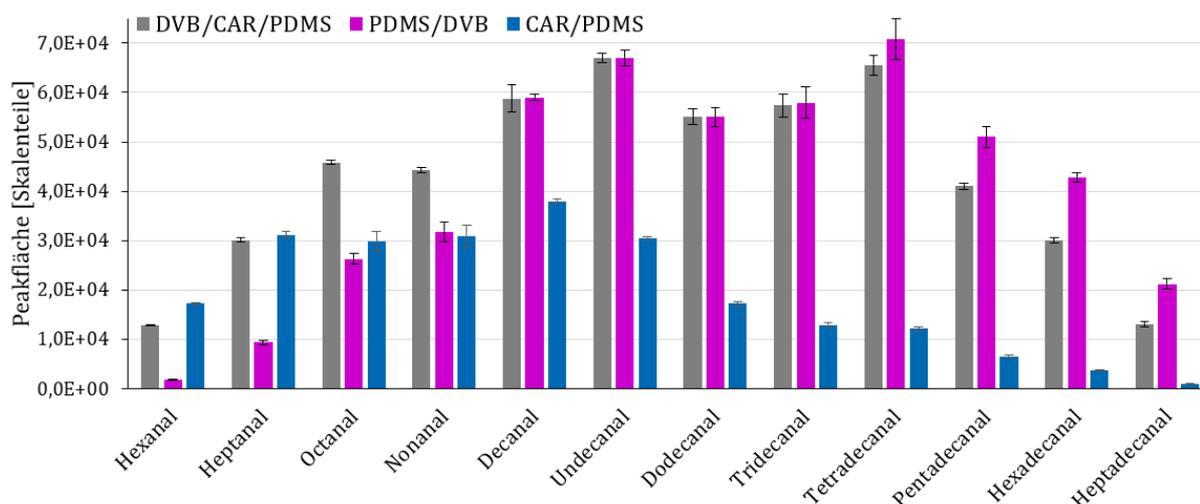


Abbildung 37: Extraktionsvermögen der DVB/CAR/PDMS-, PDMS/DVB- und CAR/PDMS-Faser für eine homologe Reihe gesättigter Aldehyde. Als Fehlerindikatoren sind die Standardfehler aufgetragen.

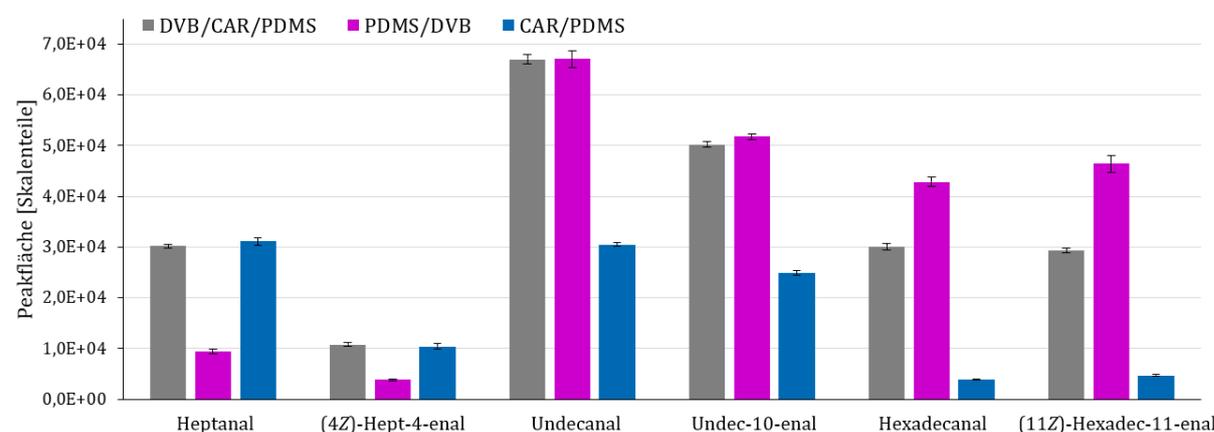


Abbildung 38: Vergleich der Extraktion gesättigter und ungesättigter Aldehyde. Als Fehlerindikatoren sind die Standardfehler aufgetragen.

3.6.1.2 Einfluss unterschiedlicher Matrices

Mittels PDMS/DVB-Faser wurde daneben die Extraktion aus den verschiedenen Phosphatpuffer-Matrices (Tabelle 43) getestet, die etwa der Zusammensetzung der enzymatischen Reaktionspuffer entsprachen (2.8.2). Die Extraktion aus wässriger Matrix und Phosphatpuffer I unterschied sich kaum.

Im Gegensatz dazu wirkte sich der Zusatz der emulgierend wirkenden Agenzien *Gummi arabicum* und Triton X-100 (Phosphatpuffer II und III) mit steigender Kettenlänge der Analyten negativ auf deren Extraktion aus. Die Analyten wurden ab Octanal (Triton X-100) bzw. Decanal (*Gummi arabicum*) massiv von der Matrix zurückgehalten. Mit steigender Kettenlänge der Aldehyde sank die Extraktionsfähigkeit rapide (Abbildung 39).

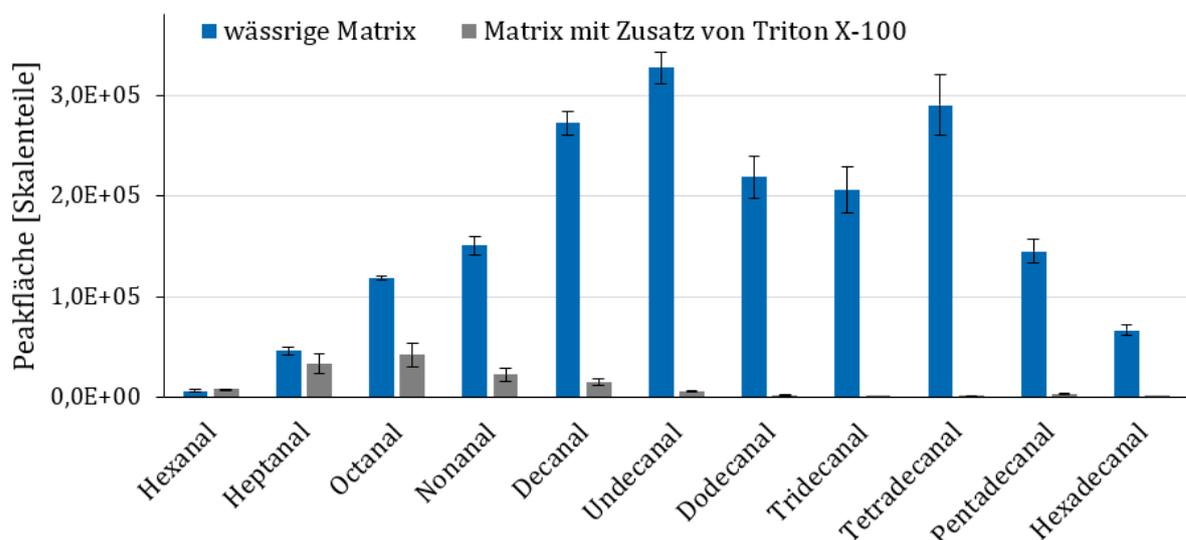


Abbildung 39: Vergleich der Extraktion von Aldehyden aus einer wässrigen Probenmatrix und unter Zusatz von Triton X-100. Als Fehlerindikatoren sind die Standardfehler aufgetragen.

3.6.1.3 Optimierung weiterer Extraktionsparameter

Ausgehend von den in Tabelle 44 genannten Standard-Extraktionsparametern wurden für die PDMS/DVB-beschichtete Faser die Parameter Extraktionstemperatur, Extraktionszeit, Salzzugabe und Schüttelgeschwindigkeit sukzessive variiert und dabei die jeweils besten Bedingungen für die weitere Methodenentwicklung beibehalten (Abbildung 40). Als ideale Methode erwies sich eine Extraktion mittels DVB/PDMS-Faser bei 60 °C und 250 U/min, wobei zunächst 10 min inkubiert und anschließend 30 min extrahiert wurde. Ein Aussalzeffekt wurde nicht beobachtet, was das Versetzen der Probe mit Kochsalz obsolet macht.

Ergebnisse

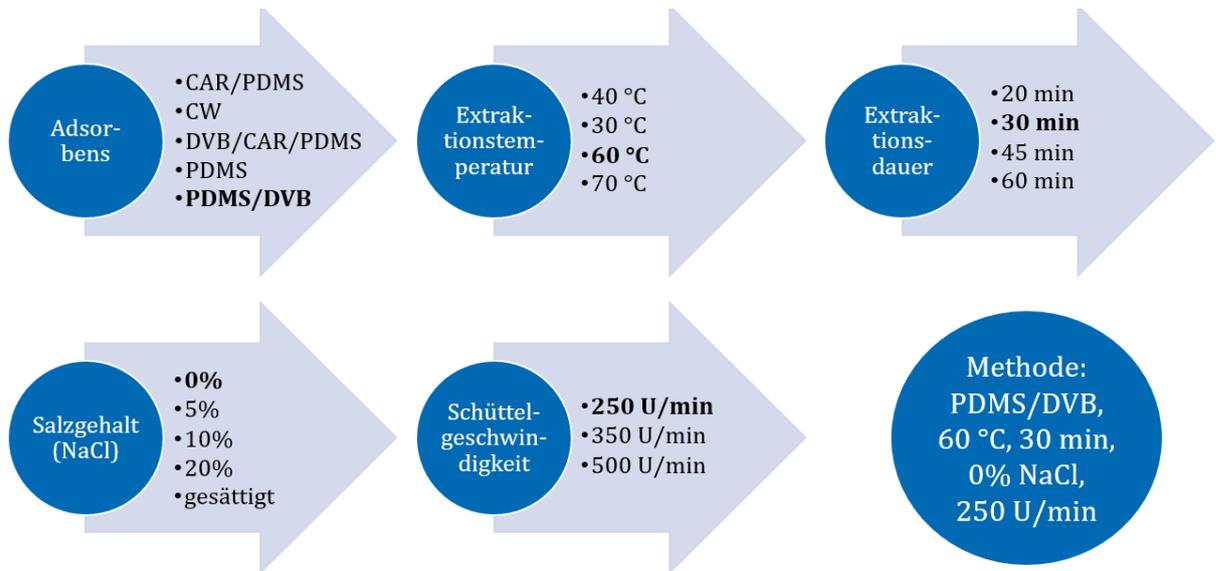


Abbildung 40: Flussdiagramm der Methodenoptimierung: Die jeweils optimalen Parameter, die für die weitere Methodenentwicklung beibehalten wurden, sind fett markiert und am Ende zusammengefasst.

3.6.2 Biotransformation fungaler Lipide

In den Biotransformationsansätzen wurden mittels HS-SPME-GC-MS-O verschiedene Aldehyde olfaktorisch detektiert und identifiziert (Tabellen 104 bis 107). Als Identifizierungsmerkmale wurden ein Abgleich der RIs mittels authentischer Referenzverbindungen anhand zweier GC-Trennsäulen unterschiedlicher Polarität sowie eine gute Übereinstimmung des erhaltenen massenspektrometrischen Fragmentierungsmusters mit einem in der NIST-Datenbank hinterlegten Massenspektrum gefordert (R-Match > 850). In den analysierten Blindwerten wurden einige olfaktorisch aktive Substanzen mit geringen Intensitäten wahrgenommen. Dabei handelte es sich jedoch nicht um in den Proben detektierte Aldehyde.

Tabelle 104: Im Biotransformationsansatz der Lipide des Pilzes FVE-D mit Lipase und *Osα*-DOX olfaktorisch detektierte Aldehyde.

Aldehyd	am ODP wahrgenommene Geruchsqualität ^a	Intensität ^b	RI ^c	
			VF-WAX	DB-5
Undecanal	citrusartig, grün-grasig, süßlich	3	1607	1307
Undec-10-enal	citrusartig, dumpf, grün, nach Koriander-Blättern, schwer	1,5	1670	1299
Dodecanal	grün, seifig	2	1709	1408
Tridecanal	citrusartig, grün, schwer, seifig, würzig	3	1816	1510
Tetradecanal	fettig, künstlich, seifig, süßlich	1,5	1938	1612
Pentadecanal	künstlich, nach Plastik, stechend	3	2019	1714
Hexadecanal	grün, süßlich	0,5	2145	1816

^a die Geruchsqualitäten wurden von einem geschulten Sensoriker anhand der Analyse an der VF-WAXms-Trennsäule bestimmt

^b bei der hier angegebenen Intensität auf einer Skala von 0,5 bis 3 handelt es sich um eine subjektive Bewertung, um eine grobe Einordnung der Intensität zu erlauben

^c die hier angegebenen RIs nach van den Dool und Kratz (1963) wurden anhand der Proben ermittelt und wiesen gute Übereinstimmungen mit den Referenzverbindungen auf

Ergebnisse

Tabelle 105: Im Biotransformationsansatz der Lipide des Pilzes FVE-D mit Lipase und MmCAR olfaktorisch detektierte Aldehyde.

Aldehyd	am ODP wahrgenommene Geruchsqualität ^a	Intensität ^b	RI ^c	
			VF-WAX	DB-5
Decanal	citrusartig, grün, frisch	1	1498	1205
Undecanal	citrusartig, grün	0,5	1607	1307
Dodecanal	citrusartig, grün, seifig, süßlich	2	1714	1409
Dodec-11-enal	citrusartig, leicht grün, nach Koriander-Blättern, seifig	1,5	1767	1401

^a die Geruchsqualitäten wurden von einem geschulten Sensoriker anhand der Analyse an der VF-WAXms-Trennsäule bestimmt

^b bei der hier angegebenen Intensität auf einer Skala von 0,5 bis 3 handelt es sich um eine subjektive Bewertung, um eine grobe Einordnung der Intensität zu erlauben

^c die hier angegebenen RIs nach van den Dool und Kratz (1963) wurden anhand der Proben ermittelt und wiesen gute Übereinstimmungen mit den Referenzverbindungen auf

Tabelle 106: Im Biotransformationsansatz der Lipide des Pilzes MHY-FP mit Lipase und Os α -DOX olfaktorisch detektierte Aldehyde.

Aldehyd	am ODP wahrgenommene Geruchsqualität ^a	Intensität ^b	RI ^c	
			VF-WAX	DB-5
Tridecanal	grün, seifig	1,5	1825	1510
Tetradecanal	fettig, grün, künstlich	1	1948	1612
Pentadecanal	metallisch, nach Plastik, stechend, wächsern	1	2029	1715
Hexadecanal	grün, nach Kompost	0,75	2125	1816
Hexadecenal ^d	grün (unangenehm)	0,5	2164	1792

^a die Geruchsqualitäten wurden von einem geschulten Sensoriker anhand der Analyse an der VF-WAXms-Trennsäule bestimmt

^b bei der hier angegebenen Intensität auf einer Skala von 0,5 bis 3 handelt es sich um eine subjektive Bewertung, um eine grobe Einordnung der Intensität zu erlauben

^c die hier angegebenen RIs nach van den Dool und Kratz (1963) wurden anhand der Proben ermittelt und wiesen gute Übereinstimmungen mit den Referenzverbindungen auf, abweichend siehe Anmerkung ^d

^d bei der vorliegenden Verbindung könnte es sich um das von 17:1(9Z) abgeleitete (8Z)-Hexadec-8-enal handeln. Eine Identifizierung war aufgrund fehlender Referenzverbindungen jedoch nicht möglich

Tabelle 107: Im Biotransformationsansatz der Lipide des Pilzes MHY-FP mit Lipase und MmCAR olfaktorisch detektierte Aldehyde.

Aldehyd	am ODP wahrgenommene Geruchsqualität ^a	Intensität ^b	RI ^c	
			VF-WAX	DB-5
Dodecanal	grün, seifig, stechend	2	1717	1408
Tetradecanal ^d	grün	0,5	1941	1612
Pentadecanal	grün, nach Plastik, stechend, wächsern	2	2026	1714

^a die Geruchsqualitäten wurden von einem geschulten Sensoriker anhand der Analyse an der VF-WAXms-Trennsäule bestimmt

^b bei der hier angegebenen Intensität auf einer Skala von 0,5 bis 3 handelt es sich um eine subjektive Bewertung, um eine grobe Einordnung der Intensität zu erlauben

^c die hier angegebenen RIs nach van den Dool und Kratz (1963) wurden anhand der Proben ermittelt und wiesen gute Übereinstimmungen mit den Referenzverbindungen auf, abweichend siehe Anmerkung ^d

^d bei der wahrgenommenen Verbindung könnte es sich um Tetradecanal handeln, jedoch wich der RI des wahrgenommenen Geruchs auf der polaren VF-WAX- Säule ein wenig stärker von der Referenz (1927) ab

Ergebnisse

Die Flüssigextrakte der Biotransformation der Lipide von *Flammulina velutipes* mit Lipase und MmCAR (spezifische Aktivität 0,75 U/mg) dienten der Quantifizierung von Dodec-11-enal und somit der Bestimmung der Umsatzrate. Mittels externer Kalibrierung (Abbildung 41) ergab sich für ein unabhängiges Duplikat eine Ausbeute von $15,8 \pm 0,5\%$ Dodec-11-enal.

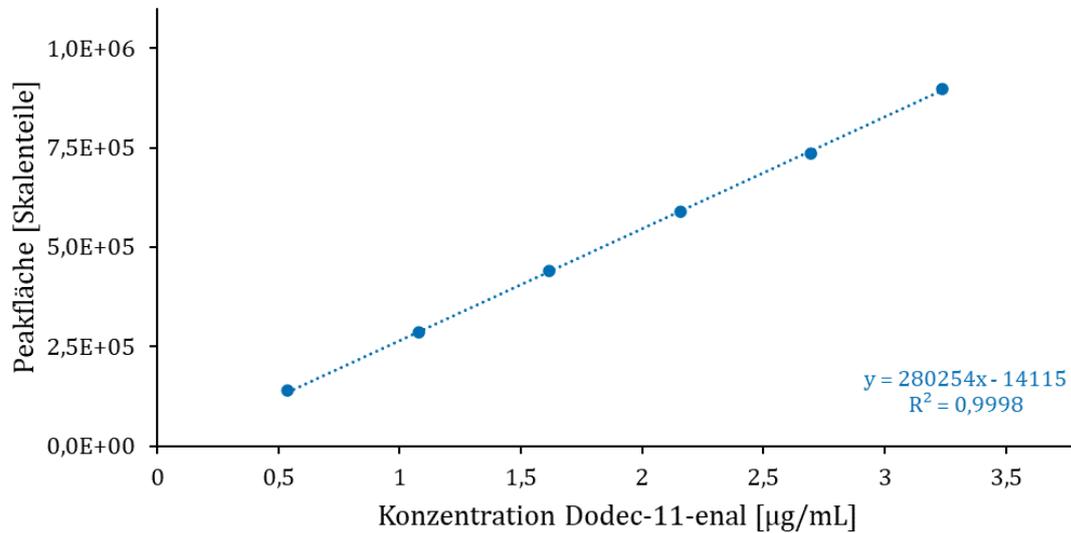


Abbildung 41: Kalibriergerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2) zur Quantifizierung von Dodec-11-enal in den Biotransformationsmischungen der Lipide von FVE-D mit Lipase und MmCAR.

3.7 Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

3.7.1 Einfluss des C-terminalen His-Tags auf die α -Dioxygenase-Aktivität

Das Gel der SDS-PAGE zeigte durch verdickte Banden bei etwa 70 kDa das Vorhandensein der *Cs* α -DOX in den Rohextrakten von BL21(DE3)+pET-28a-*Cs* α -DOX_C-His und BL21(DE3)+pET-28a-*Cs* α -DOX in etwa gleichen Konzentrationen (Abbildung 42). Mittels Sauerstoffsonde wurde die Anfangsgeschwindigkeit bezüglich Myristinsäure bestimmt (2.9.1) und anhand dessen die Aktivität der beiden Enzymvarianten verglichen. Wie die Auftragung der beiden Aktivitäten zeigt, besaß der C-terminale His-Tag keinen Einfluss auf die Aktivität der *Cs* α -DOX (Abbildung 43). Der Rohextrakt von des BL21(DE3)+pET-28a Blindwertes zeigte eine deutlich schwächere Aktivität als die beiden Enzyme.

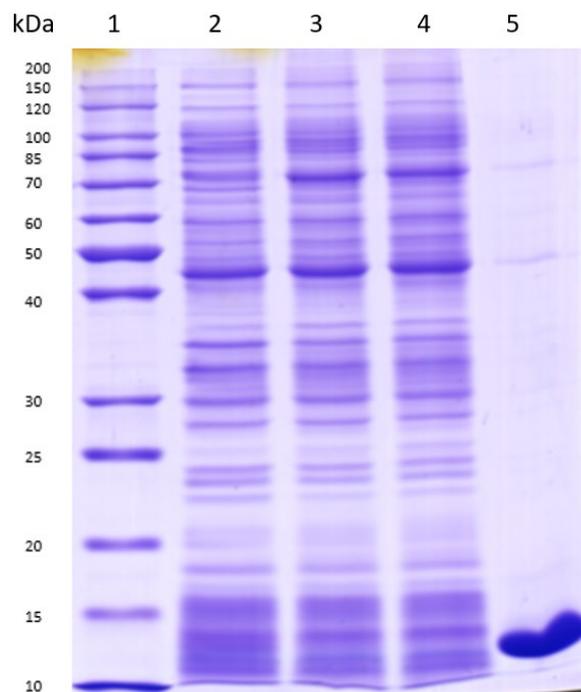


Abbildung 42: SDS-PAGE Gel, (1) Proteinleiter, Rohextrakte von (2) BL21(DE3)+pET-28a (Blindwert), (3) BL21(DE3)+pET-28a-*Cs* α -DOX_C-His, und (4) BL21(DE3)+pET-28a-*Cs* α -DOX, (5) Lysozym. Die verdickten Banden bei 70 kDa weisen auf die Anwesenheit der *Cs* α -DOX in (3) und (4) hin.

Ergebnisse

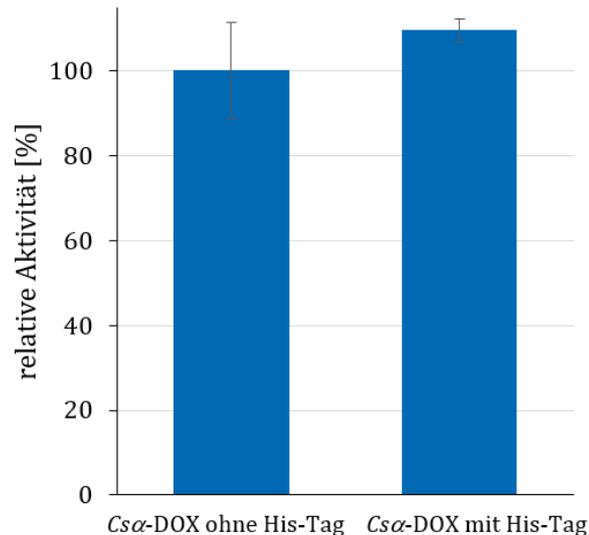


Abbildung 43: Vergleich der Aktivitäten von Csα-DOX und Csα-DOX mit C-terminalem His-Tag, gemessen mittels Sauerstoffsonde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Fünffachbestimmungen.

3.7.2 Thermofluor-Assay zur Bestimmung der Enzymstabilität (Screening)

Das Screening zur Enzymstabilität mittels Thermofluor-Assay (2.9.2) zeigte, dass das Enzym in Puffern mit höheren Puffer- bzw. Kochsalzkonzentrationen stabiler war. Die Csα-DOX zeigte bei einer DMSO-Konzentration von 2,5% (v/v) keine Anzeichen von Instabilität. Erst bei Zusatz von 5% (v/v) lag die Denaturierungstemperatur 5 °C unterhalb der Referenz ohne Zusatz. Hinsichtlich des pH-Wertes ließ sich auf Grundlage der vorhandenen Daten keine eindeutige Aussage ableiten (Tabelle 108).

Tabelle 108: Mittels Thermofluor-Assay ermittelte mittlere Denaturierungstemperaturen der Csα-DOX (mit Standardfehlern) in Abhängigkeit der Pufferzusammensetzung und des pH-Wertes. Den dargestellten Werten liegen Dreifachbestimmungen zugrunde. Mit „n/a“ sind Ansätze gekennzeichnet, für die keine auswertbaren Messergebnisse erzielt wurden.

Phosphatpufferkonzentration [mM]	NaCl [mM]	DMSO (v/v) [%]	pH-Wert	mittlere Denaturierungstemperatur [°C]
Referenz (ddH ₂ O)	-	-		45,0 ± 0,5
50	-	-	7,5	47,0 ± 0,7
50	50	-	7,5	49,5 ± 0,4
50	100	-	7,5	48,0 ^a
50	200	-	7,5	53,0 ± 0,5
50	300	-	7,5	57,0 ± 1,5
50	350	-	7,5	56,3 ± 0,7
200	-	-	7,5	63,7 ± 0,3

Ergebnisse

Tabelle 108 (Fortsetzung)

Phosphatpuffer- konzentration [mM]	NaCl [mM]	DMSO (v/v) [%]	pH-Wert	mittlere Denaturierungs- temperatur [°C]
200	50	-	6,5	62,0 ± 2,8
			7,0	65,7 ± 0,7
			7,5	66,3 ± 0,5
			8,0	n/a
200	50	2,5	7,5	67,7 ± 0,3
200	50	5,0	7,5	61,0 ± 1,4
200	100	-	6,5	n/a
			7,0	66,0 ± 0,5
			7,5	64,0 ± 1,4
			8,0	67,0 ± 0,7
200	200	-	6,5	n/a
			7,0	66,5 ± 0,4
			7,5	67,0 ± 0,5
			8,0	66,0 ± 0,0
400	-	-	6,5	70,0 ^a
			7,0	71,0 ± 0,0
			7,5	72,0 ± 0,0
			8,0	71,3 ± 3,3

^a kein Standardfehler berechnet, da nur die Ergebnisse einer Messung auswertbar waren

3.7.3 Bestimmung von Salz-, pH- und Temperaturoptimum

Hinsichtlich der getesteten Parameter (2.9.3) ergab sich kein gemeinsames Optimum für alle drei getesteten Substrate:

Die Untersuchungen zum pH-Wert (Abbildung 44) ergaben, dass das Enzym im Sauren sehr instabil ist. So wurde bei pH 6 praktisch keine Umsetzung der Fettsäuren beobachtet. Als mittleres Optimum für alle Substrate ergab sich ein pH-Wert von pH 7,5.

Höhere Puffer- bzw. Kochsalzkonzentrationen führten tendenziell zu höheren Umsetzungen. Eine Ausnahme bildete Pentadecansäure, die in 200 mM Phosphatpuffer besser zu ihrem Produkt Tetradecanal umgesetzt wurde als in 400 mM Phosphatpuffer. Ein Teil des Phosphatpuffersalzes wurde durch NaCl ersetzt, was die Umsetzung im Falle der Pentadecansäure weiter verbesserte. Die Verwendung eines 200 mM Phosphatpuffers mit einem Zusatz von 50 mM NaCl stellte sich als die im Mittel beste Zusammensetzung heraus (Abbildung 45). Hinsichtlich der Temperatur ergab sich im Mittel ein Optimum bei 25 °C (Abbildung 46).

Ergebnisse

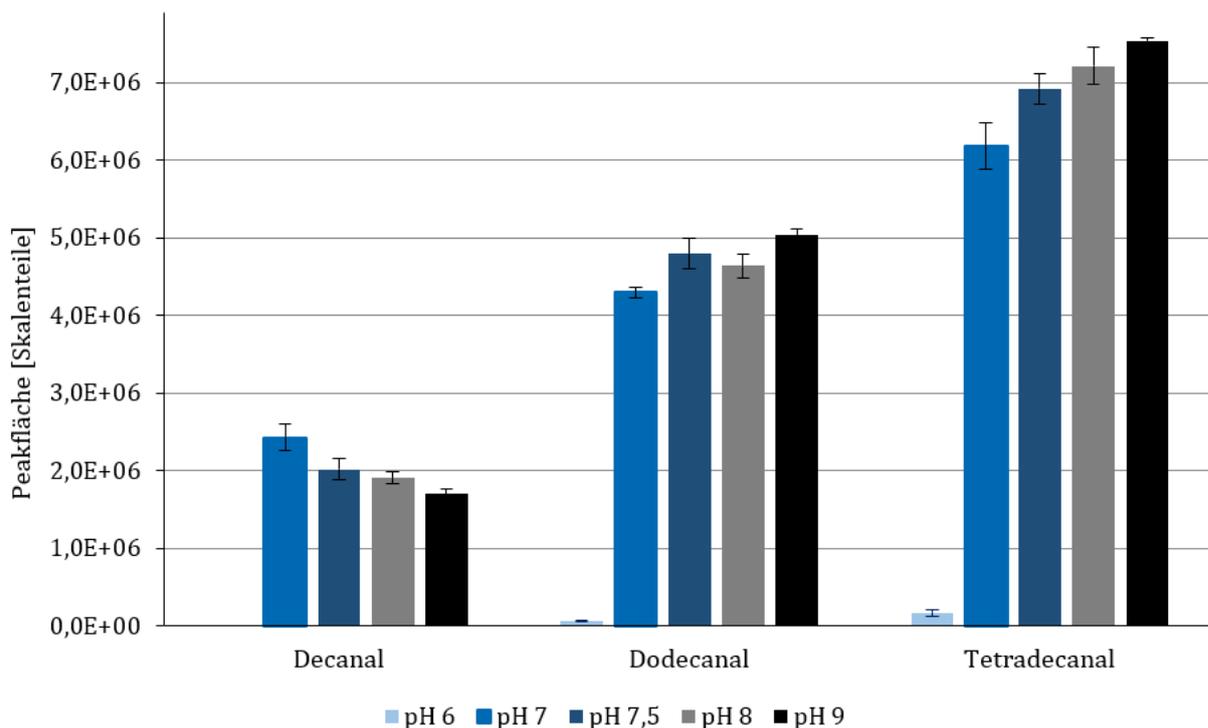


Abbildung 44: Mittlere Peakflächen (Dreifachbestimmung mit Standardfehlern) der durch Biotransformationen in Phosphatpufferlösungen (50 mM) verschiedener pH-Werte entstandenen Aldehyde.

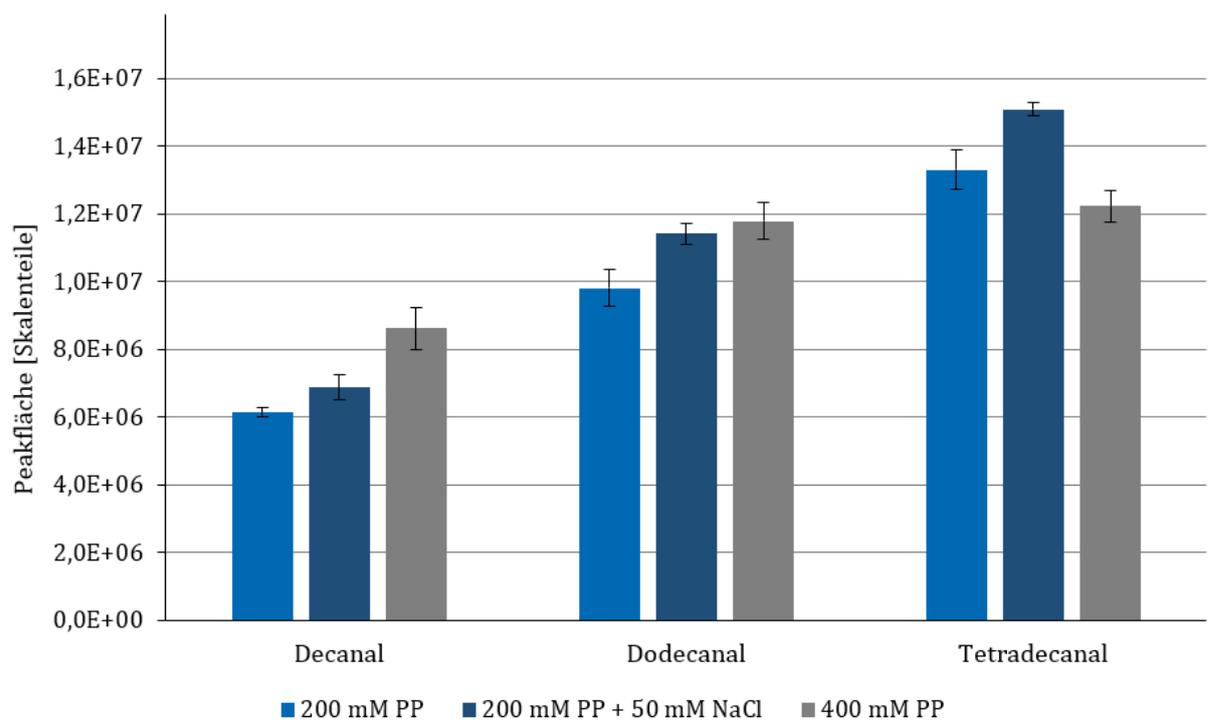


Abbildung 45: Mittlere Peakflächen (Dreifachbestimmung mit Standardfehlern) der durch Biotransformationen in Phosphatpufferlösungen (200 mM Phosphatpuffer (PP) mit und ohne Zusatz von 50 mM NaCl und 400 mM PP, je pH 7,5) entstandenen Aldehyde. Die Salzkonzentration der Matrix wurde vor der Analyse auf dieselbe Konzentration eingestellt.

Ergebnisse

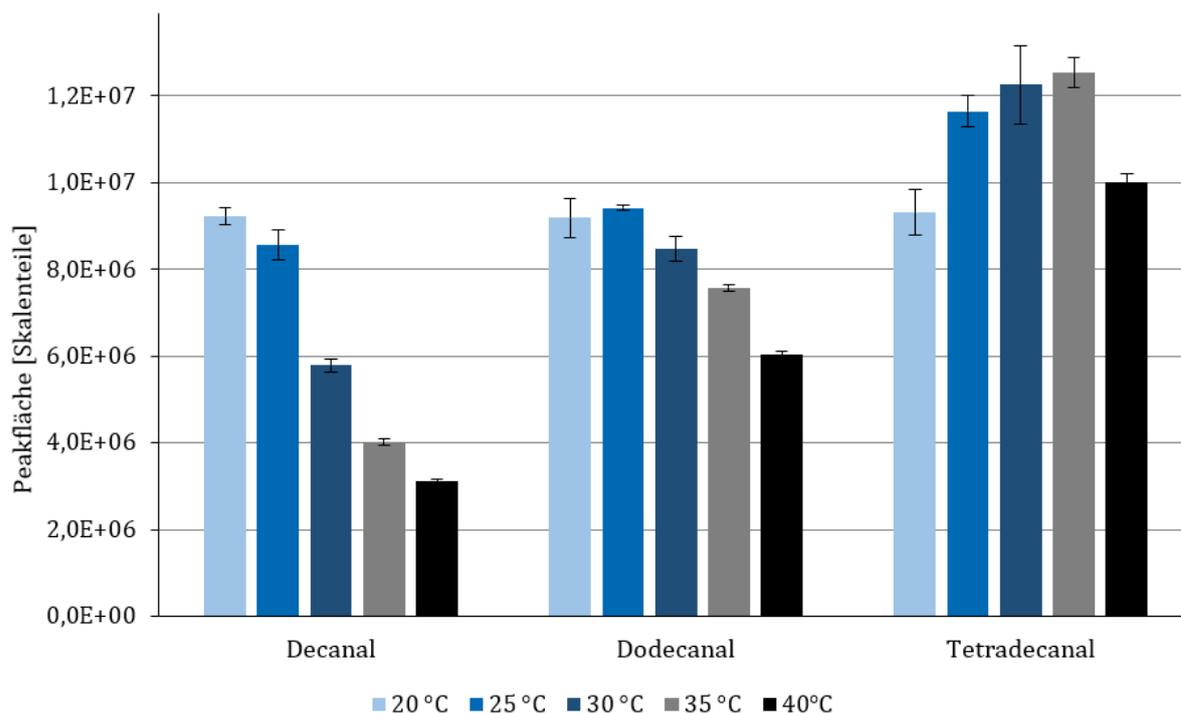


Abbildung 46: Mittlere Peakflächen (Dreifachbestimmung mit Standardfehlern) der durch Biotransformationen in Phosphatpufferlösungen (je 250 mM Phosphatpuffer mit Zusatz von 50 mM NaCl, pH 7,5) bei verschiedenen Temperaturen entstandenen Aldehyde.

Der Zusatz von DMSO (2,5% (v/v)) hatte keine Auswirkungen auf die Umsetzung der Fettsäuren. Die Verwendung von Triton X-100 hatte einen positiven Effekt auf die Umsatzraten (Abbildung 47). Durch Verwendung dieses Emulgators (1% (v/v)) wurde eine Verdopplung der relativen Aktivität erreicht.

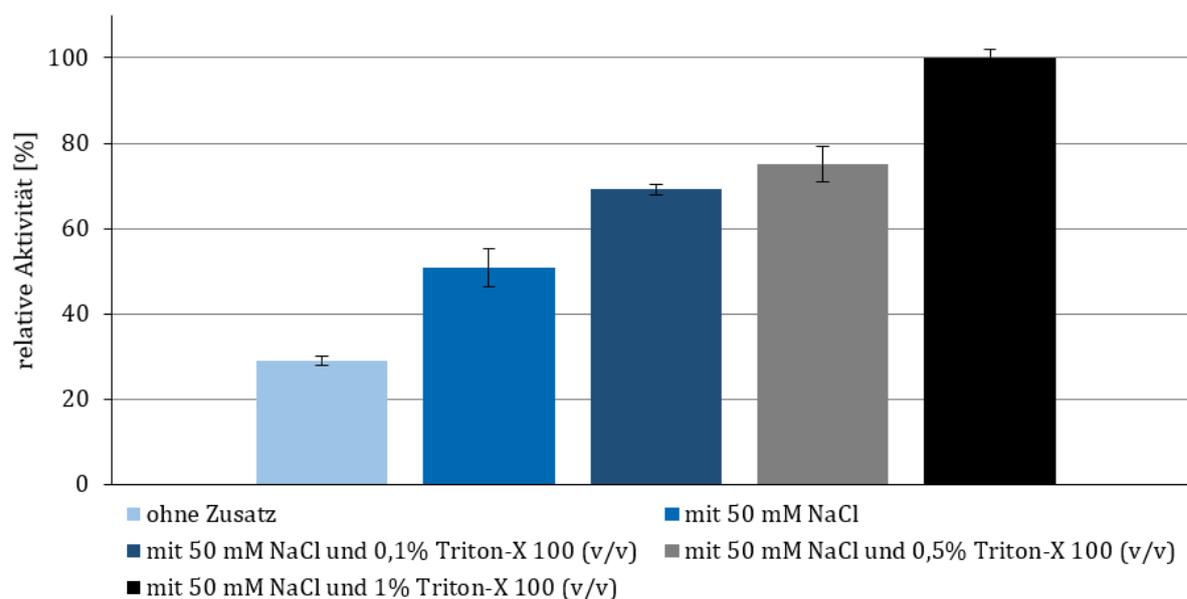


Abbildung 47: Relative Aktivität der Cs α -DOX bei Umsetzung von Tridecansäure im 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) in Abhängigkeit des Zusatzes von 50 mM NaCl und diversen Konzentrationen an Triton X-100 (mit Angabe der Standardfehler).

3.7.4 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Mit Hilfe einer Sauerstoffsonde wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten für drei verschiedene Chargen an gereinigter *Csα*-DOX bei verschiedenen Substratmengen von Myristin- bzw. 13-Methyltetradecansäure ermittelt (2.9.4) und gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 48). Mittels OriginPro (Tabelle 22) wurden die Michaelis-Konstanten (K_m) und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) für die Substrate Myristin- und 13-Methyltetradecansäure kalkuliert und daraus die katalytischen Konstanten (k_{cat}) und Effizienzen (k_{cat}/K_m) berechnet (Tabelle 109).

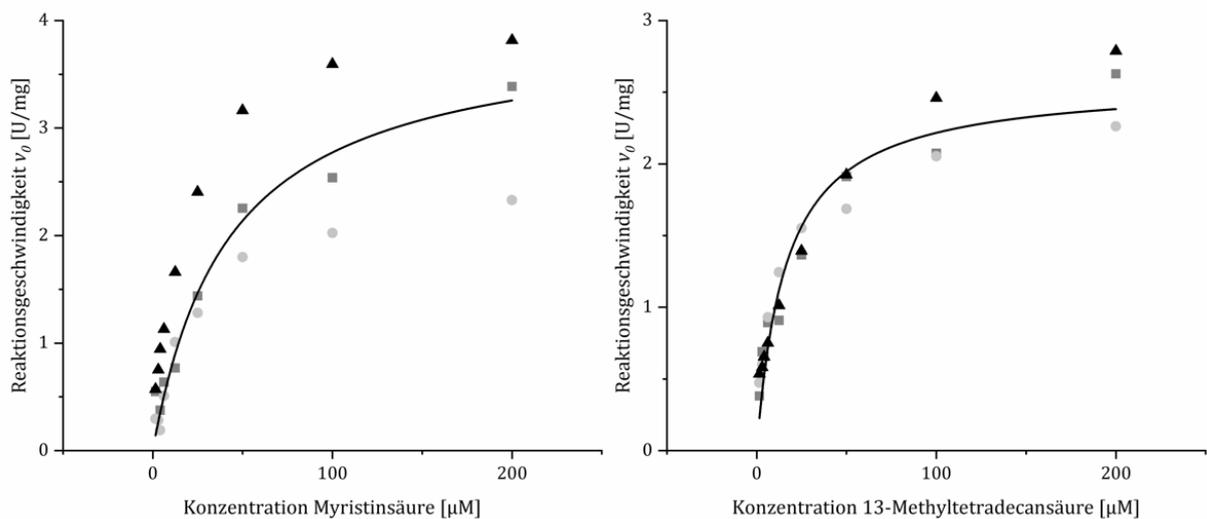


Abbildung 48: Michaelis-Menten-Kinetik der *Csα*-DOX für Myristinsäure (links) und die korrespondierende methylverzweigte 13-Methyltetradecansäure (rechts). Die Symbole repräsentieren Dreifachbestimmungen biologisch unabhängiger Ansätze, denen wiederum jeweils eine Doppelbestimmung zugrunde liegt.

Tabelle 109: Mittels OriginPro (2020) kalkulierte mittlere Michaelis-Konstanten (K_m) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) bezüglich Myristin- und 13-Methyltetradecansäure für *Csα*-DOX sowie daraus berechnete katalytische Konstanten (k_{cat}) und Effizienzen (k_{cat}/K_m) unter Angabe der Standardfehler. Die Werte repräsentieren Dreifachbestimmungen biologisch unabhängiger Ansätze, denen wiederum jeweils eine Doppelbestimmung zugrunde liegt.

Enzymkinetische Kenngröße	Myristinsäure	13-Methyltetradecansäure
Michaelis-Konstante K_m [μM]	26 ± 6	16 ± 3
maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} [U/mg]	3,5 ± 0,5	2,70 ± 0,2
katalytische Konstante k_{cat} [1/s]	4,0 ± 0,5	3,14 ± 0,2
katalytische Effizienz k_{cat}/K_m [1/μM pro s]	0,17 ± 0,06	0,20 ± 0,03

3.7.5 Substratspektrum

Zur Bestimmung des Substratspektrums der $Cs\alpha$ -DOX wurde der Sauerstoffverbrauch in der Reaktionslösung bei Einsatz diverser Fettsäuren analysiert (2.9.5) und das Substratspektrum anhand der Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt (Abbildung 49).

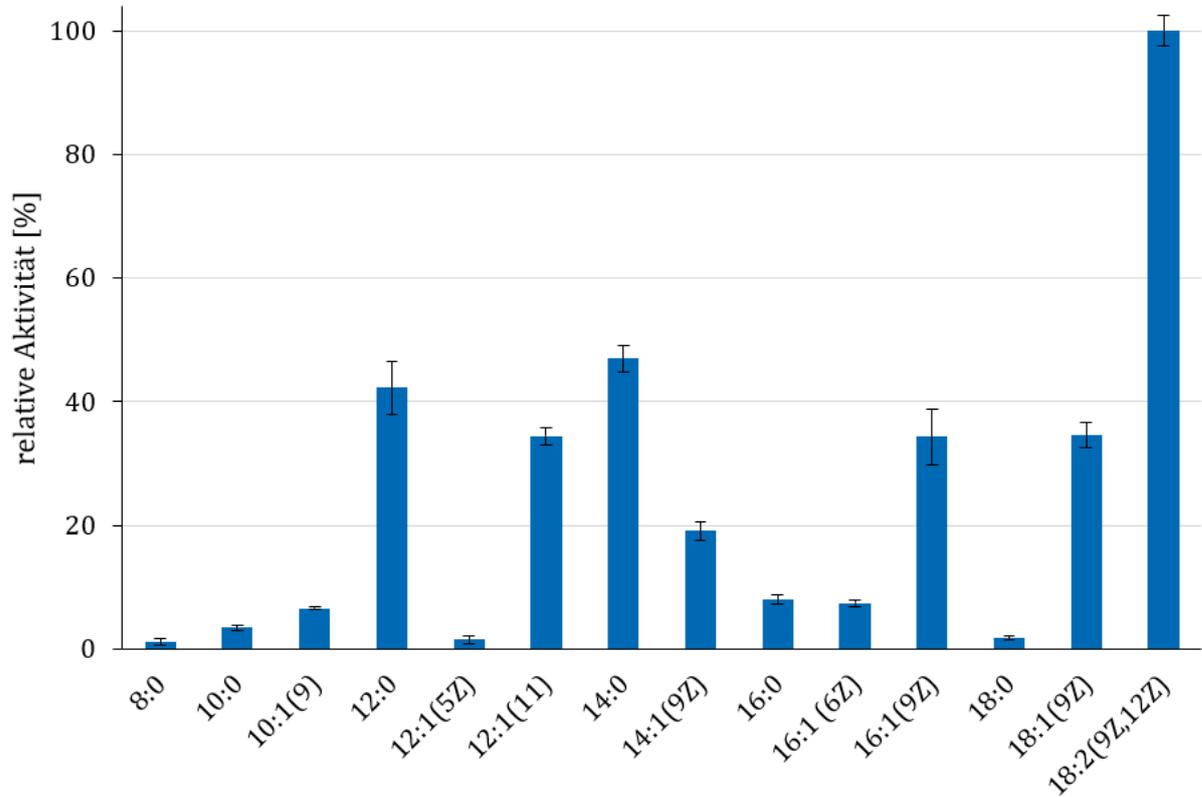


Abbildung 49: Relative Enzymaktivitäten (Substratspektrum) der $Cs\alpha$ -DOX bei 100 μ M Substratkonzentration, bezogen auf das beste getestete Substrat Linolsäure unter Angabe der Standardfehler. Den dargestellten Werten liegen jeweils Fünffachbestimmungen zugrunde.

3.8 Darstellung und Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Aldehyde

3.8.1 Gaschromatographische Charakterisierung und Strukturanalyse der isolierten Substanzen

3.8.1.1 Gaschromatographische Charakterisierung

Die kommerziell erworbenen ω 1-ungesättigten Alkohole sowie die synthetisierten bzw. mittels Biotransformation gewonnenen und isolierten Alkohole und Aldehyde (2.10.1.4) wurden gaschromatographisch analysiert (2.10.2). Die RIs wurden nach van den Dool und Kratz (1963) berechnet sowie die Reinheit der isolierten Syntheseprodukte abgeschätzt (Tabelle 110 und 111).

Tabelle 110: Gaschromatographisch bestimmte Charakteristika der ω 1-ungesättigten Aldehyde und Alkohole.

Substanz	Herkunft	Reinheit [%]	RI ^a	
			VF-WAXms (polar)	DB-5ms (unpolar)
Hept-6-enal	Eigensynthese	> 96	1240	893
Hept-6-en-1-ol	Eigensynthese	> 95	1518	962
Oct-7-enal	Eigensynthese	> 98	1342	995
Oct-7-en-1-ol	kommerziell	> 98	1614	1063
Non-8-enal	Eigensynthese	> 98	1446	1096
Non-8-en-1-ol	kommerziell	> 99	1719	1164
Dec-9-enal	Eigensynthese	> 99	1551	1198
Dec-9-en-1-ol	kommerziell	> 99	1827	1264
Undec-10-enal	kommerziell	> 99	1656	1300
Undec-10-en-1-ol	kommerziell	100	1922	1365
Dodec-11-enal	Eigensynthese	> 99	1761	1402
Dodec-11-en-1-ol	Eigensynthese	> 99	2028	1466
Tridec-12-enal	Eigensynthese	> 98	1868	1503
Tridec-12-en-1-ol	Eigensynthese	> 99	2128	1567
Pentadec-14-enal	Eigensynthese	> 99	2078	1707
Pentadec-14-en-1-ol	Eigensynthese	> 99	2323	1770

^a RI nach van den Dool und Kratz (1963)

Ergebnisse

Tabelle 111: Gaschromatographisch bestimmte Charakteristika der methylverzweigten Aldehyde.

Substanz	Herkunft	Reinheit [%]	RI ^a	
			VF-WAXms (polar)	DB-5ms (unpolar)
9-Methylundecanal	Eigensynthese	> 98	1674	1380
10-Methylundecanal	Eigensynthese	> 96	1660	1373
10-Methyldodecanal	Eigensynthese	> 92	1780	1482
11-Methyldodecanal	Eigensynthese	> 98	1766	1476
11-Methyltridecanal	Eigensynthese	> 95	1886	1584
12-Methyltridecanal	Eigensynthese	> 95	1871	1576
12-Methyltetradecanal	Eigensynthese	> 96	1992	1686
13-Methyltetradecanal	Eigensynthese	> 93	1976	1678

^a RI nach van den Dool und Kratz (1963)

3.8.1.2 Strukturanalyse der isolierten ω 1-ungesättigten Aldehyde und Alkohole

Die Tabellen 112 bis 122 zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen und kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen für die synthetisierten (2.10.1.1 bzw. 2.10.1.2) endständig ungesättigten Verbindungen. Es wurden stets die zehn intensivsten m/z -Signale der jeweiligen MS-Spektren dokumentiert. Im digitalen Anhang befinden sich die entsprechenden Massen- und NMR-Spektren.

Tabelle 112: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Hept-6-enal ($C_7H_{12}O$).

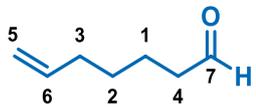
Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 68 (100), 41 (79), 67 (64), 55 (52), 39 (49), 79 (46), 57 (29), 43 (24), 42 (24), 56 (23)
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃ , TMS)	δ = 1,65 (m, 2H, -CH ₂ , 1-C), 1,44 (m, 2H, -CH ₂ , 2-C), 2,08 (m, 2H, -CH ₂ , 3-C), 2,44 (td (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, -CH ₂ , 4-C), 4,96 (m, 1H, =CH ₂ , 5-C), 5,01 (dq (J = 2,0 und 17,0 Hz), 1H, =CH ₂ , 5-C), 5,79 (ddt (J = 6,5, 10,0 und 17,0 Hz), 1H, =CH, 6-C), 9,77 (t (J = 2,0 Hz), 1H, 7-C)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃ , TMS)	δ = 21,5 (1), 28,3 (2), 33,4 (3), 43,7 (4), 114,9 (5), 138,2 (6), 202,6 (7)

Tabelle 113: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Hept-6-en-1-ol ($C_7H_{14}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 67 (100), 54 (93), 55 (80), 68 (72), 81 (62), 41 (59), 39 (41), 43 (32), 57 (27), 42 (27)
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃ , TMS)	δ = 1,39 (m, 2H, -CH ₂ , 1-C), 1,43 (m, 2H, -CH ₂ , 2-C), 1,58 (p (J = 7,0 Hz), 2H, -CH ₂ , 3-C), 2,07 (q (J = 7,0 Hz), 2H, -CH ₂ , 4-C), 3,64 (m, 2H, -CH ₂ , 5-C), 4,94 (m, 1H, =CH ₂ , 6-C), 5,00 (m, 1H, =CH ₂ , 6-C), 5,81 (ddt (J = 6,5, 10,0 und 17,0 Hz), 1H, =CH, 7-C)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃ , TMS)	δ = 25,2 (1), 28,7 (2), 32,6 (3), 33,7 (4), 63,0 (5), 114,4 (6), 138,9 (7)

Ergebnisse

Tabelle 114: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Oct-7-enal ($C_8H_{14}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 41 (100), 55 (90), 67 (88), 39 (57), 54 (55), 82 (46), 79 (36), 93 (35), 57 (34), 80 (33)
1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 1,64 (p (J = 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 1-C), 1,41 (m , 2H, $-CH_2$, 2-C), 1,35 (m , 2H, $-CH_2$, 3-C), 2,06 (m , 2H, $-CH_2$, 4-C), 2,43 (td (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 5-C), 4,94 (m , 1H, $=CH_2$, 6-C), 5,00 (dq (J = 2,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH_2$, 6-C), 5,79 (ddt (J = 6,5, 10,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH$, 7-C), 9,77 (t (J = 2,0 Hz), 1H, $-CH$, 8-C)
^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 21,9 (1), 28,6 (2), 28,6 (3), 33,5 (4), 43,7 (5), 114,5 (6), 138,7 (7), 202,8 (8)

Tabelle 115: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Non-8-enal ($C_9H_{16}O$).

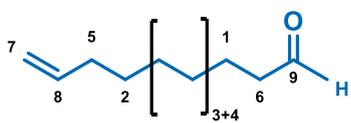
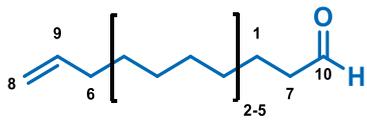
Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (72), 54 (49), 81 (48), 67 (45), 39 (38), 68 (34), 79 (31), 57 (26), 43 (24)
1H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 1,65 (p (J = 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 1-C), 1,39 (m , 2H, $-CH_2$, 2-C), 1,33 (m , 4H, $-CH_2$, 3-C/4-C), 2,04 (m , 2H, $-CH_2$, 5-C), 2,42 (td (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 6-C), 4,94 (m , 1H, $=CH_2$, 7-C), 4,99 (dq (J = 2,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH_2$, 7-C), 5,80 (ddt (J = 6,5, 10,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH$, 8-C), 9,77 (t (J = 2,0 Hz), 1H, $-CH$, 9-C)
^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 22,0 (1), 28,7 (2), 28,8 (3), 29,0 (4), 33,7 (5), 43,9 (6), 114,3 (7), 138,9 (8), 202,9 (9)

Tabelle 116: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Dec-9-enal ($C_{10}H_{18}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 41 (100), 55 (87), 67 (68), 68 (63), 69 (53), 39 (41), 54 (40), 81 (38), 79 (35), 57 (35)
1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 1,63 (p (J = 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 1-C), 1,31–1,38 (m , 8H, $-CH_2$, 2-C/3-C/4-C/5-C), 2,04 (m , 2H, $-CH_2$, 6-C), 2,42 (td (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, $-CH_2$, 7-C), 4,93 (ddt (J = 1,0, 2,0 und 10,0 Hz), 1H, $=CH_2$, 8-C), 4,99 (dq (J = 2,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH_2$, 8-C), 5,80 (ddt (J = 6,5, 10,0 und 17,0 Hz), 1H, $=CH$, 9-C), 9,76 (t (J = 2,0 Hz), 1H, $-CH$, 10-C)
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 22,0 (1), 28,8 (2), 28,9 (3), 29,1 (4), 29,2 (5), 33,7 (6), 43,9 (7), 114,2 (8), 139,1 (9), 202,9 (10)

Ergebnisse

Tabelle 117: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Dodec-11-enal ($C_{12}H_{22}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (75), 67 (53), 81 (49), 69 (35), 68 (34), 82 (30), 57 (29), 83 (29), 54 (28)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 1,63 (ρ ($J = 7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,37 (m , 2H, $-\text{CH}_2$, 2-C), 1,27–1,34 (m , 10H, $-\text{CH}_2$, 3-C/4-C/5-C/6-C/7-C), 2,02 (q ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 8-C), 2,42 (td ($J = 2,0$ und $7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 9-C), 4,93 (m , 1H, $=\text{CH}_2$, 10-C), 4,99 (m , 1H, $=\text{CH}_2$, 10-C), 5,81 (ddt ($J = 6,5$, $10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 11-C), 9,77 (m , 1H, $-\text{CH}$, 12-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 22,1 (1), 28,9 (2), 29,1 (3), 29,2 (4), 29,3 (5), 29,4 (6), 29,4 (7), 33,8 (8), 43,9 (9), 114,2 (10), 139,2 (11), 203,0 (12)

Tabelle 118: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Dodec-11-en-1-ol ($C_{12}H_{24}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (68), 67 (67), 82 (61), 68 (58), 81 (55), 69 (42), 54 (40), 95 (36), 96 (28)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 1,26 (m , 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,20–1,35 (m , 12H, $-\text{CH}_2$, 2-C/3-C/4-C/5-C/6-C/7-C), 1,56 (ρ ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 8-C), 2,04 (qt ($J = 1,5$ und $7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 9-C), 3,63 (t ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 10-C), 4,93 (m , 1H, $=\text{CH}_2$, 11-C), 4,97 (ddt ($J = 1,0$, $2,0$ und $10,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}_2$, 11-C), 5,81 (ddt ($J = 6,5$, $10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 12-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 25,7 (1), 28,9 (2), 29,1 (3), 29,4 (4), 29,5 (5), 29,5 (6), 29,6 (7), 32,8 (8), 33,8 (9), 63,1 (10), 114,1 (11), 139,2 (12)

Tabelle 119: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Tridec-12-enal ($C_{13}H_{24}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (80), 67 (56), 69 (52), 81 (51), 68 (37), 82 (34), 57 (32), 83 (32), 98 (32)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 1,63 (ρ ($J = 7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,37 (m , 2H, $-\text{CH}_2$, 2-C), 1,26–1,34 (m , 12H, $-\text{CH}_2$, 3-C/4-C/5-C/6-C/7-C/8-C), 2,04 (m , 2H, $-\text{CH}_2$, 9-C), 2,42 (td ($J = 2,0$ und $7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 10-C), 4,93 (m , 1H, $=\text{CH}_2$, 11-C), 4,99 (dq ($J = 2,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}_2$, 11-C), 5,81 (ddt ($J = 6,5$, $10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 12-C), 9,76 (t ($J = 2,0$ Hz), 1H, $-\text{CH}$, 13-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta =$ 22,1 (1), 28,9 (2), 29,1 (3), 29,2 (4), 29,4 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,5 (8), 33,8 (9), 43,9 (10), 114,1 (11), 139,2 (12), 203,0 (13)

Ergebnisse

Tabelle 120: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Tridec-12-en-1-ol ($C_{13}H_{26}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (64), 82 (63), 67 (61), 68 (56), 81 (55), 69 (45), 95 (37), 54 (34), 96 (32)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 1,35 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,38 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 2-C), 1,25–1,32 (<i>m</i> , 12H, $-\text{CH}_2$, 3-C/4-C/5-C/6-C/7-C/8-C), 1,56 (<i>p</i> ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 9-C), 2,04 (<i>q</i> ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 10-C), 3,64 (<i>t</i> ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 11-C), 4,93 (<i>m</i> , 1H, $=\text{CH}_2$, 12-C), 4,99 (<i>m</i> , 1H, $=\text{CH}_2$, 12-C), 5,81 (<i>ddt</i> ($J = 6,5, 10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 13-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 25,8 (1), 29,0 (2), 29,2 (3), 29,4 (4), 29,5 (5), 29,6 (6), 29,6 (7), 29,6 (8), 32,8 (9), 33,8 (10), 63,1 (11), 114,1 (12), 139,3 (13)

Tabelle 121: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Penta-dec-14-enal ($C_{15}H_{28}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 41 (70), 69 (50), 67 (50), 81 (49), 82 (38), 83 (37), 95 (35), 98 (34), 43 (32)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 1,63 (<i>p</i> ($J = 7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,37 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 2-C), 1,25–1,33 (<i>m</i> , 16H, $-\text{CH}_2$, 3-C/4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C), 2,04 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 11-C), 2,42 (<i>td</i> ($J = 2,0$ und $7,5$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 12-C), 4,92 (<i>m</i> , 1H, $=\text{CH}_2$, 13-C), 4,99 (<i>dq</i> ($J = 2,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}_2$, 13-C), 5,81 (<i>ddt</i> ($J = 6,5, 10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 15-C), 9,76 (<i>t</i> ($J = 2,0$ Hz), 1H, $-\text{CH}$, 15-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 22,1 (1), 29,0 (2), 29,2 (3), 29,2 (4), 29,4 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,6 (8), 29,6 (9), 29,6 (10), 33,8 (11), 43,9 (12), 114,1 (13), 139,3 (14), 202,9 (15)

Tabelle 122: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von Penta-dec-14-en-1-ol ($C_{15}H_{30}O$).

Strukturformel	
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 55 (100), 82 (72), 41 (60), 68 (55), 67 (52), 69 (52), 81 (52), 96 (40), 95 (39), 83 (33)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 1,33 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 1,20–1,42 (<i>m</i> , 18H, $-\text{CH}_2$, 2-C/3-C/4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C), 1,57 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 11-C), 2,04 (<i>m</i> , 2H, $-\text{CH}_2$, 12-C), 3,64 (<i>q</i> ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 13-C), 4,93 (<i>m</i> , 1H, $=\text{CH}_2$, 14-C), 4,99 (<i>dq</i> ($J = 1,5$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}_2$, 14-C), 5,82 (<i>ddt</i> ($J = 6,5, 10,0$ und $17,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 15-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 25,8 (1), 29,0 (2), 29,2 (3), 29,4 (4), 29,5 (5), 29,6 (6), 29,6 (7), 29,6 (8), 29,6 (9), 29,7 (10), 32,8 (11), 33,8 (12), 63,1 (13), 114,1 (14), 139,3 (15)

3.8.1.3 Strukturanalyse der isolierten methylverzweigten Aldehyde

Die Tabellen 123 bis 130 zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen und kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen für die aus Biotransformationen (2.10.1.3) erhaltenen methylverzweigten Aldehyde. Für die MS-Analysen wurden stets die zehn intensivsten m/z -Signale dokumentiert.

Tabelle 123: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 9-Methylundecanal ($C_{12}H_{24}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	185,1893 Da (-4,0 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 57 (100), 95/81 (84), 70 (84), 69 (70), 55 (65), 41 (59), 82/67 (51), 96 (50)
1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 0,84 (<i>d</i> (J = 6,5 Hz), 3H, - CH_3 , 2-C), 0,85 (<i>t</i> (J = 7,0 Hz), 3H, - CH_3 , 1-C), 1,11–1,39 (<i>m</i> , 13H, - CH_2 /-CH, 4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C), 1,63 (<i>p</i> (J = 7,0 Hz), 2H, - CH_2 , 3-C), 2,42 (<i>td</i> (J = 1,5 und 7,0 Hz), 2H, - CH_2 , 11-C), 9,77 (<i>t</i> (J = 2,0 Hz), 1H, =CH, 12-C)
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 11,4 (1), 19,2 (2), 22,1 (3), 27,0 (4), 29,2 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,8 (8), 34,4 (9), 36,6 (10), 43,9 (11), 203,0 (12)

Tabelle 124: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 10-Methylundecanal ($C_{12}H_{24}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	185,1899 Da (-0,3 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%): 57 (100), 82 (84), 43 (70), 56 (60), 69 (59), 55 (58), 41 (56), 95 (53), 81 (52), 67 (45)
1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 0,86 (<i>d</i> (J = 6,5 Hz), 6H, CH_3 , 2 C/3-C), 1,16 (<i>m</i> , 2H, CH_2 , 10-C), 1,22–1,35 (<i>m</i> , 10H, CH_2 , 4 C/6-C/7 C/8-C/9-C), 1,50 (<i>n</i> (J = 6,5 Hz), 1H, CH, 5-C), 1,64 (<i>p</i> (J = 7,5 Hz), 2H, CH_2 , 1-C), 2,42 (<i>td</i> (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, CH_2 , 11-C), 9,77 (<i>t</i> (J = 2,0 Hz), 1H, =CH, 12 C)
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$, TMS)	δ = 22,1 (1), 22,7 (2), 22,7 (3), 27,4 (4), 28,0 (5), 29,2 (6), 29,4 (7), 29,5 (8), 29,9 (9), 39,0 (10), 44,0 (11), 203,0 (12)

Ergebnisse

Tabelle 125: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 10-Methyl-dodecanal ($C_{13}H_{26}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	199,2051 Da (-2,7 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 95 (100), 57 (96), 70 (86), 55 (66), 82 (65), 81 (64), 69 (59), 41 (57), 83 (57), 71 (51)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 0,84 (<i>d</i> (J = 6,0 Hz), 3H, - CH_3 , 2-C), 0,85 (<i>t</i> (J = 7,0 Hz), 3H, - CH_3 , 1-C), 1,04–1,35 (<i>m</i> , 15H, - CH_2 /-CH, 4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C/11-C), 1,63 (<i>p</i> (J = 7,0 Hz), 2H, - CH_2 , 3-C), 2,42 (<i>td</i> (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, - CH_2 , 12-C), 9,77 (<i>t</i> (J = 2,0 Hz), 1H, =CH, 13-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 11,4 (1), 19,2 (2), 22,1 (3), 27,1 (4), 29,2 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,5 (8), 29,9 (9), 34,4 (10), 36,6 (11), 44,0 (12), 203,0 (13)

Tabelle 126: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 11-Methyl-dodecanal ($C_{13}H_{26}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	199,2058 Da (+0,7 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 57 (100), 82 (89), 43 (68), 96/69 (62), 95 (59), 55 (58), 81 (56), 56 (54), 41 (51)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 0,86 (<i>d</i> (J = 6,5 Hz), 6H, - CH_3 , 2-C/3-C), 1,15 (<i>m</i> , 2H, - CH_2 , 11-C), 1,20–1,35 (<i>m</i> , 12H, - CH_2 , 4-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C), 1,51 (<i>n</i> (J = 6,5 Hz), 1H, -CH, 5-C), 1,63 (<i>p</i> (J = 7,0 Hz), 2H, - CH_2 , 1-C), 2,42 (<i>td</i> (J = 1,5 und 7,5 Hz), 2H, - CH_2 , 12-C), 9,77 (<i>t</i> (J = 2,0 Hz), 1H, =CH, 13-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 22,1 (1), 22,7 (2), 22,7 (3), 27,4 (4), 28,0 (5), 29,2 (6), 29,4 (7), 29,5 (8), 29,6 (9), 29,9 (10), 39,1 (11), 44,0 (12), 203,0 (13)

Tabelle 127: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 11-Methyltridecanal ($C_{14}H_{28}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	213,2208 Da (-2,3 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 57 (100), 70 (92), 95 (89), 83 (77), 55 (74), 82 (73), 81 (69), 96 (63), 109 (62), 41 (57)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 0,84 (<i>d</i> (J = 6,0 Hz), 3H, - CH_3 , 2-C), 0,85 (<i>t</i> (J = 7,0 Hz), 3H, - CH_3 , 1-C), 1,10–1,32 (<i>m</i> , 17H, - CH_2 /-CH, 4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C/11-C/12-C), 1,63 (<i>p</i> (J = 7,5 Hz), 2H, - CH_2 , 3-C), 2,42 (<i>td</i> (J = 2,0 und 7,5 Hz), 2H, - CH_2 , 13-C), 9,77 (<i>t</i> (J = 2,0 Hz), 1H, =CH, 14-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	δ = 11,4 (1), 19,2 (2), 22,1 (3), 27,1 (4), 29,2 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,5 (8), 29,6 (9), 30,0 (10), 34,4 (11), 36,6 (12), 44,0 (13), 203,0 (14)

Ergebnisse

Tabelle 128: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 12-Methyltridecanal ($C_{14}H_{28}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	213,2214 Da (+0,5 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 82/57 (100), 43 (70), 96/69 (63), 95 (61), 55 (59), 81 (56), 56 (54), 41 (51)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 0,86$ (d ($J = 6,5$ Hz), 6H, $-\text{CH}_3$, 2-C/3-C), 1,13 (m, 2H, $-\text{CH}_2$, 12-C), 1,23–1,34 (m, 14H, $-\text{CH}_2$, 4-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C/11-C), 1,51 (n ($J = 6,5$ Hz), 1H, $-\text{CH}$, 5-C), 1,63 (p ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 2,42 (td ($J = 1,5$ und 7,5 Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 13-C), 9,76 (t ($J = 1,5$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 14-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 22,1$ (1), 22,7 (2), 22,7 (3), 27,4 (4), 28,0 (5), 29,2 (6), 29,4 (7), 29,4 (8), 29,6 (9), 29,7 (10), 29,9 (11), 39,1 (12), 43,9 (13), 203,0 (14)

Tabelle 129: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 12-Methyltetradecanal ($C_{15}H_{30}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	227,2372 Da (+1,3 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 57 (100), 70 (93), 95 (88), 82 (80), 55 (74), 83/81 (69), 96 (64), 97 (63), 71 (62)
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 0,84$ (d ($J = 6,0$ Hz), 3H, $-\text{CH}_3$, 2-C), 0,85 (t ($J = 7,0$ Hz), 3H, $-\text{CH}_3$, 1-C), 1,08–1,33 (m, 19H, $-\text{CH}_2/-\text{CH}$, 4-C/5-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C/11-C/12-C/13-C), 1,63 (p ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 3-C), 2,42 (td ($J = 2,0$ und 7,5 Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 14-C), 9,77 (t ($J = 2,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 15-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 11,4$ (1), 19,2 (2), 22,1 (3), 27,1 (4), 29,2 (5), 29,4 (6), 29,5 (7), 29,5 (8), 29,6 (9), 29,7 (10), 30,0 (11), 34,4 (12), 36,7 (13), 44,0 (14), 203,0 (15)

Tabelle 130: Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Kenngrößen von 13-Methyltetradecanal ($C_{15}H_{30}O$).

Strukturformel	
akkurate Masse (mit Abweichung)	227,2371 Da (+0,8 ppm)
Massenspektrum (EI, 70 eV)	m/z (%) : 82 (100), 57 (97), 96 (71), 43 (67), 69 (60), 95/55 (58), 83/81 (53), 56 (49)
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 0,86$ (d ($J = 6,5$ Hz), 6H, $-\text{CH}_3$, 2-C/3-C), 1,15 (m, 2H, $-\text{CH}_2$, 13-C), 1,20–1,30 (m, 16H, $-\text{CH}_2$, 4-C/6-C/7-C/8-C/9-C/10-C/11-C/12-C), 1,51 (n ($J = 6,5$ Hz), 1H, $-\text{CH}$, 5-C), 1,63 (p ($J = 7,0$ Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 1-C), 2,42 (td ($J = 2,0$ und 7,5 Hz), 2H, $-\text{CH}_2$, 14-C), 9,77 (t ($J = 2,0$ Hz), 1H, $=\text{CH}$, 15-C)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , TMS)	$\delta = 22,1$ (1), 22,7 (2), 22,7 (3), 27,4 (4), 28,0 (5), 29,2 (6), 29,4 (7), 29,4 (8), 29,6 (9), 29,7 (10), 29,7 (11), 30,0 (10), 39,1 (11), 44,0 (12), 203,0 (13)

3.8.2 Sensorische Charakterisierung der ω 1-ungesättigten Aldehyde

3.8.2.1 Bestimmung der sensorischen Reinheit mittels GC-FID-O

Mit Ausnahme von Undec-10-, Dodec-11- und Tridec-12-enal wiesen alle Aldehyde einen olfaktorische Reinheitsfaktor (2.10.3.1) von $ORF \geq 10$ auf. Für Tridec-12-enal wurde keine Verdünnungsstufe ohne die Wahrnehmung von Fremdstoffen festgestellt (Tabelle 131). Pentadec-14-enal wurde mittels GC-FID-O nicht wahrgenommen.

Tabelle 131: Mittels GC-FID-O bestimmte höchste (VF_o) und niedrigste (VF_u) Verdünnungsfaktoren ohne olfaktorische Wahrnehmung von Fremdstoffen sowie die daraus errechneten ORF-Werte. Zusätzlich ist die gemäß 2.10.2 abgeschätzte Reinheit angegeben.

Substanz	Reinheit [%]	VF_u	VF_o	ORF
Hept-6-enal	> 96	1	100	100
Oct-7-enal	> 98	20	200	10
Non-8-enal	> 98	1	100	100
Dec-9-enal	> 99	200	2000	10
Undec-10-enal	> 99	5	25	5
Dodec-11-enal	> 99	5	20	4
Tridec-12-enal	> 97	40	-	-

3.8.2.2 Bestimmung der Geruchsqualitäten

Die Geruchsqualitäten wurden durch ein 7-köpfiges Panel in wässriger Lösung bestimmt (2.10.3.2). Für alle Substanzen wurden Spinnennetz-Diagramme erstellt, welche die gemittelte Bewertung darstellen (Abbildung A 1 bis A 7 (Anhang F)). Die mit den fünf höchsten Intensitäten bewerteten Attribute wurden als repräsentativ für jede Substanz betrachtet (Tabelle 132). Pentadec-14-enal war in Vorversuchen nicht wahrnehmbar und blieb daher unberücksichtigt.

Tabelle 132: Evaluierete Substanzen mit den jeweils fünf am intensivsten bewerteten Attributen. In Klammern sind die mittleren durch das Panel bestimmten Intensitäten angegeben.

Substanz	Geruchsqualität (Intensität)
Hept-6-enal	nach Gurke (4,6), grün (3,0), grasig (2,7), nach Melone (2,3), frisch (1,9)
Oct-7-enal	grün (2,9), metallisch (2,1), nach Melone (1,6), nach Gurke (1,4), nach Koriander-Blättern/grasig (1,3)
Non-8-enal	metallisch (2,6), nach Koriander-Blättern (2,1), nach Pappe (1,9), grün (1,7), seifig/medizinisch (1,6)
Dec-9-enal	nach Koriander-Blättern/grün (2,7), seifig (2,6), wächsern (2,0), krautig/frisch (1,7)
Undec-10-enal	nach Koriander-Blättern (3,3), grün (3,0), seifig (2,3), wächsern (1,9), krautig/nach Gurke/fettig (1,4)
Dodec-11-enal	nach Koriander-Blättern (3,1), seifig/krautig (2,3), grün (2,0), wächsern (1,7)
Tridec-12-enal	nach Koriander-Blättern/krautig (2,4), dumpf/wächsern (2,0), grün (1,9)

3.8.2.3 Bestimmung der Geruchsschwellen

Darüber hinaus wurden die Schwellen der ω 1-ungesättigten Aldehyde und Alkohole durch vier Panellisten mittels GC-FID-O in Luft bestimmt (2.10.3.3) und nach Gleichung (5) berechnet (Abbildung 50). Ein 24-köpfiges Panel bestimmte daneben die Geruchsschwellen in wässriger Lösung (2.10.3.4), die nach Gleichung (6) berechnet wurden. Dabei wurde zwischen Wahrnehmungs- und Erkennungsschwellenwerten unterschieden (Abbildung 51).

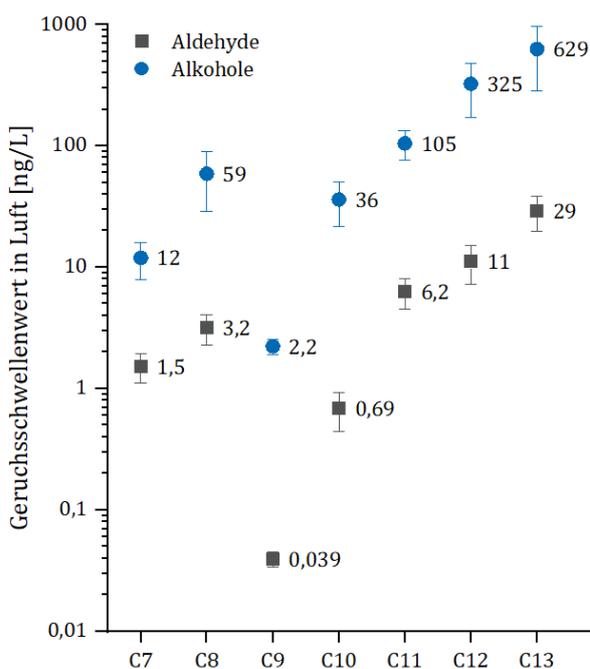


Abbildung 50: Geruchsschwellenwerte ω 1-ungesättigter Aldehyde (grau) und Alkohole (blau) in Luft.

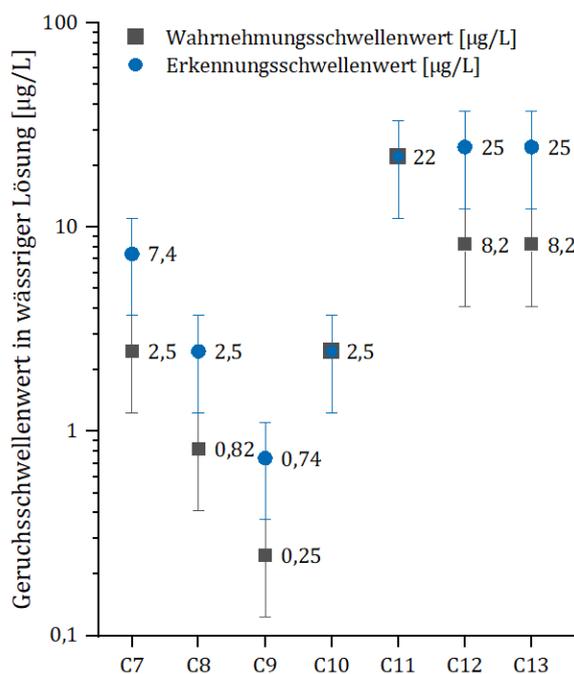


Abbildung 51: Wahrnehmungs- (grau) und Erkennungsschwellenwerte (blau) ω 1-ungesättigter Aldehyde in wässriger Lösung.

3.8.3 Sensorische Charakterisierung der methylverzweigten Aldehyde

3.8.3.1 Bestimmung der Geruchsqualitäten

Die Geruchsattribute der methylverzweigten Aldehyde wurden anhand einer einfach beschreibenden Prüfung der Reinsubstanzen sowie per GC-FID-O ermittelt (Tabelle 133).

Ergebnisse

Tabelle 133: Geruchsattribute der methylverzweigten Aldehyde.

Substanz	Geruchsattribute	
	Reinsubstanz	ODP
9-Methylundecanal	grün, nach Heu, holzig, krautig, seifig, würzig	citrusartig, grün, holzig, nach Koriander-Blättern, krautig, metallisch, seifig, wächsern, würzig
10-Methylundecanal	citrusartig, grün, krautig, sahnig, seifig	citrusartig, grün, fettig, nach Koriander-Blättern, krautig, sahnig, seifig, süßlich
10-Methyl-dodecanal	holzig, süßlich, talgig, nach Wasabi, würzig	grün, nach Koriander-Blättern, krautig, metallisch, sahnig, seifig, talgig, wächsern, würzig
11-Methyl-dodecanal	krautig, seifig, würzig	citrusartig, grün, nach Koriander-Blättern, krautig, metallisch, süßlich, seifig, wächsern, würzig
11-Methyltridecanal	süßlich, talgig, nach Wasabi, würzig	grün, nach Koriander-Blättern, krautig, metallisch, seifig, süßlich, talgig, wächsern
12-Methyltridecanal	grün, metallisch, pfeffrig, süßlich, talgig	grün, nach Koriander-Blättern, krautig, metallisch, seifig, süßlich, talgig, würzig
12-Methyltetradecanal	metallisch, pfeffrig, süßlich	grün, nach Koriander-Blättern, metallisch, seifig, süßlich, wächsern
13-Methyltetradecanal	grün, metallisch, süßlich	grün, nach Koriander-Blättern, metallisch, seifig, süßlich, wächsern

3.8.3.2 Bestimmung der Geruchsschwellen in Luft

Zur Berechnung der Geruchsschwellen in Luft war die Quantifizierung der Aldehyde in den Stammlösungen notwendig. Diese erfolgte mittels externer Kalibrierung über die entsprechenden unverzweigten Aldehyde (2.10.3.4). Die erzielten Kalibriergeraden wiesen alle Bestimmtheitsmaße $> 0,999$ auf (Abbildung 52).

Die Geruchsschwellen der homologen Reihen *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter sowie unverzweigter Aldehyde wurden durch drei Panellisten bestimmt (Abbildung 53).

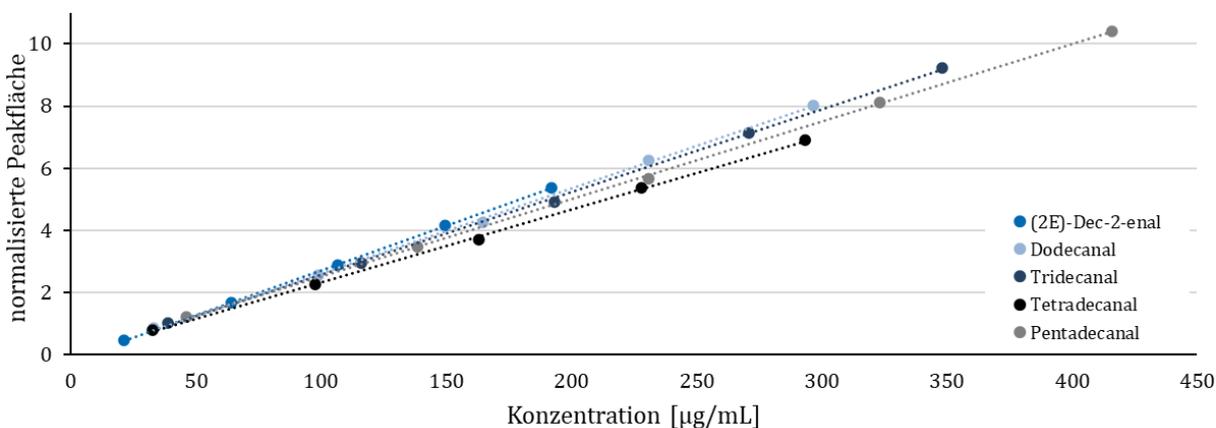


Abbildung 52: Kalibriergeraden zur Quantifizierung der methylverzweigten Aldehyde anhand ihrer unverzweigten Pendants. Die Peakflächen wurden mittels eines Injektionsstandards normalisiert.

Ergebnisse

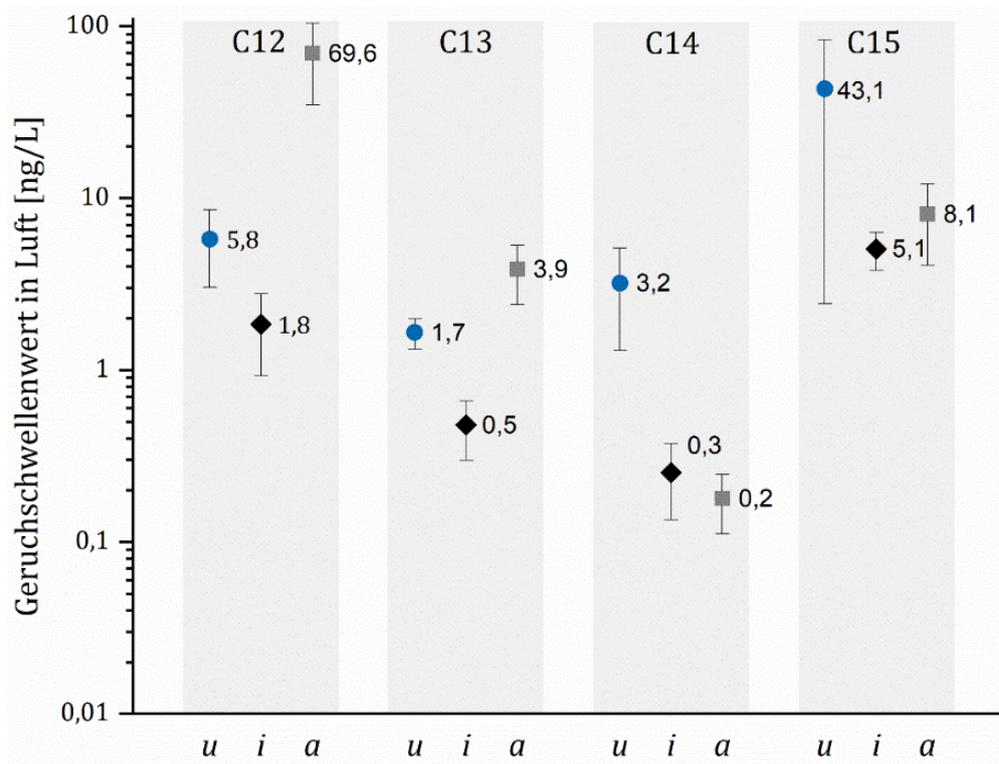


Abbildung 53: Geruchsschwellenwerte unverzweigter (u, blau), iso- (i, schwarz) und anteiso- (a, grau) methylverzweigter Aldehyde in Luft.

4 Diskussion

4.1 Screening verschiedener Pilz-Spezies mit Fokus auf der Bildung relevanter Fettsäuren

4.1.1 Herangehensweise und Methodik des Screenings

Als Quelle ungewöhnlicher Fettsäuren sollten Pilze genutzt werden. Daher wurden 38 verschiedene Spezies als potentielle Produktionsorganismen auf ihre gebildete Biomasse, Lipidmenge und Fettsäureverteilung hin untersucht. Um ein möglichst breit angelegtes Screening vieler Spezies zu ermöglichen, erfolgten die Analysen der Lipidgehalte und Fettsäureprofile zunächst in Form von Einfachbestimmungen. Im Falle interessanter Spezies wurden weitere Bestimmungen nachgezogen. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass sich die dargestellten Ergebnisse auf eine bestimmte Kulturdauer unter definierten Parametern (z.B. Nährmedium, Temperatur) beziehen. Zwar sind durch genetische Gegebenheiten primär die jeweiligen Organismen für die Qualität der gebildeten Lipide verantwortlich, doch modulieren die Umgebungsbedingungen deren quantitative Proportionen. Auch die Lipidgehalte sind abhängig von Wachstumsphase und Kulturbedingungen, sodass es sich bei den aufgeführten Resultaten um „Momentaufnahmen“ handelt, die nur bedingt einen sinnvollen Vergleich mit Literaturwerten erlauben (Weete 1974; Wassef 1977; Ratledge 1994).

Die Auswahl der gescreenten Spezies erfolgte auf Grundlage einer ausführlichen Literaturstudie (siehe digitaler Anhang). Darüber hinaus wurde eine Reihe von Spezies untersucht, für die bislang keinerlei dokumentierte Fettsäureprofile gefunden wurden oder die aufgrund der Bildung hoher Lipidgehalte interessant schienen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Ständerpilze (Basidiomycota) gelegt. Diese Abteilung galt im Hinblick auf ihre Fettsäuren lange Zeit als wenig untersucht (Weete 1974). Aus jüngerer Zeit liegen zwar mehrere Untersuchungen vor, diese beschäftigen sich jedoch in erster Linie mit ernährungsphysiologischen Bewertungen, denen Fruchtkörper anstelle von Myzel als Untersuchungsmaterial zugrunde liegen und in denen meist nur die Hauptfettsäuren identifiziert wurden (Shaw 1967; Rezanka und Mares 1987; Diez und Alvarez 2001; Pedneault *et al.* 2006; Pedneault *et al.* 2007; Barros *et al.* 2008a; Barros *et al.* 2008b; Kavishree *et al.* 2008; Pedneault *et al.* 2008; Kalač 2009; Beluhan und Ranogajec 2011; Marekov *et al.* 2012; Sinanoglou *et al.* 2015).

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Speicherlipide gelegt, bei denen es sich hauptsächlich um unpolare Lipide handelt. Sie liegen als Lipidkörper im Cytoplasma der Pilzzelle vor (Weete 1974; Lösel und Sancholle 1996) und besitzen im Vergleich zu den Lipiden der Membran und Zellwand den Vorteil, dass sich deren Ausbeute durch die Kulturführung maßgeblich steigern lässt (4.2). Als Extraktionsmittel wurde daher Petrolether bzw. *n*-Hexan verwendet (2.6.1). Zur Bestimmung der Lipidgehalte wurden die gewonnenen Extrakte bei 105 °C getrocknet. Diese thermische Belastung erforderte wiederum eine Überprüfung, ob die Fettsäureprofile durch autoxidative Prozesse beeinflusst wurden. Wie eine Kaltextraktion mit *n*-Hexan und anschließende Trocknung verdeutlichten, erfolgte jedoch erst nach sehr langen Trocknungsdauern eine Einwirkung auf das Fettsäureprofil (Daten nicht dargestellt). Die kurzzeitige Erhitzung im Rahmen der angewandten Methodik (ca. 45 min) beeinflusste die Ergebnisse nicht.

Die gewonnenen Lipidextrakte wurden auf ihre Fettsäureprofile und damit auf potentiell interessante Aldehyd-Präkursoren hin untersucht. Die Fettsäuren fungaler Speicherlipide liegen hauptsächlich gebunden in Glyceriden vor (Weete 1974; Lösel und Sancholle 1996). Zur Methylveresterung wurde daher die alkali-katalysierte Transmethylierung verwendet, die sich durch ihre schnelle Durchführbarkeit und die Verwendung ungefährlicher Chemikalien auszeichnet (2.6.2.1). Allerdings werden ausschließlich veresterte Fettsäuren methyliert. Als Gegenprobe wurden die Lipide mehrerer Spezies exemplarisch zur Erfassung freier Fettsäuren zusätzlich mit Hilfe der Bortrifluorid-Methode methyliert (2.6.2.2). Die Fettsäureprofile wiesen keine Unterschiede auf (Daten nicht dargestellt), weshalb die Nutzung des alkali-katalysierten Schnellverfahrens als hinlänglich erachtet wurde.

Zur besseren quantitativen Einordnung wurden die relativen Anteile der jeweiligen Fettsäuren mit der Lipidausbeute verrechnet (3.1.2). Bei dieser Herangehensweise handelte es sich jedoch lediglich um eine Näherung, weil dabei andere Bestandteile als Fettsäuren vernachlässigt werden (siehe hierzu auch 4.3).

4.1.2 Wachstum, Lipidgehalt und Fettsäureprofile

Hinsichtlich des Wachstums waren die untersuchten Spezies sehr unterschiedlich. Emers bildeten die meisten Pilze zwar weißes Myzel, jedoch variierten die Wachstumsgeschwindigkeiten sehr stark (Tabelle 57). Einige Pilze bildeten sehr dünnes, filigranes Myzel, andere hingegen einen dichten Myzelrasen (Abbildung 11). Lediglich die *Mortierella*-Spezies wiesen innerhalb ihrer Gattung ein sehr ähnliches, rosettenförmiges Wachstum auf, welches für viele

Diskussion

Angehörige dieser Gattung charakteristisch ist (Gams 1977). In Submerskultur (Abbildung 12) unterschieden sich die einzelnen Spezies ebenfalls in ihrer Morphologie (Farbe, filamentöses/pellet-förmiges Wachstum) sowie in der Menge gebildeter Biomasse (Tabelle 57).

Zwar variieren die Lipidgehalte von Pilzen in Abhängigkeit von Spezies, Wachstumsphase und Kulturbedingungen (Weete 1974; Wassef 1977; Ratledge 1994), dennoch ähnelten sich alle untersuchten Ständerpilze mit Gehalten zwischen 1 und 4% in der BTM (Tabelle 57). In der Literatur finden sich für Myzelien recht ähnliche, für einige Gattungen auch etwas höhere Werte (Sumner 1973; Weete 1974; Nair 1989; Diamantopoulou *et al.* 2012; Papaspyridi *et al.* 2013), wobei, wie bereits eingangs angedeutet (4.1.1), meist eher Fruchtkörper und nur in wenigen Studien Myzel von Basidiomycota analysiert wurde. Wie direkte Vergleiche identischer Stämme nahelegten, korrelieren die Lipidgehalte von Fruchtkörpern und Myzelien nur zum Teil (Sumner 1973; Papaspyridi *et al.* 2013). Die Lipidgehalte der Schlauchpilze (Ascomycota) lagen meist höher und variierten sehr stark zwischen 2 und 23% (Tabelle 57). Diese große Spannbreite findet sich auch in der Literatur wieder (Weete 1974; Tang *et al.* 2011; Diamantopoulou *et al.* 2012). Tendenziell produzierten die Spezies der Mucoromycotina (13–30%) und Entomophthoromycotina (25%) noch mehr Lipide (Tabelle 57). Auch diese Daten passen gut zu den in der Literatur belegten Werten (Tyrrell 1971; Weete 1974; Certik *et al.* 1993). Tatsächlich können im Falle der Mucoromycotina durch entsprechende Optimierung der Kulturführung aber auch Werte über 50% erzielt werden (Papanikolaou *et al.* 2004; Ogawa *et al.* 2002). In der Regel ergaben sich Lipidausbeuten zwischen 25 und 100 mg/L. Die bereits genannten lipidreicheren Spezies lieferten bis zu 2 g/L (Abbildung 13). Pilze besitzen allerdings ein weitaus größeres Potential, wie die um ein Vielfaches höheren Ausbeuten belegen, die bei der Gewinnung mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie Arachidonsäure erzielt wurden (Ogawa *et al.* 2002). In unterschiedlichen Experimenten wurde daher der Einfluss verschiedener Parameter untersucht und dabei Ansätze zur Steigerung der Lipidproduktion aufgezeigt (4.2).

Wegen des Einflusses äußerer Parameter (4.1.1) sowie interindividueller Eigenheiten unterschiedlicher Stämme derselben Spezies (Fraatz *et al.* 2018), ist grundsätzlich nur ein qualitativer bzw. semi-quantitativer Vergleich der erhaltenen Fettsäureverteilungen mit Literaturdaten sinnvoll. Während beschriebene Hauptfettsäuren in der Regel reproduzierbar waren (beispielsweise die in CHET-N dokumentierten methylverzweigten *i*14:0, *a*15:0 und *i*16:0 (Tyrrell

1971; Fraatz *et al.* 2018)), fielen die Unterschiede hinsichtlich derjenigen Fettsäuren besonders deutlich aus, die nur in geringen Mengen vorhanden waren. Gerade bei diesen handelte es sich oft um die interessanten Komponenten (4.1.3). In der Literatur wurden diese Minorbestandteile häufig nur unzureichend identifiziert (z.B. fehlende Position von Doppelbindungen (Martínez *et al.* 1991; Rezanka und Mares 1987)) oder lediglich die Haupt-Fettsäuren dokumentiert (Shaw 1967; Sumner 1973; Stahl und Klug 1996; Diez und Alvarez 2001; Dimou *et al.* 2002; Diamantopoulou *et al.* 2012). Mögliche Ursachen für offensichtliche Differenzen zwischen den beobachteten Resultaten und früheren Studien (z.B. PER (Dimou *et al.* 2002) oder MPR (Kavishree *et al.* 2008)) können dagegen in der Untersuchung unterschiedlichen Probenmaterials liegen. Dies betrifft insbesondere Ständer- und zum Teil auch die Schlauchpilze, von denen vorwiegend Fruchtkörper anstelle von Myzel analysiert wurden (vgl. 4.1.1). Wie bereits mehrere Gruppen zeigten, können Myzel und Fruchtkörper zum Teil zwar ähnliche Fettsäureverteilungen, aber auch sehr große Unterschiede aufweisen (Sumner 1973; Tang *et al.* 2011; Papaspyridi *et al.* 2013). Eine weitere Ursache solcher eindeutigen Unterschiede kann daneben auf die Methodenwahl zurückzuführen sein. Während sich das Screening auf die unpolare Lipidfraktion beschränkte, lieferten zahlreiche Studien die Fettsäureprofile der polaren Lipide oder Gesamtlipide (Stahl und Klug 1996; Dimou *et al.* 2002; Diamantopoulou *et al.* 2012; Marekov *et al.* 2012). Holtz und Schisler legten anhand von *Agaricus bisporus* anschaulich dar, wie unterschiedlich die neutrale und polare Lipidfraktion sein können (Holtz und Schisler 1971).

Bezüglich ihrer Fettsäureprofile weisen Ascomycota und Basidiomycota keine generellen, markanten Auffälligkeiten auf. Meist stellen Linol-, Öl- und Palmitinsäure die Hauptfettsäuren dieser Pilze dar (Shaw 1966; Weete 1974; Wassef 1977), was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen. Allerdings traten in kleineren Mengen häufig Fettsäuren auf, die als „ungewöhnlich“ zu bezeichnen sind (4.1.3). Auch in der Literatur finden sich Hinweise auf geringe Quantitäten ungewöhnlicher, beispielsweise methylverzweigter, Fettsäuren in den Myzelien von Schlauchpilzen bzw. Fruchtkörpern von Ständerpilzen (Křen *et al.* 1985; Rezanka und Mares 1987; Pedneault *et al.* 2006, 2008). Viele Mucoromycotina, vor allem die Mortierellaceae, sind für die Produktion großer Mengen langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren bekannt (Amano *et al.* 1992; Ratledge 1994; Ogawa *et al.* 2002), wohingegen mehrere Entomophthoromycotina zusätzlich große Mengen methylverzweigter Fettsäuren akkumulieren (Tyrrell 1967, 1971). Auch dies deckt sich mit den in dieser Arbeit analysierten Myzelien.

4.1.3 Vorkommen ungewöhnlicher Fettsäuren

In den untersuchten Spezies wurden mehrere ungewöhnliche Fettsäuren gefunden, die jedoch aufgrund fehlender Referenzverbindungen nicht alle abschließend identifiziert werden konnten (Kriterien vgl. 3.1.2). Tabelle 134 zeigt eine Auswahl mit den vielversprechendsten Produktionsorganismen. Einige dieser Verbindungen wurden bereits in Fruchtkörpern von Pilzen nachgewiesen (Tyrrell 1971; Rezanka und Mares 1987; Pedneault *et al.* 2006, 2008; Sinanoglou *et al.* 2015), andere wiederum blieben bislang, womöglich nicht zuletzt aufgrund ihrer geringen Anteile, unentdeckt.

Unter den untersuchten Pilzen wurde FVE-D aufgrund der Vielzahl an gebildeten Fettsäuren als besonders interessant befunden. Außergewöhnlich war daneben der für Pilze atypisch hohe Anteil an Laurinsäure (Rezanka und Mares 1987; Pedneault *et al.* 2008), welcher möglicherweise der Anpassung dieses Pilzes an kalte Temperaturen geschuldet ist (4.2.2). Im Zuge weiterer Untersuchungen wurde festgestellt, dass FVE-D in nennenswerter Menge die terminal ungesättigte Dodec-11-ensäure synthetisierte (4.2.1). Zwar sind bereits mehrere zum Teil noch nicht näher definierte 12:1-Isomere in Pilzen dokumentiert (Shaw 1965; Křen *et al.* 1985; Rezanka und Mares 1987; Rezanka *et al.* 1999), doch stellt dies den ersten Nachweis dieser in der Natur selten vorkommenden Verbindung in einem Pilz dar. Größere Mengen wurden bisher lediglich in ätherischen Ölen von Lorbeer-Gewächsen gefunden (Choudhury *et al.* 1997; Wang *et al.* 2008). Spuren waren in Milchfett (Abdelqader *et al.* 2009; Renes *et al.* 2020), Blut (Christinat *et al.* 2016) sowie einzelnen Bakterien (Wells *et al.* 1992; Bruno *et al.* 2012), Insekten (Hefetz *et al.* 1996) und in Fisch enthalten (Kao *et al.* 2002).

Daneben zeichnete sich MHY-FP durch eine mengenmäßig auffällige Produktion der ω 8-ungesättigten (9Z)-Heptadec-9-ensäure aus. In sehr viel geringeren Mengen kam diese Fettsäure auch in anderen Spezies vor (Tabelle 134). Sie findet sich häufiger in der Natur, jedoch meist in Spuren. So gibt es Nachweise in anderen Pilzen (Pedneault *et al.* 2006, 2008) bzw. Indizien für ein Auftreten in anderen *Mortierella*-Spezies (Amano *et al.* 1992), aber auch in Algen (Soares *et al.* 2014) oder Milchfett (Renes *et al.* 2020).

Um die Ausbeuten der genannten Fettsäuren zu steigern, wurde in ergänzenden Experimenten der Einfluss verschiedener Kulturparameter auf deren Bildung untersucht (4.2). Durch Supplementationsstudien gelangen Einblicke in die Biosynthese der endständig ungesättigten Dodecensäure (4.4). Die Lipidextrakte beider Pilze wurden biotransformiert und die entstandenen Aldehyde gaschromatographisch-olfaktorisch analysiert (4.6).

4.2 Einfluss der Kulturparameter auf die Bildung relevanter Fettsäuren

Zwar ist die Zusammensetzung der gebildeten Lipide in erster Linie speziesabhängig, jedoch ergeben sich durch Variation der Kulturparameter Möglichkeiten zur Modifizierung (Weete 1974; Wassef 1977; Ratledge 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der wichtigsten Parameter auf das Wachstum (Biomasse und Lipide) von FVE-D und MHY-FP untersucht. Dabei wurde stets die Auswirkung auf die Fettsäureverteilung beachtet, um eine Bewertung der Ausbeuten der Zielverbindungen 12:1(11) und 17:1(9Z) zu ermöglichen. In diesem Kontext ist es unerlässlich, die Phylogenetik der beiden näher untersuchten Organismen zu berücksichtigen, da sich hieraus große Unterschiede der Lipidausbeuten ergeben. FVE-D gehört den Basidiomycota an und unterscheidet sich damit grundlegend von MHY-FP, welcher den Mucoromycotina zuzuordnen ist. Letztere weisen höhere Lipidgehalte auf. Zahlreiche Spezies können über 25% Lipide akkumulieren und werden in Analogie zu ölreichen Saaten als *oleaginous*, das Öl als *single cell oil* (SCO) bezeichnet. Die hohe Kapazität zur Lipidakkumulation lässt sich auf die Aktivität einer Citrat-Lyase zurückführen. Spezies ohne die entsprechende Enzymausstattung erreichen lediglich Maximalgehalte von 10 bis 15% (Ratledge 1994).

4.2.1 Test diverser komplexer Standard-Nährmedien

Zur Kultivierung von Pilzen werden häufig Medien mit komplexen Nährstoffquellen verwendet. Zunächst wurden daher diverse etablierte Standard-Nährmedien getestet. Tatsächlich wurden mit Hilfe des Ausgangsmediums (ME) für FVE-D die schlechtesten Ergebnisse erhalten. In anderen Medien wurden weitaus höhere Lipidausbeuten erzielt. In YPG-Medium bildete der Pilz zwar die meiste Biomasse, durch die hohen Lipidgehalte in MPG war jedoch die Lipidausbeute im letztgenannten Medium am höchsten (Abbildung 14). In diesem Medium wurden auch für alle interessanten Fettsäuren die besten Ausbeuten erzielt (Tabelle 96). Auffällig war insbesondere, dass die terminal ungesättigte Dodec-11-ensäure ausschließlich in diesem Medium in nennenswerten Mengen gebildet wurde. Daneben schwankten vor allem die relativen Anteile von Laurin- und Linolsäure in Abhängigkeit des Mediums. Einige Fettsäuren waren nur in bestimmten Medien nachweisbar. Dabei handelte es sich allerdings ausschließlich um Minorbestandteile ($\leq 0,1\%$). Auf Grundlage des MPG-Mediums wurden weitere Parameter für FVE-D getestet.

Die Wahl des Nährmediums beeinflusste auch die Lipidausbeute (Abbildung 15) und die Fettsäureverteilung (Tabelle 97) von MHY-FP. Auch in diesem Fall gab es einzelne Minorfettsäuren, die nur in bestimmten Medien gebildet wurden. Die quantitativen Schwankungen vieler weiterer Fettsäuren fielen von Medium zu Medium besonders deutlich aus. Davon war auch die Zielverbindung 17:1(9Z) betroffen, sodass das YD-Medium trotz vergleichsweise geringer Lipidausbeute am besten zur Gewinnung dieser Fettsäure geeignet war. Dieses Medium wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Kultivierung anderer *Mortierella*-Spezies eingesetzt (Shimizu *et al.* 1991). Die weiteren Kulturparameter wurden daher anhand dieses Mediums untersucht.

Die Ergebnisse für FVE-D waren nur schlecht reproduzierbar. Des Öfteren traten Ausreißer auf, sodass für 12:1(11) relative Anteile von < 0,1% aber auch von bis zu 15% ermittelt wurden. In diesen Fällen traten auch starke Abweichungen hinsichtlich der Lipidausbeute auf. Die Ursachen konnten trotz zahlreicher Experimente nicht geklärt werden. Um zumindest eine Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Parameter-Testreihen zu gewährleisten, wurden abhängige Hauptkulturen angelegt, indem Inokula aus einer homogenen Vorkulturmischung verwendet wurden. Die Ausbeuten wurden anschließend aus mindestens zwei unterschiedlichen Hauptkulturen ermittelt. Die Ergebnisse von MHY-FP schwankten dagegen weniger und waren reproduzierbar.

4.2.2 Kultivierungstemperatur

Bereits sehr früh wurde der Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Fettsäurezusammensetzung von Pilzen untersucht. Dabei wurde eine Erhöhung der Jodzahl und damit ein erhöhter Grad an Desaturierung mit Erniedrigung der Temperatur festgestellt (Pearson und Raper 1927). Trotz einiger konträrer Befunde gilt der beschriebene Effekt als generell anerkannt (Weete 1974; Wassef 1977; Tahoun *et al.* 1986; Stahl und Klug 1996; Pedneault *et al.* 2007). Daher wurde untersucht, wie sich verschiedene Temperaturen auf die Bildung der ungesättigten Zielverbindungen und das Wachstum der beiden Pilze auswirken.

Während für FVE-D bei 16 °C ein deutlich besseres Wachstum festgestellt wurde (Abbildung 16), war für MHY-FP im Vergleich zur Kultivierung bei 24 °C nahezu kein Unterschied festzustellen (Abbildung 17). FVE-D ist damit den psychrophilen Organismen zuzurechnen. Seine Anpassung an tiefere Temperaturen kommt auch durch den Trivialnamen „Winterrübling“ zum Ausdruck, der auf die Ausbildung der Fruchtkörper vor allem von Oktober bis April hinweist

(Breitenbach und Kränzlin 1991). Hinsichtlich der gebildeten Fettsäuren war für FVE-D bei 16 °C unter anderem eine verstärkte Bildung an kurzkettigen und ungesättigten Fettsäuren, darunter auch 12:1(11), zu beobachten. Dies könnte auf die erniedrigte Temperatur, möglicherweise aber auch auf die Myzelernte in einem anderen Wachstumsstadium zurückzuführen sein. Die Fettsäureverteilung von MHY-FP und damit auch die Bildung an 17:1(9Z) war dagegen nahezu unabhängig von der Temperatur. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Temperaturniedrigung vorrangig die Zusammensetzung der (polaren) Membranlipide beeinflusst wird, um die Membranfluidität zu gewährleisten. Wie Pedneault *et al.* zeigten, ist es speziesabhängig, ob auch das Fettsäureprofil der unpolaren Speicherlipide von der Temperatur moduliert wird (Pedneault *et al.* 2007).

4.2.3 Kultivierungsdauer

FVE-D baute den Großteil seiner Biomasse in den ersten sieben Kulturtagen auf, während der Lipidgehalt zeitverzögert anstieg. Dessen Maximalwert wurde am 21. Kulturtag mit 10 bis 11% der BTM nachgewiesen (Abbildung 18). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch eine große Menge der Kohlenstoffquelle (Glucose) ungenutzt, sodass durch Variation des C/N-Verhältnisses versucht wurde, einen unnötigen Materialeinsatz zu vermeiden (4.2.4.1). Viele Pilze können unter Umständen keine höheren Lipidgehalte als 10 bis 15% erreichen (4.2). Daher wurde in den folgenden Experimenten versucht, die Gesamtausbeute an 12:1(11) durch Steigerung der Biomasse bzw. Variation des Fettsäureprofils zu erhöhen, indem verschiedene Kohlenstoff- (4.2.4.2) und Stickstoffquellen (4.2.4.3) getestet wurden.

Die Bildung an Biomasse erfolgte bei MHY-FP ebenfalls binnen etwa einer Woche. Anders als bei FVE-D wurden die Lipide ebenso zügig gebildet. Nach zehn Kulturtagen war die Kohlenstoffquelle (Glucose) aufgebraucht (Abbildung 19). Eine leichte Abnahme der Biomasse und Lipide nach diesem Tag deutet auf eine beginnende Autolyse hin. Denkbar wäre eine nachträgliche Zugabe von Glucose, allerdings stieg der Lipidgehalt trotz vorhandener Kohlenstoffquelle nach dem vierten Tag nur noch geringfügig an. Zudem verhielt sich der relative Anteil von (9Z)-Heptadec-9-ensäure gegenläufig und betrug am zehnten Tag nur noch 0,6% der Gesamtfettsäuren. Deren maximale Ausbeute wurde für den vierten Kulturtag ermittelt. Anstelle einer nachträglichen Gabe von Glucose wurde daher versucht, die Biosynthese der 17:1(9Z) durch die Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren zu induzieren (4.2.5).

4.2.4 Variation von Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (*Flammulina velutipes*)

4.2.4.1 Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis

Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff im Nährmedium ist ein entscheidender Parameter bei der Kultivierung von Pilzen, aber auch anderen Mikroorganismen und ermöglicht die Steuerung bestimmter Stoffwechselprozesse. So wird bei Stickstoff-Überfluss die Bildung von Biomasse forciert und die Synthese von Speicherstoffen unterdrückt, während es bei höheren C/N-Verhältnissen tendenziell zu Lipid- und/oder Kohlenhydratakkumulation kommt. Dieser Effekt wird auch als „stickstoff-limitierte Kulturführung“ bezeichnet. Sobald der Stickstoff im Nährmedium zur Neige geht, kann keine Protein- bzw. Nukleinsäuresynthese mehr erfolgen und der Aufbau der Gesamtbiomasse stagniert. In der Folge kommt es zu anteiligen Verschiebungen der einzelnen Zell-Bestandteile, da Kohlenstoff weiterhin aufgenommen und in Form von Triglyceriden als Speicherlipide eingelagert werden kann. Sobald die Kohlenhydrate im Nährmedium verwertet sind, wird der Übergang dieses als *fattening* bzw. *lipogenic phase* bezeichneten metabolischen Zustandes in einen raschen Abbau der Lipide eingeleitet (Shaw 1966; Ratledge 1994). Um dies zu vermeiden, wurde während des Versuches der Glucose-Gehalt beobachtet und darauf geachtet, dass alle Kulturen bis zur Ernte mit ausreichend Kohlenhydraten versorgt waren. Dabei wurde mit sinkendem C/N-Verhältnis ein höherer Glucoseverbrauch beobachtet (Abbildung 20), der sich möglicherweise in Verbindung mit dem höheren Stickstoffverbrauch durch die verstärkte Bildung an Biomasse erklären lässt. Bei den Ansätzen mit dem niedrigsten C/N-Verhältnis war nach 21 Tagen kaum noch Glucose übrig, allerdings wiesen die Myzelien einen geringeren Lipidgehalt auf. Die Gesamtausbeute war dadurch bei höherem Pepton-Einsatz identisch zum ursprünglich verwendeten Medium mit mittlerem C/N-Verhältnis. Die Verwendung eines höheren C/N-Verhältnisses führt dagegen zur höheren Lipidakkumulation, doch die strengere Limitierung an Stickstoff resultierte in einer sehr geringen Bildung an Biomasse und damit einer geringen Gesamtausbeute. Das optimale C/N-Verhältnis variiert von Spezies zu Spezies sehr stark, was eine speziesabhängige Bestimmung erfordert (Wassef 1977; Ratledge 1994). Das optimale Verhältnis für FVE-D ließe sich möglicherweise noch exakter bestimmen, allerdings lieferte das mittlere C/N-Verhältnis von 35:1 gute Ergebnisse und wurde daher für die weiteren Versuche beibehalten. In der Literatur finden sich meist Optima im Bereich zwischen 30:1 und 50:1 (Ratledge 1994).

4.2.4.2 Kohlenstoffquelle

In der Literatur finden sich zum Teil widersprüchliche Angaben zum Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Lipidausbeute bzw. den Einfluss auf das Fettsäureprofil. Während Ratledge konstatierte, es ergäben sich für alle Kohlenhydrate aufgrund derselben Bilanzen nahezu dieselben Lipidausbeuten (Ratledge 1994), beschrieben Wassef und Weete speziesspezifische Unterschiede (Weete 1974; Wassef 1977). Daneben führte die Verwendung unterschiedlicher Zucker zu einer starken Beeinflussung der Fettsäureverteilung (Farag *et al.* 1983). Wie die Untersuchungen mit FVE-D zeigten, hatten die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen einen deutlichen Einfluss auf die Lipidausbeute, aber auch auf das Fettsäureprofil. Laut Literatur wandeln viele Pilze in absteigender Folge Glucose, Saccharose und Fructose am effizientesten in Lipide um (Weete 1974; Wassef 1977). Andere Studien beschreiben aber auch andere Substrate wie Maltose als gleichwertig mit Glucose (Naguib 1959; Chesters und Peberdy 1965). *Candida lipolytica* produzierte mit Glucose sogar die geringste Lipidmenge (Tahoun *et al.* 1986). Für FVE-D eigneten sich Glucose und Saccharose am besten zum Aufbau von Biomasse (ca. 3,1 g/L), was gleichzeitig zur Erzielung der höchsten Lipidausbeuten führte (Tabelle 99). Die Verwendung von Disacchariden bewirkte, mit Ausnahme von Saccharose, eine geringere Bildung von Biomasse. Dies ließe sich durch die Notwendigkeit einer Hydrolyse vor Resorption in die Pilzzelle erklären. Die Anomalie der Saccharose könnte durch spezifische Saccharose-Transport-Proteine erklärt werden, wie sie bereits im Ständerpilz *Ustilago maydis* nachgewiesen wurden (Wahl *et al.* 2010). Andererseits sind in Pilzen auch andere Transporter für Disaccharide bekannt (Reinders und Ward 2001). Die geringste Menge an Biomasse wurde mit Maltose gebildet. Allerdings führte dieses Kohlenhydrat zum höchsten relativen Lipidgehalt und durch den beachtlichen Anteil der Dodec-11-ensäure am Fettsäureprofil (5,2%) wurde mit Maltose sogar deren höchste Ausbeute erzielt.

4.2.4.3 Stickstoffquelle

Aminosäuren spielen nicht nur als Stickstofflieferanten und damit für den Aufbau von Biomasse eine Rolle, sondern können auch als Präkursoren bestimmter Fettsäuren dienen und damit quantitative Verschiebungen von Fettsäureprofilen verursachen (4.2.5). Daher wurden zur Kultivierung von FVE-D acht verschiedene Peptone und zwei Proteine getestet.

Wie erwartet führte die Verwendung von Proteinen zu einer verringerten Bildung an Biomasse (Tabelle 101), da diese vor der Resorption durch den Pilz stärker hydrolysiert werden müssen,

als die bereits in kleineren Peptidfragmenten vorliegenden Peptone. Auch bei Einsatz von Fleisch- und Gelatinepepton war das Wachstum von FVE-D eingeschränkt. Möglicherweise war dies auf größere oder für FVE-D schlechter hydrolysierbare Peptide zurückzuführen. Da sich Ständerpilze zum Teil erheblich in ihrer extrazellulären Peptidase-Spezifität bzw. -Aktivität unterscheiden (Grimrath *et al.* 2011), ist die Verwertung unterschiedlicher Peptide stark von der jeweiligen Spezies abhängig. Gleichzeitig war in den meisten Myzelien aus schlecht bewachsenen Medien eine stärkere Lipidakkumulation zu beobachten. Entweder kam die verminderte Bioverfügbarkeit an Stickstoff einer Erhöhung des C/N-Verhältnisses (4.2.4.1) gleich, oder es lag durch die identischen Einwaagen der Stickstoffkomponenten (2.4.4.2) mit variierender Zusammensetzung tatsächlich eine Verschiebung des C/N-Verhältnisses vor. Zur Klärung müsste eine Elementaranalyse sämtlicher genutzter Peptone und Proteine durchgeführt werden. Besonders hoch (13%) war der Lipidgehalt bei Verwendung von Fleischpepton, was trotz der geringen Menge an Biomasse zur maximalen Lipidausbeute (265 mg/L) führte. Abgesehen von dieser Ausnahme wurde jedoch im Hinblick auf die restlichen, bislang nicht näher besprochenen Medien der Effekt beobachtet, dass eine verstärkte Biomasseproduktion tendenziell mit höheren Lipidausbeuten einherging (Tabelle 101). Hohe Lipidmengen konnten daneben mit Soja- und Lactalbuminpepton erzielt werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten gestaltet sich an dieser Stelle schwierig, da bisher keine verschiedenen Peptone untereinander, sondern nur unterschiedliche organische und anorganische Stickstoffquellen (darunter einzelne Aminosäuren, vor allem aber Harnstoff, Ammonium und Nitrat) verglichen wurden (Bhatia *et al.* 1972; Farag *et al.* 1983; Kahlos 1994; Tang *et al.* 2014).

Die diversen Stickstoffquellen verursachten allerdings nicht nur Unterschiede im Hinblick auf die Lipidausbeute, sondern auch Verschiebungen des Fettsäureprofils. Im Falle der Dodec-11-ensäure wurden Schwankungen zwischen < 0,1 und 3% beobachtet, was zu deutlichen Variationen in deren insgesamt gebildeten Mengen führte (Tabelle 102). Die Verwendung von Sojaprotein, Fleisch-, Gelatine- und Sojapepton resultierte in den höchsten Ausbeuten an 12:1(11). Anders als im nachfolgend geschilderten Fall der ungeradzahlig Fettsäuren (4.2.5), ist in der Literatur keine relevante Wirkung bestimmter Aminosäuren als Präkursoren oder Induktoren von Stoffwechselwegen bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei den genannten Stickstoffquellen auch um Substrate, die besonders arm an Vorläuferverbindungen ungeradzahli-ger Fettsäuren sind. Eine Beeinflussung des Fettsäureprofils durch Aminosäuren wurde bereits durch andere Gruppen festgestellt (Kahlos 1994; Tang *et al.* 2014).

4.2.5 Supplementation mit Präkursoren ungeradzahliger Fettsäuren

(*Mortierella hyalina*)

In der Literatur sind die Aminosäuren L-Isoleucin, L-Methionin, L-Threonin und L-Valin als Präkursoren von Propionyl-CoA beschrieben, welches wiederum in den anabolen Fettsäuremetabolismus zur Biosynthese von Fettsäuren mit ungeradzahligen Kohlenstoffkettenlängen eingehen kann (Berg *et al.* 2018). Durch die Supplementation des Nährmediums mit diesen Aminosäuren wurde daher versucht, die Ausbeute der Zielverbindung (9Z)-Heptadec-9-ensäure zu erhöhen. Der Einsatz von L-Methionin und L-Threonin zeigte keinen positiven Effekt. Zur Verwertung dieser Nährstoffe scheinen demnach andere Stoffwechselwege präferiert zu werden. So wäre die Einspeisung von L-Threonin alternativ über Pyruvat möglich (Berg *et al.* 2018). Dagegen gelang bei Verwendung von L-Isoleucin und L-Valin eine Erhöhung des Anteils von 17:1(9Z), wobei im Falle von L-Isoleucin eine Steigerung auf das Vierfache erzielt wurde (Abbildung 22). Für den Pilz *Conidiobolus heterosporus* wurde bereits ein ähnlicher Ansatz verfolgt. Eine Supplementation mit L-Valin führte zu einer erhöhten Ausbeute an 12-Methyltridecansäure (Fraatz *et al.* 2018). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Propionyl-CoA auch als Vorläuferverbindung methylverzweigter Fettsäuren dient (Kaneda 1971, 1991). Trotz der doppelten Supplement-Menge war der für 12-Methyltridecansäure beobachtete Effekt mit einer Steigerung um 38% jedoch weniger stark ausgeprägt (Fraatz *et al.* 2018).

Neben der Wirkung als Präkursoren einzelner Fettsäure(gruppe)n finden sich in der Literatur widersprüchliche Hinweise in Bezug auf die Rolle supplementierter Aminosäuren als Wachstums promotoren bzw. -inhibitoren (Kaneda 1971; Kahlos 1994). Im vorliegenden Fall unterschieden sich die Menge an gebildeter Biomasse, Lipidgehalt und -ausbeute in den meisten Fällen zwar signifikant vom nicht supplementierten Medium (Tabelle 103), jedoch waren diese Unterschiede aufgrund der sehr geringen Abweichungen nicht von praktischer Relevanz.

4.2.6 Optimierte Kulturführung für *Flammulina velutipes* und *Mortierella hyalina* im Hinblick auf die Produktion relevanter Fettsäuren

Für eine möglichst hohe Ausbeute an Dodec-11-ensäure sollte FVE-D bei 16 °C in MPC-Medium kultiviert werden, wobei sich Maltose als Kohlenstoff- und Fleischpepton als Stickstoffquelle anbieten. Im Rahmen der final durchgeführten Kultivierung unter Anwendung der

jeweils optimalen Parameter³ zur Feststellung des besten Erntezeitpunktes wurden jedoch keine höheren Ausbeuten an 12:1(11) als in den vorherigen Testreihen erhalten (Daten nicht dargestellt). Während der Testreihen wurde keine Steigerung des Lipidgehaltes über 14% erzielt, was auf ein Erreichen des von Ratledge prognostizierten Höchstgehaltes (10–15%) einiger Pilze hindeutet (Ratledge 1994). Aufgrund der schlecht reproduzierbaren Ergebnisse erscheint die Angabe einer Maximalausbeute für 12:1(11) nicht sinnvoll, jedoch lassen sich Quantitäten im Bereich von etwa 10 bis 20 mg pro Liter Hauptkultur gewinnen.

Die Ergebnisse von MHY-FP waren dagegen besser reproduzierbar. Zum Erreichen einer möglichst hohen Ausbeute an (9Z)-Heptadec-9-ensäure empfiehlt sich eine Kultivierung bei 24 °C in YD-Medium, welches im Falle der Hauptkultur mit 1 g/L L-Isoleucin supplementiert sein sollte. Die Temperatur hatte kaum Einfluss auf die Ergebnisse, was auch eine Inkubation bei Raumtemperatur möglich erscheinen lässt. Indem die Vorkultur drei, die Hauptkultur vier Tage kultiviert wurde, konnten Ausbeuten von 70 mg 17:1(9Z) pro Liter Hauptkultur erzielt werden.

³ Aufgrund geringer Kapazitäten war eine Kultivierung bei 16 °C nicht möglich und erfolgte stattdessen bei 24 °C.

4.3 Gaschromatographische Quantifizierung von Dodec-11-ensäure mittels externer Kalibrierung

Zur Angabe der Ausbeute bestimmter Fettsäuren wurden deren relative Anteile am Fettsäureprofil mit der jeweiligen Ausbeute an BTM und dem entsprechenden Lipidgehalt verrechnet (3.1 bzw. 3.2). Daraus ergibt sich zwangsläufig nur eine Abschätzung, da über die Lipidextraktion mittels Soxtherm®-Apparatur unter Verwendung unpolarer Lösungsmittel wie *n*-Hexan (2.6.1) die Gesamtheit aller neutralen Lipide erfasst wird. Demnach können neben Triglyceriden auch Fettbegleitstoffe wie Sterole enthalten sein. Diese, sowie das bei der Berechnung ebenfalls vernachlässigte Glycerol, verfälschen also bei der erläuterten Kalkulationsweise das Ergebnis.

Um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde Dodec-11-ensäure als die interessanteste gefundene Verbindung zusätzlich mittels externer Kalibrierung quantifiziert (2.6.4). Die Quantifizierung über die herkömmliche Methode lieferte für zwei unterschiedliche Proben Ausbeuten von 10,4 bzw. 11,4 mg 12:1(11) pro Liter Hauptkulturmedium. Mittels externer Kalibrierung wurden 10,7 sowie 11,7 mg/L bestimmt (3.3). Der Unterschied zwischen den verschiedenen Methoden entspricht damit einem vernachlässigbaren relativen Fehler von < 2,5%. Die Approximation der Ausbeuten liefert demnach verlässliche Werte. Dies war zu erwarten, da es sich bei den untersuchten Lipiden vornehmlich um Speicherlipide handelt, die literaturgemäß primär aus Di- und Triglyceriden bestehen (Lösel und Sancholle 1996). Zwar könnten sich andere Spezies in der Zusammensetzung ihrer neutralen Lipide unterscheiden, doch sind Abweichungen nur innerhalb derselben Größenordnung zu erwarten (beispielsweise Ergosterolgehalt (Seitz *et al.* 1979; Niemenmaa *et al.* 2008)), sodass die berechneten Fettsäureausbeuten nicht grundlegend beeinflusst werden.

4.4 Supplementationsstudien zur Aufklärung der Biosynthese von Dodec-11-ensäure (ω 1) durch *Flammulina velutipes*

Aufgrund der Seltenheit von ω 1-ungesättigter Fettsäuren in der Natur (4.1.3) stellte sich die Frage nach deren Biogenese durch FVE-D. Hinweise darauf lieferten Supplementationsstudien (3.4).

Der Abbau der Flocken auf dem Kulturmedium sowie die Erhöhung des relativen Anteils von 12:0 im Vergleich zum biologischen Blindwert deutete auf eine Aufnahme der Fettsäure durch den Pilz hin. Ein starkes Indiz für den tatsächlichen Einbau in die fungalen Triglyceride lieferte die Anwendung der alkali-katalysierten Transmethylierung zur FAME-Bildung, da bei dieser Methode lediglich veresterte Fettsäuren methyliert werden. Dagegen führte die Supplementationsstudie zu keiner verstärkten Bildung von Dodec-11-ensäure. Zur Überprüfung, ob ein Teil der gebildeten 12:1(11) als freie Fettsäure vorlag, wurde neben der alkali-katalysierten Transmethylierung auch die Veresterung mittels Bortrifluorid angewandt, mit der auch freie Fettsäuren methylverestert und damit erfasst werden können. Die anschließende gaschromatographische Analyse zeigte aber für Dodec-11-ensäure stets dieselben relativen Anteile.

Das massenspektrometrische Zerfallsmuster des detektierten Dodec-11-ensäuremethylesters wies im Vergleich zur nicht supplementierten Kultur für mehrere Signale eine deutliche Massenverschiebung von $m/z +1$ auf, wohingegen andere Signale kaum in ihren Intensitäten beeinflusst wurden (Abbildung 54). Dies zeigt, dass nur die zuerst genannten Massenfragmente das ^{13}C -markierte C_1 -Atom enthielten. Die intensivsten Signale stammen vermutlich aus McLafferty-Reaktion (blau, schwarz gestreift) und γ -Spaltung (dunkelblau, weiß rautenförmig). Diese charakteristischen Massenverschiebungen waren in allen supplementierten Proben zu beobachten, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Daraus konnte gefolgert werden, dass die Spuren an gebildeter Dodec-11-ensäure in Ansatz 1 zu ca. 85% aus ^{13}C -markierter Fettsäure bestanden. Beim „Fed-Batch“-Design des Ansatzes 3 waren dagegen nur etwa 20% ^{13}C -markiert, jedoch bildete der Pilz in diesem Fall insgesamt eine größere Menge. Demnach handelt es sich bei Laurinsäure eindeutig um die Vorläuferverbindung, die terminal desaturiert wurde. Allerdings drosselte die Supplementationsstudie die Umwandlung der supplementierten wie auch der endogen gebildeten Laurinsäure in Abhängigkeit des „Feeding Designs“ unterschiedlich stark.

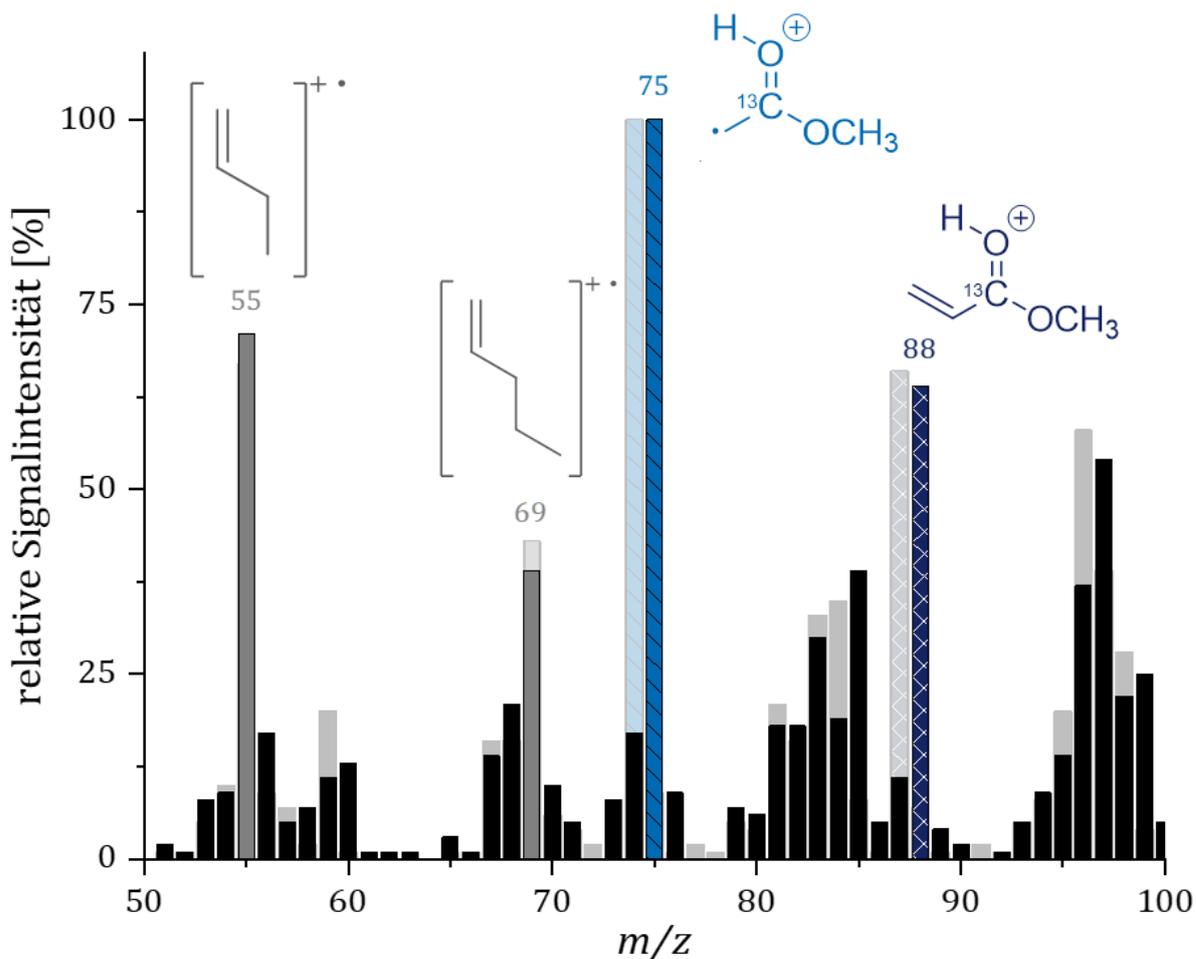


Abbildung 54: Relevanter Ausschnitt des massenspektrometrischen Fragmentierungsmusters (EI-MS, 70 eV) des Dodec-11-ensäuremethylesters aus der GC-Analyse des Lipidextraktes einer nicht supplementierten (transparent im Hintergrund) bzw. einer mit Laurinsäure-1-¹³C supplementierten (im Vordergrund) Kultur von FVE-D. Die Strukturen der vermuteten Fragment-Ionen sind oberhalb der zugehörigen Signale dargestellt.

Überraschenderweise ist zur terminalen Desaturierung von Fettsäuren wenig bekannt. Theoretisch könnten sie als Intermediate während der Decarboxylase-Reaktion von Dicarbonsäuren auftreten (Kourist *et al.* 2018). Im vorliegenden Fall scheint jedoch ein anderer Syntheseweg verantwortlich zu sein, da 12:0 sonst nicht als Präkursor fungieren würde. Tatsächlich konnte eine endständige Desaturierung von Laurinsäure mittels CYP4B1 gezeigt werden (Guan *et al.* 1998). In diesem Zusammenhang erscheint bemerkenswert, dass die aktiven Zentren von Decarboxylasen und Enzymen der Cytochrom P450-Familie Homologien aufweisen (Kourist *et al.* 2018). Schultz und Lynen isolierten dagegen eine $\Delta 9$ -Desaturase aus *S. cerevisiae*, die Decanoyl-CoA in Dec-9-enoyl-CoA umwandelte. Den Autoren zufolge stellt die Hefe

allerdings nur Palmitoyl- und Stearoyl-CoA zur Verfügung, während der C₁₀-Baustein ausschließlich als ACP-Intermediat vorliegt. Diesem Umstand scheint es geschuldet, dass die ω 1-ungesättigte Dec-9-ensäure nicht als natürliches Produkt in *S. cerevisiae* nachweisbar ist (Schultz und Lynen 1971). Anderen Arbeiten zufolge wurde Dodec-11-ensäure als Nebenprodukt einer rekombinanten Δ 11-Desaturase aus dem Falter *Agrotis segetum* gebildet (Hagström *et al.* 2013). Daneben wurde in einem anderen Falter eine anormale Δ 11-Desaturase mit einer terminalen Desaturase-Aktivität gegenüber (11Z,14Z,17Z)-Eicosa-11,14,17-trienoyl-CoA nachgewiesen (Ding *et al.* 2011). Wenn auch Beweise auf genomischer Ebene bzw. Expressionslevel ausstehen, so sprechen doch mehrere Indizien dafür, dass in FVE-D eine Δ 11-Desaturase für die Bildung von Dodec-11-ensäure und anderen Δ 11-ungesättigten Minor-Fettsäuren verantwortlich ist.

4.5 Transformation, Enzymexpression und -reinigung

4.5.1 Transformationen und genetische Modifikationen

Das Agarosegel der Kolonie-PCR (Abbildung 29) zeigte, dass die Transformation von *E. coli* mit dem pET28a-*Csα*-DOX-Plasmid erfolgreich war. Auch das Gel mit den PCR-Amplifikaten des *QuikChange*TM-Ansatzes (Abbildung 30) deutete auf eine erfolgreiche Modifikation und Vielfältigung hin, da Banden im erwarteten Bereich von 8000–10.000 bp erkennbar waren. Den Beweis der Genmodifikation lieferte die Sequenzierung der aus *E. coli* isolierten Plasmide (3.5.1.3). Anhand des Vergleichs der über den T7-Terminator-*Primer* erhaltenen Sequenz mit dem Mutterplasmid war ersichtlich, dass die Deletion des Stop-Codons erfolgreich war (Abbildung 55). So stand ein Konstrukt zur Verfügung, das einen C-terminalen His-Tag kodiert. Dessen ordnungsgemäße Expression wurde abschließend mittels anti-His HRP *Western Blot* überprüft (Abbildung 32).

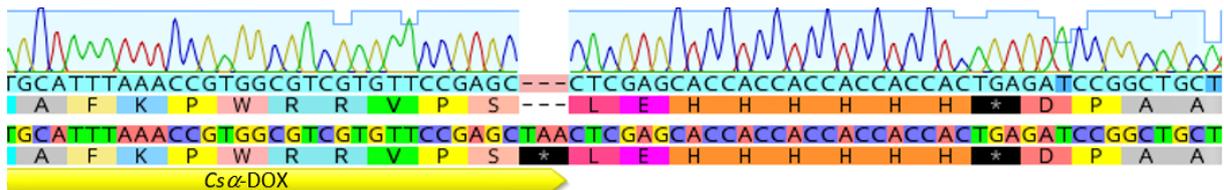


Abbildung 55: Vergleich der Ausschnitte der DNA- und entsprechenden Aminosäuresequenzen des pET28a-*Csα*-DOX-Mutterplasmids (unten) und des sequenzierten pET28a-*Csα*-DOX_C-His-Plasmids (mittig). Weiße Stern-Symbole auf schwarzem Hintergrund symbolisieren Stop-Codons.

4.5.2 Enzymexpression und -reinigung

Die SDS-PAGEs (Abbildung 31, 34 und 35) sowie, im Falle der *Csα*-DOX, der *Western Blot* (Abbildung 32) deuteten durch im Vergleich zu den jeweiligen Blindwerten deutlich verdickte Banden im erwarteten Bereich bei 70 kDa (*Os*- bzw. *Csα*-DOX) bzw. 130 kDa (*MmCAR*) auf eine erfolgreiche Expression der drei Enzyme hin. Mittels SDS-PAGE war zudem die Reinigung aller drei Enzyme zur elektrophoretischen Homogenität überprüfbar, wie sie beispielsweise bereits in vorherigen Studien für *MmCAR* erzielt wurde (Akhtar *et al.* 2013). Die beiden *α*-DOX enthielten noch leichte Verunreinigungen an Fremdprotein, bei denen es sich beispielsweise um histidinreiche *E. coli*-eigene Proteine handeln könnte. Bereits während der Reinigung war eine intensiv rote Färbung der *α*-DOX-Ansätze zu beobachten, die sich auf die enthaltene Häm-Gruppe zurückführen lässt (Liu *et al.* 2004). Die beiden Methoden zur Ermittlung der Enzymkonzentration ergaben stets ähnliche Werte.

Die Funktionstests der gereinigten Enzyme zeigten, dass die α -DOX die Standardfettsäuren wie erwartet in die C₁-verkürzten Aldehyde umwandelten. Die Enzyme katalysieren einen Angriff von molekularem Sauerstoff am C₂-Atom, was zur intermediären Bildung von 2-Hydroperoxy-Fettsäuren führt. Spontan erfolgt die Decarboxylierung zum Aldehyd. Die Reaktion benötigt ansonsten keine weiteren Co-Faktoren (Hamberg *et al.* 2005).

Im Gegensatz dazu sind CAR-katalysierte Reaktionen ATP- und NADPH-abhängig (Napura-Wijata *et al.* 2014). Zusätzlich haben Mg²⁺-Ionen einen positiven Effekt auf die Katalyse (Winkler und Winkler 2016). Mechanistisch handelt es sich um eine direkte Reduktion der Carbonsäuregruppe zum Aldehyd, was neben den Co-Faktoren eine posttranslationale Phosphopantetheinylierung der CAR erfordert (He *et al.* 2004; Venkitasubramanian *et al.* 2007). Das zur Expression genutzte Konstrukt kodierte daher nicht nur für die CAR, sondern auch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (2.1.2.1). Wie der Funktionstest (Abbildung 36) der gereinigten *MmCAR* verdeutlichte, müsste Letztere als aktives Holoenzym vorgelegen haben.

4.6 Biotransformation fungaler Lipide mittels Lipase und α -Dioxygenase oder Carbonsäure-Reduktase

4.6.1 Methodenentwicklung: Festphasen-Mikroextraktion von Fettaldehyden

Zur optimalen Extraktion der biotransformierten Reaktionsprodukte der Pilzlipide wurde zunächst eine Festphasen-Mikroextraktions-Methode etabliert (2.8.1).

Das beste Extraktionsverhalten der getesteten Faserbeschichtungen wiesen das PDMS/DVB- und das DVB/CAR/PDMS-Material auf (Abbildung 37). Nachdem die erstgenannte Faser die mittel- bis langkettigen Aldehyde besser extrahierte und die Zielanalyten in erster Linie jene Fettaldehyde darstellen, wurde diese Faser für die weitere Methodenoptimierung ausgewählt. Für die Optimierung hatte die Wahl der Faserbeschichtung den größten Einfluss. Die Anpassung der Extraktionstemperatur hatte vor allem eine verbesserte Extraktion der langkettigen und damit schwerer flüchtigen Aldehyde zur Folge. Im Vergleich zur schlechtesten Extraktion wurde die Sensitivität je nach Analyt um das 7- bis 75-fache (Tridecanal bzw. (6Z)-Non-6-enal) gesteigert. Zur Steigerung der Sensitivität gegenüber Aldehyden wird eine SPME-Extraktion üblicherweise mit einer automatisierten Derivatisierung mit O-substituierten, fluorierten Hydroxylaminen oder Hydrazinen gekoppelt (Wang *et al.* 2005; Saison *et al.* 2008). Wegen der dadurch verloren gehenden olfaktorischen Detektionsmöglichkeit wurde jedoch von einer Derivatisierung abgesehen.

Bei Verwendung von Emulgatoren in den Reaktionsmischungen wurde eine massive Einschränkung des Extraktionsvermögens festgestellt. Vermutlich wurden die unpolaren Aldehyde durch die Emulgatoren in Mizellen eingeschlossen und konnten durch diese Verkapselung nicht in den Dampfraum über der Probe gelangen. Die Analyten waren somit nicht extrahierbar. Für die Analyse der transformierten fungalen Lipidextrakte wurde demnach auf den Einsatz von Emulgatoren verzichtet (2.8.2).

4.6.2 Biotransformation fungaler Lipide

In den untersuchten Proben ließen sich Aldehyde wie Un-, Do-, Tri-, Tetra- und Pentadecanal olfaktorisch am ODP detektieren und massenspektrometrisch identifizieren (Tabelle 104 bis 107). Diese Fettaldehyde ließen sich auf die Umsetzung der in den fungalen Lipid-Extrakten enthaltenen Fettsäuren zurückführen (Abbildung 56). Dass einzelne Verbindungen wie Tri- (α -DOX) und Tetradecanal (CAR), die sich von derselben Fettsäure (Myristinsäure) ableiten,

olfaktorisch nicht sowohl im α -DOX- als auch im CAR-Ansatz detektierbar waren, könnte an unterschiedlichen Geruchsschwellen der Verbindungen liegen. Weiter könnten ungleiche Substratspezifitäten der beiden genannten Enzyme und damit variierende Mengen der gebildeten Aldehyde verantwortlich sein. So akzeptieren α -DOX eher mittel- bis langkettige Fettsäuren (Stumpf 1956; Galliard und Matthew 1976; Hamberg *et al.* 2005), wohingegen für CAR eine tendenziell gegenteilige Substrat-Präferenz dokumentiert ist (Duan *et al.* 2015b; Finnigan *et al.* 2017).

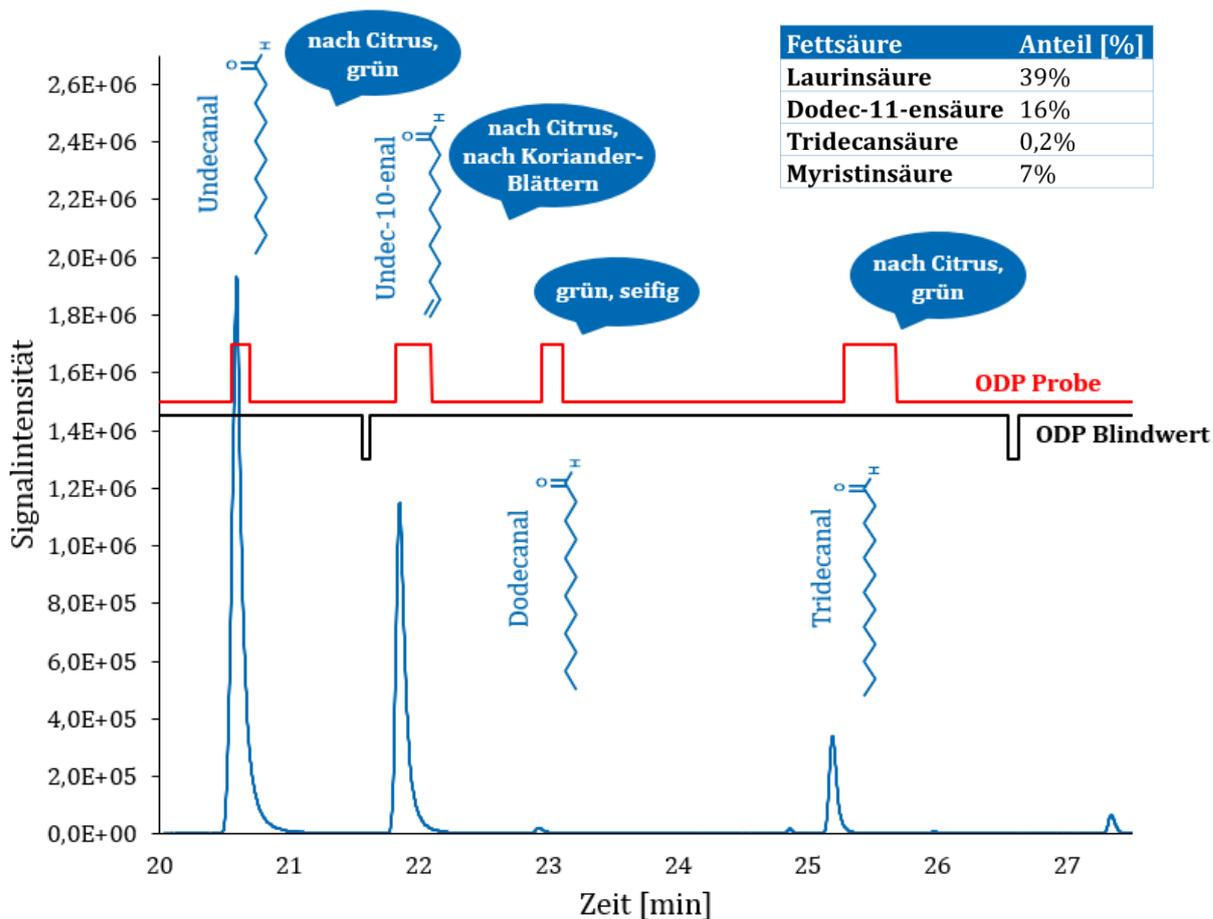


Abbildung 56: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Analyse des via $Os\alpha$ -DOX biotransformierten Lipid-Extraktes von FVE-D mittels GC-MS-O. Die Tabelle zeigt auszugsweise die relative Fettsäureverteilung der umgesetzten Lipide. Neben den ODP-Spuren sind auch die identifizierten Strukturen und zugehörigen Geruchsattribute dargestellt.

Von besonderem Interesse waren die Umsetzungsprodukte der selten vorkommenden 12:1(11) aus FVE-D sowie der 17:1(9Z) aus MHY-FP. In letzterem Fall wurde lediglich das vermutete α -DOX-Produkt (8Z)-Hexadec-8-enal mit äußerst schwacher Intensität und der wenig attraktiven Geruchsqualität „grün (unangenehm)“ am ODP wahrgenommen (Tabelle 106). Ursächlich ist vermutlich die bereits erwähnte Präferenz der CAR für kurzkettigere Substrate,

sodass nur wenig (9Z)-Heptadec-9-enal gebildet wurde und diese Menge offenbar unterhalb der Reizschwelle lag. In der Literatur ist für die gesättigten Homologe mit steigender Kohlenstoffkettenlänge ein starker Anstieg der Geruchsschwellen in Luft zu finden (Inagaki *et al.* 2016). Dies dürfte auf die ungesättigten Analoga übertragbar sein. Im Gegensatz dazu waren die beiden Umsetzungsprodukte der Dodec-11-ensäure deutlich wahrnehmbar. Mittels α -DOX (Abbildung 56) ließ sich das um ein Kohlenstoff-Atom verkürzte Undec-10-enal („citrusartig, dumpf, grün, nach Koriander-Blättern, schwer“), per CAR das unverkürzte Dodec-11-enal („citrusartig, etwas grün, nach Koriander-Blättern, seifig“) generieren.

Nachdem sie ansprechende Duftnoten aufwiesen und ihre Eigenschaften als Aromastoffe bislang nur fragmentarisch in der einschlägigen Literatur dokumentiert sind, wurden die ω 1-ungesättigten Aldehyde einer näheren Untersuchung unterzogen (2.10). Dabei entpuppte sich das bereits erwähnte Dodec-11-enal als besonders interessant, da es sich durch ein ausgewogenes Geruchsprofil ohne störende Fehlgerüche auszeichnete und bislang nicht als Aromastoff beschrieben wurde (4.8). Aus diesem Grund wurde auch die enzymatische Generierung dieser Substanz aus den Lipiden von FVE-D unter definierten Bedingungen näher betrachtet. Dies erfolgte mit der *MmCAR* aus *Mycobacterium marinum*, da sich das Enzym besonders gut zur Umsetzung von Laurinsäure eignete (Akhtar *et al.* 2013) und dessen Optima (30 °C bei pH 7,5) bekannt sind (Kramer *et al.* 2018). Die mit 12:1(11) aufgenommenen enzymkinetischen Parameter (Tabelle A 15 (Anhang E)) zeigten große Ähnlichkeit mit den Literaturwerten für 12:0 (Akhtar *et al.* 2013). Anstelle des bisher verwendeten Phosphatpuffers wurde ein Tris-Puffer bevorzugt, da sich dieser mittlerweile als Referenzsystem für CAR-Transformationen etabliert hat. Von Horvat *et al.* (2019) wurde für andere CAR in Phosphatpuffer zudem eine herabgesetzte Aktivität festgestellt. Durch Vorversuche mit Palmin als Standard-Triglycerid-Mischung wurde sichergestellt, dass nach 4-stündiger Präinkubation mit Lipase etwa 80% der Triglyceride hydrolysiert waren (Daten nicht dargestellt). Nach weiterer 15-stündiger CAR-Transformation zeigte die Quantifizierung von Dodec-11-enal eine Ausbeute von $15,8 \pm 0,5\%$ (unabhängiges Duplikat) für den Gesamtprozess.

Zur Etablierung eines ökonomisch sinnvollen Prozesses bedarf es allerdings einer höheren Umsatzrate. Kunjapur und Kollegen untersuchten die Rolle des bei der CAR-Reaktion entstehenden Pyrophosphats als Inhibitor (Kunjapur *et al.* 2016). In mehreren Fällen führte der Einsatz von organischer Pyrophosphatase zu einer deutlichen Steigerung des Produkttiters (Kunjapur *et al.* 2016; Schwendenwein *et al.* 2016; Khusnutdinova *et al.* 2017; Horvat *et al.*

2019). Daneben werden aber auch das bei der Reaktion entstehende Adenosinmonophosphat (AMP) und NADP⁺ als Inhibitoren diskutiert (Finnigan *et al.* 2017). Eine weitere Herausforderung stellt der Bedarf an Cofaktoren dar. Um diesen zu decken, wird in der Regel auf eine Ganzzell-Katalyse mit Zell-eigenem Regenerierungssystem zurückgegriffen. Die Anwendung dieses Ansatzes wird im Falle der Aldehyd-Produktion mittels CAR jedoch durch den zellulären Enzym-Hintergrund erschwert, durch den die Produkte in Nebenreaktionen zu den korrespondierenden Alkoholen abreagieren (He *et al.* 2004; Schwendenwein *et al.* 2016; Fraatz *et al.* 2018). Während für die Produktion aromatischer Aldehyde durch Deletion mehrerer Gene, die für Aldoketo-Reduktasen bzw. Alkohol-Dehydrogenasen kodieren, ein spezieller *E. coli* RARE-Stamm mit reduzierter aromatischer Aldehyd-Reduktion etabliert wurde (Kunjapur *et al.* 2014), steht für die Darstellung aliphatischer Aldehyde kein entsprechender Stamm zur Verfügung. Um eine Überreduktion aliphatischer Aldehyde zu vermeiden, muss daher auf gereinigte, zellfreie Extrakte zurückgegriffen werden, die allerdings den Zusatz exogener Systeme zur Cofaktor-Regenerierung erfordern (Khusnutdinova *et al.* 2017; Strohmeier *et al.* 2019; Horvat *et al.* 2019). Durch den Einsatz von Pyrophosphatase und Systemen zur Cofaktor-Regenerierung wurden bereits Umsatzraten von 50 bis 95% erzielt (Khusnutdinova *et al.* 2017; Horvat *et al.* 2019), welche das Potential des hier dargestellten Ansatzes zur Produktion von Dodec-11-enal unterstreichen.

4.7 Charakterisierung einer neuartigen α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

Trotz Hinweisen auf das Vorkommen von α -DOX in anderen Lebewesen wie beispielsweise in Pilzen der Gattung *Cercospora* (Stoessl 1985) stammen alle bislang näher beschriebenen Vertreter originär aus Pflanzen (1.3.1). Aus institutsinternen Vorarbeiten (Hucke 2014; Goldmann 2018) in Kooperation mit dem DECHEMA-Forschungsinstitut (Frankfurt am Main) war ein Enzym mit entsprechender α -DOX-Aktivität aus dem Cyanobakterium *Crocospaera subtropica* (früher *Cyanothece* sp. ATCC 51142) bekannt, welches eine Sequenzidentität von 39% mit der *Os* α -DOX aus Reis teilte. Ein gezielter Abgleich zeigte sequenzielle Übereinstimmungen des bakteriellen Enzyms mit konservierten Regionen, die aus mehreren etablierten α -DOX-Enzymen bekannt sind. Insbesondere waren in dieser *Cs* α -DOX drei Aminosäuren (His-311, Tyr-379 und Arg-559) vorhanden, die für die Aktivität des Reis-Enzyms als unabdingbar gelten (Kozelak-Rosenblum *et al.* 2008). Das Enzym gilt als erste bakterielle und damit erste nicht pflanzliche α -DOX und wurde in der vorliegenden Arbeit umfassend charakterisiert.

4.7.1 Enzymstabilität, Salz-, pH- und Temperaturoptimum

Zur Evaluierung der Enzymstabilität und bei allen anderen Versuchen kam die anhand ihres His-Tags gereinigte Enzym-Variante zum Einsatz, die sich in ihrer Aktivität nicht von der Tag-losen Variante unterschied (3.7.1).

Der Thermofluor-Assay (3.7.2) wurde in erster Linie zum Screening hinsichtlich der Enzymstabilität genutzt. Durch ihre dynamische Struktur können His-Tags eine vorzeitige Denaturierung des untersuchten Enzyms initiieren, wodurch die Aussagekraft des Assays gemindert wird (Boivin *et al.* 2013). Daher wurden die abgeleiteten Ergebnisse zunächst zur Auswahl von Testbedingungen weiterer Experimente verwendet (Ermittlung der Enzym-Optima, 3.7.3). Letztere dienten wiederum der Verifizierung der Thermofluor-Ergebnisse. Aus beiden Versuchsreihen ergaben sich stets übereinstimmende Tendenzen. Allerdings ergaben sich häufig nicht für alle getesteten Substrate exakt übereinstimmende Optima (vgl. Abbildung 44 bis 46). Löslichkeitsunterschiede und die damit einhergehende Substrat-Verfügbarkeit mögen gerade im Hinblick auf die Temperatur (Abbildung 46) eine Rolle spielen. Im Mittel führte die Verwendung von 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) unter Zusatz von 50 mM NaCl bei einer Temperatur von 25 °C zu den höchsten Umsatzraten. Abgesehen von der hohen Ionenkonzentration

steht dies im Einklang mit Bedingungen, die typischerweise für Transformationen mit α -DOX verwendet werden (Galliard und Matthew 1976; Borge *et al.* 1997; Sanz *et al.* 1998; Hamberg *et al.* 1999; Saffert *et al.* 2000; Koeduka *et al.* 2002; Liu *et al.* 2006; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Kaehne *et al.* 2011a). Der Ursprung der $Cs\alpha$ -DOX aus dem marinen Cyanobakterium *C. subtropica* (Mareš *et al.* 2019) dürfte für das Alleinstellungsmerkmal der Präferenz hoher Salzkonzentrationen verantwortlich zeichnen.

Von besonderer Relevanz erschien zudem ein Test der Stabilität gegenüber DMSO, da dieses Lösungsmittel im Rahmen des Sauerstoff-Assays (2.9.4) zur Lösung der Fettsäuresubstrate benötigt wurde. Bei der dabei verwendeten Konzentration von 2,5% (v/v) war die $Cs\alpha$ -DOX stabil. Erst ab 5% (v/v) zeigte sich ein negativer Einfluss (Tabelle 108), der aber anhand weiterer Experimente zu verifizieren wäre. Demgegenüber wurde DMSO als Co-Solvens aber auch mit einem positiven Effekt auf die Performanz von Enzymen beschrieben (Zorn *et al.* 2003). Im Rahmen der Bestimmung der Enzym-Optima wurde daher zusätzlich der Einfluss von DMSO auf die Umsetzung untersucht. Dabei war allerdings kein nennenswerter Effekt zu beobachten (3.7.3).

Im Gegensatz dazu wurde die relative Enzymaktivität durch 1% (v/v) Triton-X 100 verdoppelt (Abbildung 47). Dieser, wie auch andere Emulgatoren, wurden bereits mehrfach für α -DOX katalysierte Biotransformationen eingesetzt (Akakabe *et al.* 1999; Koeduka *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004; Kaehne *et al.* 2011a). Nachdem Emulgatoren aber die Extraktion der Aldehyde aus dem Reaktionspuffer deutlich minderten (3.6.1.2), wurde Triton-X 100 ausschließlich zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter (2.9.4) genutzt.

4.7.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter

Um den Einfluss von Methylverzweigungen nahe des ω -Terminus von Substraten auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden enzymkinetische Parameter unter optimierten Reaktionsbedingungen (4.7.1) für Myristin- und 13-Methyltetradecansäure anhand des Sauerstoffverbrauchs bestimmt. Bislang wurde für andere α -DOX lediglich der Einfluss von Substratkettenlänge und Doppelbindungen (Anzahl und Position) untersucht (Hamberg *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Kaehne *et al.* 2011a).

Die ermittelten Werte von K_m und k_{cat} (Tabelle 109) waren vergleichbar mit den Literaturwerten anderer α -DOX-Vertreter (Galliard und Matthew 1976; Borge *et al.* 1997; Hamberg *et al.*

1999; Saffert *et al.* 2000; Liu *et al.* 2006; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Goulah *et al.* 2013). Der Vergleich der katalytischen Effizienzen der beiden Substrate zeigte deutlich, dass keine Substratpräferenz vorlag und die terminale Methylverzweigung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. Diese Ergebnisse stützen das gegenwärtige Modell zur Substratbindung: α -DOX besitzen einen Substratkanal, der zum aktiven Zentrum führt. Wechselwirkungen dieses Kanals mit den ersten 7 Kohlenstoffatomen des Substrats scheinen für die Katalyse von großer Bedeutung zu sein, da sich sterische Abweichungen in diesem Molekülbereich in drastisch verringerten Konversionsraten äußerten (Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Goulah *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2013). Dies erklärt unter anderem die geringe Akzeptanz ungesättigter Fettsäuren mit Doppelbindungen innerhalb der ersten 7 Kohlenstoffatome. Mit zunehmender Näherung der Doppelbindung an die Carbonsäuregruppe wurde eine Verstärkung dieses Effekts beobachtet (Liu *et al.* 2006; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008).

4.7.3 Substratspektrum

Das Enzym Cs α -DOX zeigte ein breites Substratspektrum (Abbildung 49). Linolsäure wurde von den gewählten Testsubstanzen am besten umgesetzt und gilt auch für andere α -DOX als eines der am meisten präferierten Substrate (Liu *et al.* 2006; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008). Hohe Aktivitäten sind auch gegenüber Myristinsäure beschrieben, wohingegen die gute Umsetzung von Laurinsäure ungewöhnlich ist. Darüber hinaus wurden noch kurzketzigere Substrate akzeptiert, worauf sich nur wenige Hinweise bezüglich anderer α -DOX in der Literatur finden (Stumpf 1956; Galliard und Matthew 1976; Saffert *et al.* 2000; Hamberg *et al.* 2005; Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Kaehne *et al.* 2011a; Maurer *et al.* 2019). Untypisch scheint die geringe Konversion von Palmitin- und Stearinsäure. Ursächlich könnte die schlechte Löslichkeit in der Reaktionsmischung durch das Fehlen eines Emulgators sein. Gut erkennbar ist die bereits in der Literatur beschriebene mangelhafte Akzeptanz von Substraten mit funktionellen Gruppen innerhalb der ersten 7 Kohlenstoffatome wie beispielsweise Doppelbindungen (vgl. auch 4.7.2) (Koszelak-Rosenblum *et al.* 2008; Goulah *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2013).

4.8 Sensorische Charakterisierung ω 1-ungesättigter sowie *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Aldehyde

Die Datenlage bezüglich der sensorischen Charakteristika ω 1-ungesättigter bzw. methylverzweigter Aldehyde ist trotz einzelner Studien (siehe unten) nach wie vor lückenhaft. Bestehende Untersuchungen beschränken sich zumeist auf einzelne Vertreter dieser Verbindungsklassen und liefern damit unvollständige Datensätze. Ursächlich mag das seltene Vorkommen in der Natur sein.

Von den terminal ungesättigten Aldehyden standen größere Quantitäten zur Untersuchung zur Verfügung, die eine umfassendere Charakterisierung ermöglichten. Dies schloss die Bestimmung der Geruchsschwellen in wässriger Lösung ein. Zur Einschätzung der Aussagekraft der erzielten Ergebnisse wurde anhand der *ORFs* (Tabelle 131) die olfaktorische Reinheit abgeschätzt. Die C_7 - bis C_{10} -Aldehyde waren sehr rein, sodass die ermittelten Geruchsprofile und Schwellenwerte in wässriger Lösung nicht von olfaktorisch-aktiven Verunreinigungen beeinflusst worden sein sollten. Dagegen scheint eine geringfügige Beeinflussung bei den C_{11} - bis C_{13} -Isomeren wegen ihrer niedrigeren *ORFs* möglich. Pentadec-14-enal war olfaktorisch nicht wahrnehmbar, was durch eine mangelhafte Bindung an das entsprechende Rezeptorprotein (inadequate Passform) erklärt werden könnte.

Die Untersuchung der methylverzweigten Aldehyde erfolgte aufgrund der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Probenmaterials primär gaschromatographisch-olfaktorisch. Zur differenzierteren Beschreibung spezieller Nuancen wurde zusätzlich auf die Reinsubstanzen zurückgegriffen, deren Geruchsattribute stark mit den am ODP wahrgenommenen Eindrücken überlappten. Auch dabei ließ sich allerdings eine Beeinflussung durch geruchsaktive Kontaminanten nicht vollends ausschließen. Aufgrund fehlender chiraler Analysen sind keine Angaben bezüglich potentieller Unterschiede zwischen den *anteiso*-Aldehyd-Enantiomeren möglich.

4.8.1 Geruchsqualitäten

Durch die systematische Untersuchung war erkennbar, dass sowohl alle ω 1-ungesättigten (Tabelle 132), als auch alle methylverzweigten Verbindungen (Tabelle 133) einen grünen Geruch aufwiesen, wie dies für viele Aldehyde typisch ist (Ranson *et al.* 1992; Rychlik *et al.* 1998; Lorber und Buettner 2015; Lorber *et al.* 2018).

Neben dem grün-grasigen Geruch besaß vor allem Hept-6-enal, in geringerem Maße auch Oct-7-enal, einen im Vordergrund stehenden Duft nach Gurke und Melone. Diese Noten waren zum Teil auch bei höheren Homologen vorhanden, traten jedoch deutlich hinter anderen Attributen zurück. In der Literatur finden sich viele Belege für Aldehyde, die diese Nuancen aufweisen. Meist handelt es sich dabei aber um C₉-, gelegentlich auch C₁₀-Komponenten wie (2*E*,6*Z*)-Nona-2,6-dienal (Ranson *et al.* 1992; Rychlik *et al.* 1998; Lorber und Buettner 2015; Lorber *et al.* 2018). Im Gegensatz dazu zeigte Non-8-enal einen unangenehm metallisch-medizinischen, pappkartonartigen Geruch. Daneben trat ein Geruch nach Koriander-Blättern auf, der mit steigender Kettenlänge angenehmer wurde. Vom C₁₀-Isomer an wurden darüber hinaus wächserne und krautige Nuancen wahrgenommen. Auch alle methylverzweigten Aldehyde wiesen einen seifigen Geruchseindruck nach Koriander-Blättern auf, der von einer süßlichen Note begleitet wurde. Süßliche sowie seifige Gerüche nach Koriander-Blättern sind für Aldehyde mehrfach in der Literatur beschrieben. Vereinzelt finden sich auch Nachweise für metallische Eindrücke (Ranson *et al.* 1992; Rychlik *et al.* 1998; Buettner und Schieberle 2001; Lorber und Buettner 2015; Lorber *et al.* 2018). Die methylverzweigten Vertreter bis zu einer Kettenlänge von C₁₄ besaßen zudem würzig-talgige, teils wasabiartige Noten, die kurzkettingeren auch citrusartige, holzige und krautige Nuancen, die mit steigender C-Anzahl ebenfalls ins Metallische, Wächserne, aber auch Pfeffrige wechselten. Für citrusartig riechende Aldehyde gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise (Ranson *et al.* 1992; Rychlik *et al.* 1998; Buettner und Schieberle 2001; Lorber und Buettner 2015; Lorber *et al.* 2018), daneben sind auch talgige Vertreter dokumentiert (Rychlik *et al.* 1998).

Das Vorkommen und zum geringeren Anteil auch die Geruchsqualitäten methylverzweigter sowie ω 1-ungesättigter Aldehyde sind vereinzelt in der einschlägigen Literatur nachweisbar. Mehrere Vertreter terminal ungesättigter Aldehyde wurden vor allem in Lorbeergewächsen (C₁₀–C₁₃) (Choudhury *et al.* 1997; Wang *et al.* 2008) sowie Koriander (C₁₀–C₁₄) (Padmakumari 2008; Potter und Fagerson 1990) nachgewiesen. Einzelne, zumeist etwas kurzkettingere Komponenten fanden sich in Frittierfett (C₆–C₈) (May *et al.* 1983), einem geräucherten thailändischen Dessert (C₈ frisch, nach Melone, C₉ schal, fettig, nach Plastik) (Watcharananun *et al.* 2009) und in Verpackungsmaterial aus Polyethylen (C₉ „Plastik-Fehlgeruch“) (Sanders *et al.* 2005). Nur wenige Autoren dokumentierten allerdings die entsprechenden Attribute, welche zumindest teilweise (C₅–C₁₀) ergänzend aus Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen hervor-

gehen (Ranson *et al.* 1992; Meijboom und Jongenotter 1981). Im Gegensatz dazu ist die Datenlage zu 12-Methyltridecanal, dem Schlüsselaromastoff von geschmortem Rindfleisch und dem damit wohl bekanntesten Vertreter der verzweigt-kettigen Fettaldehyde, als abschließend einzustufen (Guth und Grosch 1993, 1994; Kerscher *et al.* 2000; Christlbauer und Schieberle 2009). Andere Mitglieder dieser Verbindungsklasse sind jedoch sehr viel weniger erforscht. 10-Methylundecanal wies einen süßlichen Geruch nach Citrus(schale) auf (Saito *et al.* 2014). Werkhoff und Kollegen beschrieben das Vorkommen verzweigter C₁₃–C₁₅-Aldehyde in Rindfleisch und im Zuge dessen deren retro-nasale Geruchseindrücke, die in Abhängigkeit der Zusammensetzung der verwendeten wässrigen Lösung stark variierten (Werkhoff *et al.* 1993). *Iso*- (C₁₂–C₁₆) und *anteiso*- (C₁₁, C₁₃, C₁₅) Fettaldehyde wurden zudem in Gouda nachgewiesen, wo sie während der Reifung für die Entwicklung des charakteristischen Aromas verantwortlich zu sein scheinen (Inagaki *et al.* 2015, 2016). Dieselben Autoren diskutierten zudem einen Wechsel von citrusartigen zu rindfleischartigen Geruchsqualitäten, der mit dem Anstieg der Kettenlänge einherging.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die primären Geruchsqualitäten überwiegend bereits in der Literatur für andere Aldehyde dokumentiert sind. Die eher würzige, wasabiartige bis pfeffrige Wahrnehmung einiger methylverzweigter Vertreter scheint dagegen auf die Gruppe eben jener Fettaldehyde begrenzt zu sein. Attribute aus bereits bestehenden Untersuchungen zu einzelnen Verbindungen stimmen mit den hier dargestellten Ergebnissen gut überein. Die Gerüche vieler Komponenten wurden in dieser Arbeit erstmals bzw. derart detailliert charakterisiert.

4.8.2 Geruchsschwellen

Bezüglich der Geruchsschwellen von Aldehyden mit endständiger Doppelbindung liegen bereits zwei Studien vor, die sich jedoch lediglich mit einer Auswahl von Homologen beschäftigten (Meijboom und Jongenotter 1981; Ranson *et al.* 1992). Die Untersuchungen mittels GC-FID-O lieferten für die Aldehyde C₇ bis C₁₃ Schwellen im Bereich zwischen 0,039 und 29 ng/L Luft (Abbildung 50). Aufgrund einer abweichenden Methode und daraus resultierend anderen Einheiten sind die von Ranson und Kollegen bestimmten Schwellen in Luft (C₇–C₁₀) als absolute Werte mit den erzielten Ergebnissen nicht direkt vergleichbar. Bei Vergleich der Kurvenverläufe (Schwellenwerte in Abhängigkeit der Kettenlänge) lassen sich allerdings nahezu kongruente Formen erkennen, die in derselben Größenordnung liegen (Ranson *et al.* 1992).

Ebenfalls identisch stellte sich zudem der Verlauf der Schwellen der analogen Alkohole dar (2,2–629 ng/L Luft, Abbildung 50). In wässriger Lösung wurden für die Aldehyde Detektionsschwellen zwischen 0,24 und 22 µg/L bestimmt, wohingegen die Erkennungsschwellen bei 0,74 bis 24 µg/L lagen (Abbildung 51). Auch hier ergaben sich zu den bisher genannten Kurven sehr ähnliche Verläufe. Für die wässrige Matrix stehen bislang keinerlei Literaturdaten zur Verfügung, allerdings liegen sie in derselben Größenordnung wie die ihrer gesättigte Pendant (Schnabel *et al.* 1988).

Besonders auffällig, sowohl in Luft als auch in wässriger Lösung, erscheint das Durchlaufen eines deutlichen Schwellenwert-Minimums bei Non-8-enal, welches sich von den anderen Schwellen scharf abgegrenzt darstellt. Dies erscheint insoweit bemerkenswert, als dass diese Substanz bereits als Verursacher eines Fehlgeruchs identifiziert wurde (Sanders *et al.* 2005). Dieses Minimum wurde auch von Ranson und Kollegen in Luft festgestellt (Ranson *et al.* 1992), wohingegen es in Paraffin nicht zu erkennen war (Meijboom und Jongenotter 1981). Vermutlich spielen dabei Löslichkeitseffekte eine entscheidende Rolle. Interessanterweise ändern sich beim Durchlaufen des Minimums auch die Geruchsqualitäten (Abbildung A 1–A 7 (Anhang F)). Weiter sind die Schwellen für die C₇-, C₈-, C₁₀- und C₁₁-Aldehyde in Luft denjenigen ihrer (3Z)-Analoge sehr ähnlich. Dagegen war Non-8-enal deutlich mehr, Dodec-11-enal etwas weniger potent als ihr entsprechendes Alk-3-enal (Lorber *et al.* 2018).

Iso- und *anteiso*-Aldehyde weisen bekanntermaßen recht niedrige Schwellenwerte auf (Tajima *et al.* 1990; Widder *et al.* 2003). Dies gilt insbesondere für die C₁₃- und C₁₄-Isomere (Inagaki *et al.* 2016; Guth und Grosch 1993). Die ermittelten Werte (0,18–70 ng/L Luft, Abbildung 53) stimmen gut mit den Daten von Inagaki und Kollegen überein (Inagaki *et al.* 2016). Allerdings wurde im Vergleich zur Literatur ein etwa fünffach niedrigerer Schwellenwert für 11-Methyltridecanal ermittelt, was die Verbindung gemeinsam mit dem *iso*-Isomer zu den potentesten Substanzen dieser Verbindungsklasse macht.

5 Ausblick

Knapp 40 unterschiedliche Pilze wurden als Quellen seltener Fettsäuren untersucht, die als Präkursoren potentiell interessanter Aldehyde dienen könnten. Bei diesem Screening wurden mehrere vielversprechende Spezies identifiziert. Durch die Existenz von schätzungsweise 2 bis 4 Millionen Pilzspezies (Hawksworth und Lücking 2017) ergibt sich im Vergleich dazu allerdings ein schier unendlicher Pool weiterer Produktionsorganismen. Der Großteil der etwa 100.000 bekannten Pilze ist im Hinblick auf ihr Fettsäureprofil nach wie vor nicht untersucht und bildet damit eine Grundlage weiterer Forschung.

Die Untersuchungen zu Wachstum und Lipidakkumulation der beiden bereits näher charakterisierten Pilze *Flammulina velutipes* (Gewinnung von Dodec-11-ensäure) und *Mortierella hyalina* (Produktion von (9Z)-Heptadec-9-ensäure) könnten in weiteren Studien vertieft werden, indem beispielsweise die Aminosäureverteilung der verwendeten Stickstoffquellen analysiert würden oder der Einfluss weiterer Parameter ermittelt würde. Zur großtechnischen Herstellung der genannten Fettsäuren ist daneben die Etablierung der Kultivierung in Fermentern notwendig, um ein *Scale-up* des Prozesses zu ermöglichen.

Nachdem terminal ungesättigte Fettsäuren wie die nachgewiesene 12:1(11) in der Natur äußerst selten vorkommen, wäre die Identifizierung der an ihrer Biosynthese vermutlich beteiligten $\Delta 11$ -Desaturase von großem Interesse. Ein tiefergehendes Verständnis der biosynthetischen Stoffwechselwege könnte auch helfen, eine höhere Reproduzierbarkeit bei der Fettsäureproduktion zu gewährleisten. Ergänzend könnte ein Vorkommen der Dodec-11-ensäure in anderen Spezies der Gattung *Flammulina* überprüft werden.

Hinsichtlich der Biotransformationen wäre die Entwicklung von ökonomischeren Ganzzell-Fermentationen sinnvoll. Im Falle der α -DOX scheint eine solche Applikation ohne größere Schwierigkeiten umsetzbar (Maurer *et al.* 2019). Daneben bietet die Immobilisierung von Enzymen diverse Vorteile wie eine erhöhte Enzymstabilität. In ersten Studien erzielten Thompson und Kollegen für CARs, die selbige neben Enzymen zum Cofaktor-Recycling immobilisierten, vielversprechende Ergebnisse (Thompson *et al.* 2019). Zur Minimierung komplexer Reinigungsverfahren während des *Down-Stream-Processing* könnten außerdem gezielt Lipasen mit erhöhter Spezifität für die favorisierten Fettsäuren (z.B. über die Position im Triglycerid oder Kettenlänge) eingesetzt werden.

Die α -DOX aus *Crocospaera subtropica* wurde unter besonderer Berücksichtigung *iso*- und *anteiso*-methylverzweigter Fettsäure-Substrate umfangreich charakterisiert. Das Enzym zeichnete sich im Vergleich zu anderen α -DOX durch seinen nicht pflanzlichen Ursprung und die effektive Umsetzung kurzkettiger Substrate aus ($< C_{14}$). Um diese substratspezifische Eigenart auf molekularer Ebene verstehen und erklären zu können, wäre eine Röntgenkristallstruktur des Enzyms wünschenswert.

Im Zuge der sensorischen Evaluierung waren die primären Reaktionsprodukte der ω 8-unge-sättigten 17:1(9Z) olfaktorisch kaum oder gar nicht wahrnehmbar. Eine weitere Verkürzung der Kohlenstoffkette könnte zur Generierung potenterer Geruchsstoffe führen. Dies würde ein mehrstufiger, zyklischer Prozess erlauben, bei dem eine α -DOX mit einer Aldehyd-Dehydrogenase (AldDH) gekoppelt wird. Hierzu könnte beispielsweise die AldDH aus *Vibrio harveyi* dienen, die bereits erfolgreich in *E. coli* exprimiert wurde (Buchhaupt *et al.* 2013). Homologe Reihen anderer Aldehyde wurden in der vorliegenden Arbeit umfassend charakterisiert. Aufgrund geringer Quantitäten musste jedoch eine Bewertung der Geruchsschwellen der *iso*- und *anteiso*-methylverzweigten Aldehyde in wässriger Lösung offen bleiben. Eine solche wäre neben der Beschreibung der sensorischen Eigenschaften von Aldehyden mit anderen aliphatischen Verzweigungen wünschenswert, da die einschlägige Literatur dazu ebenfalls kaum Daten enthält. Einige der untersuchten methylverzweigten Aldehyde wären biotechnologisch aus den Lipiden von *Conidiobolus heterosporus* zugänglich. Hierfür kam bereits eine CAR zum Einsatz (Fraatz *et al.* 2018). Andererseits wäre die Verwendung einer α -DOX, gegebenenfalls in Verbindung mit einer AldDH möglich, um weitere Produkte zu erhalten.

6 Literaturverzeichnis

Abdelqader M. M., Hippen A. R., Kalscheur K. F., Schingoethe D. J., Garcia A. D.: Isolipidic additions of fat from corn germ, corn distillers grains, or corn oil in dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* **2009**, 92 (11), 5523–5533.

Akacha N. B., Gargouri M.: Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food Bioprod. Process.* **2015**, 94, 675–706.

Akakabe Y., Matsui K., Kajiwara T.: Enantioselective α -Hydroperoxylation of Long-Chain Fatty Acids with Crude Enzyme of Marine Green Alga *Ulva pertusa*. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1137–1140.

Akhtar M. K., Turner N. J., Jones P. R.: Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110 (1), 87–92.

Amano N., Shinmen Y., Akimoto K., Kawashima H., Amachi T.: Chemotaxonomic Significance of Fatty Acid Composition in the Genus *Mortierella* (Zygomycetes, *Mortierellaceae*). *Mycotaxon* **1992**, 44 (2), 257–266.

Andreou A., Feussner I.: Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **2009**, 70 (13-14), 1504–1510.

Anelli P. L., Biffi C., Montanari F., Quici S.: Fast and Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes or to Carboxylic Acids and of Secondary Alcohols to Ketones Mediated by Oxoammonium Salts under Two-Phase Conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2559–2562.

Bannenberg G., Martínez M., Rodríguez M. J., López M. A., Ponce de León I., Hamberg M., Castresana C.: Functional Analysis of α -DOX2, an Active α -Dioxygenase Critical for Normal Development in Tomato Plants. *Plant Physiol.* **2009**, 151 (3), 1421–1432.

Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira, I. C. F. R.: Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* **2008a**, 46, 2742–2747.

- Barros L., Venturini B. A., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira, I. C. F. R.: Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A Comprehensive Study. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, 56, 3856–3862.
- Becker H. G. O., Beckert R.: Organikum. 24. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH **2015**.
- Beluhan S., Ranogajec A.: Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chem.* **2011**, 124, 1076–1082.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Stryer L.: Stryer Biochemie. Berlin-Heidelberg: Springer **2018**.
- Berger R. G.: Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, 1, 38–43.
- Bhatia I. S., Raheja R. K., Chahal D. S.: Fungal Lipids. I. Effect of Different Nitrogen Sources on the Chemical Composition. *J. Sci. Food Agric.* **1972**, 23, 1197–1205.
- Boivin S., Kozak S., Meijers R.: Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expression Purif.* **2013**, 91 (2), 192–206.
- Borge G. I. A., Slinde E., Nilsson A.: Long-chain saturated fatty acids can be α -oxidised by a purified enzyme (M_r 240 000) in cucumber (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1344, 47–58.
- Bowden K., Heilbron I. M., Jones E. R. H., Weedon B. C. L.: Researches on Acetylenic Compounds. I. Preparation of Acetylenic Ketones by Oxidation of Acetylenic Carbinols and Glycols. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39–45.
- Bradford M. M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- Breitenbach J., Kränzlin F.: *Flammulina velutipes*. In: Breitenbach J., Kränzlin F. (Hg.): Pilze der Schweiz. Beitrag zur Kenntnis der Pilzflora der Schweiz. Röhrlinge und Blätterpilze 1. Teil, Bd. 3. 1. Aufl. Luzern (CH): Mykologia **1991**, S. 188 (Nr. 210).
- Brown H. C., Rao B. C. S.: A New Aldehyde Synthesis - The Reduction of Acid Chlorides by Lithium Tri-*t*-butoxyaluminumhydride. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80 (20), 5377–5380.

- Bruno L., Di Pippo F., Antonaroli S., Gismondi A., Valentini C., Albertano P.: Characterization of biofilm-forming cyanobacteria for biomass and lipid production. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 113 (5), 1052–1064.
- Buchhaupt M., Guder J., Sporleder F., Paetzold M., Schrader J.: Oxidation of fatty aldehydes to fatty acids by *Escherichia coli* cells expressing the *Vibrio harveyi* fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 29 (3), 569–575.
- Buchhaupt M., Guder J. C., Etschmann M. M. W., Schrader J.: Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93 (1), 159–168.
- Buettner A., Schieberle P.: Aroma Properties of a Homologous Series of 2,3-Epoxyalkanals and *trans*-4,5-Epoxyalk-2-enals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (8), 3881–3884.
- Burdock G. A., Fenaroli G.: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 6. Aufl. Boca Raton/FL (US): CRC **2010**.
- Butler N., Kunjapur A. M.: Carboxylic acid reductases in metabolic engineering. *J. Biotechnol.* **2020**, 307, 1–14.
- BVL: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 38 TabakerzG, § 28b GenTG. Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln (Band I (L)). Berlin: Beuth **2019**, 13.00–27/2.
- Carroll A. L., Desai S. H., Atsumi S.: Microbial production of scent and flavor compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, 37, 8–15.
- Certik M., Sereke Berhan S., Sajbidor J.: Lipid Production and Fatty Acid Composition of Selected Strains Belonging to *Mucorales*. *Acta Biotechnol.* **1993**, 13 (2), 193–196.
- Chandrasekhar S., Suresh Kumar M., Muralidhar B.: One Pot Conversion of Carboxylic Acids to Aldehydes with DIBAL-H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 909–910.
- Chesters C. G. C., Peberdy J. F.: Nutritional Factors in Relation to Growth and Fat Synthesis in *Mortierella vinacea*. *J. Gen. Microbiol.* **1965**, 41, 127–134.
- Choudhury S. N., Ghosh A. C., Choudhury M., Leclercq P. A.: Constituents of the Flower and Fruit Oils of *Persea bombycina* (King ex Hook, f.) Kost from India. *J. Essent. Oil Res.* **1997**, 9 (2), 177–180.

- Christinat N., Morin-Rivron D., Masoodi M.: High-Throughput Quantitative Lipidomics Analysis of Nonesterified Fatty Acids in Human Plasma. *J. Proteome Res.* **2016**, 15 (7), 2228–2235.
- Christlbauer M., Schieberle P.: Characterization of the Key Aroma Compounds in Beef and Pork Vegetable Gravies á la Chef by Application of the Aroma Extract Dilution Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (19), 9114–9122.
- Culleré L., Cacho J., Ferreira V.: An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (3), 876–881.
- Czerny M., Christlbauer M., Christlbauer M., Fischer A., Granvogl M., Hammer M., Hartl C., Hernandez N. M., Schieberle P.: Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 228 (2), 265–273.
- Derrington S. R., Turner N. J., France S. P.: Carboxylic acid reductases (CARs): An industrial perspective. *J. Biotechnol.* **2019**, 304, 78–88.
- Dess, D. B., Martin J. C.: Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155–4156.
- Diamantopoulou P., Pananikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A.: Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various Mushroom Species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 167, 536–551.
- Diez V. A., Alvarez A.: Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem.* **2001**, 75, 417–422.
- Dimou D. M., Georgala A., Komaitis M., Aggelis G.: Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol. Res.* **2002**, 106 (8), 925–929.
- Ding B.-J., Liénard M. A., Wang H.-L., Zhao C.-H., Löfstedt C.: Terminal fatty-acyl-CoA desaturase involved in sex pheromone biosynthesis in the winter moth (*Operophtera brumata*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, 41 (9), 715–722.
- Duan Y., Yao P., Chen X., Liu X., Zhang R., Feng J., Wu Q., Zhu D.: Exploring the synthetic applicability of a new carboxylic acid reductase from *Segniliparus rotundus* DSM 44985. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015a**, 115, 1–7.

- Duan Y., Yao P., Du Y., Feng J., Wu Q., Zhu D.: Synthesis of α,β -unsaturated esters via a chemo-enzymatic chain elongation approach by combining carboxylic acid reduction and Wittig reaction. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015b**, 11, 2245–2251.
- Dunkel A., Steinhaus M., Kotthoff M., Nowak B., Krautwurst D., Schieberle P., Hofmann T.: Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A Foodborne Perspective for Future Biotechnology. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2014**, 53 (28), 7124–7143.
- Farag R. S., Khalil F. A., Salem H., Ali L. H. M.: Effects of Various Carbon and Nitrogen Sources on Fungal Lipid Production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, 80 (4), 795–800.
- Farmer V. C., Henderson M. E. K., Russell J. D.: Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by *Polystictus versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 39, 202–211.
- Feussner I., Wasternack C.: Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Fett/Lipid* **1998**, 100 (4–5), 146–152.
- Finnigan W., Thomas A., Cromar H., Gough B., Snajdrova R., Adams J. P., Littlechild J. A., Harmer N. J.: Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry. *ChemCatChem* **2017**, 9 (6), 1005–1017.
- Fraatz M., Zorn H., Rost J., Goldmann M., Gross E., Ley J., Geissler K., Geissler T., Backes M., Hentschel F., Hilmer J.-M.: Method for producing branched aldehydes. Patent. **2015**.
Veröffentlichungsnr: WO 2017/088937 A1.
- Fraatz M. A., Goldmann M., Geissler T., Gross E., Backes M., Hilmer J.-M., Ley J., Rost J., Francke A., Zorn H.: Biotechnological Production of Methyl-Branched Aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (10), 2387–2392.
- Frankel E. N.: Volatile Lipid Oxidation Products. *Prog. Lipid Res.* **1982**, 22, 1–33.
- Gabelman A., Luzio G. A.: Enzymatic Oxidation of Alcohols to Aldehydes in a Continuous Reaction System **1996**. Veröffentlichungsnr: 5,783,429.
- Gahloth D., Dunstan M. S., Quaglia D., Klumbys E., Lockhart-Cairns M. P., Hill A. M., Derrington S. R., Scrutton N. S., Turner N. J., Leys D.: Structures of carboxylic acid reductase reveal domain dynamics underlying catalysis. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13 (9), 975–981.
- Galliard T., Matthew J. A.: The enzymatic formation of long chain aldehydes and alcohols by α -oxidation of fatty acids in extracts of cucumber fruit (*Cucumis sativus*). *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 424, 26–35.

- Gams W.: A Key to the Species of *Mortierella*. *Persoonia* **1977**, 9 (3), 381–391.
- Gasser U., Grosch W.: Primary odorants of chicken broth. A comparative study with meat broths from cow and ox. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, 190, 3–8.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A.: Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J. M. (Hg.): The Proteomics Protocols Handbook. Totowa/NJ (US): Humana Press **2005**, 571–607.
- Gaylord N. G.: Reduction with Complex Metal Hydrides. *J. Chem. Educ.* **1957**, 34 (8), 367–374.
- Goldmann M.: Produktion eines natürlichen Aromas. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie **2018**.
- Goulah C. C., Zhu G., Koszelak-Rosenblum M., Malkowski M. G.: The Crystal Structure of α -Dioxygenase Provides Insight into Diversity in the Cyclooxygenase-Peroxidase Superfamily. *Biochemistry* **2013**, 52 (8), 1364–1372.
- Grimrath A., Berends P., Rabe S., Berger R. G., Linke D.: Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, 232 (3), 415–424.
- Guan X., Fisher M. B., Lang D. H., Zheng Y.-M., Koop D. R., Rettie A. E.: Cytochrome P450-dependent desaturation of lauric acid: isoform selectivity and mechanism of formation of 11-dodecenoic acid. *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 110 (1-2), 103–121.
- Guth H., Grosch W.: 12-Methyltridecanal, a Species-Specific Odorant of Stewed Beef. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1993**, 26, 171–177.
- Guth H., Grosch W.: Identification of the Character Impact Odorants of Stewed Beef Juice by Instrumental Analyses and Sensory Studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 2862–2866.
- Hagström Å. K., Wang H.-L., Liénard M. A., Lassance J.-M., Johansson T., Löfstedt C.: A moth pheromone brewery: production of (*Z*)-11-hexadecenol by heterologous co-expression of two biosynthetic genes from a noctuid moth in yeast cell factory. *Microb. Cell Fact.* **2013**, 12, 125.
- Hamberg M., Ponce de Leon I., Rodriguez M. J., Castresana C.: α -Dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338 (1), 169–174.

- Hamberg M., Ponce de Leon I., Sanz A., Castresana C.: Fatty acid α -dioxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2002a**, 68-69, 363–374.
- Hamberg M., Sanz A., Castresana C.: α -Oxidation of Fatty Acids in Higher Plants. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (35), 24503–24513.
- Hamberg M., Sanz A., Castresana C.: α -Dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism. *Int. Congr. Ser.* **2002b**, 1233, 307–317.
- Hamberg M., Sanz A., Rodriguez M. J., Calvo A. P., Castresana C.: Activation of the Fatty Acid α -Dioxygenase Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves. Formation of Oxylipins Protecting against Cell Death. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (51), 51796–51805.
- Hartvigsen K., Lund P., Hansen L. F., Holmer G.: Dynamic Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry Characterization of Volatiles Produced in Fish Oil Enriched Mayonnaise during Storage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (10), 4858–4867.
- Hawksworth D., Lücking R.: Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. In: Heitman J., Howlett B., Crous P., Stukenbrock E., James T., Gow N. (Hg.): The Fungal Kingdom. Washington/DC (US): ASM Press **2017**, 79–95.
- He A., Li T., Daniels L., Fotheringham I., Rosazza J. P. N.: *Nocardia* sp. Carboxylic Acid Reductase: Cloning, Expression, and Characterization of a New Aldehyde Oxidoreductase Family. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70 (3), 1874–1881.
- Hefetz A., Taghizadeh T., Francke W.: The Exocrinology of the Queen Bumble Bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Z. Naturforsch.* **1996**, 51c, 409–422.
- Hermsmeier D., Schittko U., Baldwin Ian T.: Molecular Interactions between the Specialist Herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and Its Natural Host *Nicotiana attenuata*. I. Large-Scale Changes in the Accumulation of Growth- and Defense-Related Plant mRNAs. *Plant Physiol.* **2001**, 125, 683–700.
- Hitchcock C., James A. T.: The Mechanism of α -Oxidation in Leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, 413–424.
- Hitchcock C., Morris L. J., James A. T.: The Stereochemistry of α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. The Configuration of Biosynthetic Long-Chain 2-Hydroxyacids. *Eur. J. Biochem.* **1968**, 3, 473–475.

- Hofmann T., Münch P., Schieberle P.: Quantitative Model Studies on the Formation of Aroma-Active Aldehydes and Acids by Strecker-Type Reactions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (2), 434–440.
- Holtz R. B., Schisler L. C.: Lipid Metabolism of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: I. Analysis of Sporophore and Mycelial Lipids. *Lipids* **1971**, 6 (3), 176–180.
- Horvat M., Fiume G., Fritsche S., Winkler M.: Discovery of carboxylic acid reductase (CAR) from *Thermothelomyces thermophila* and its evaluation for vanillin synthesis. *J. Biotechnol.* **2019**, 304, 44–51.
- Huang F.-C., Schwab W.: Overexpression of hydroperoxide lyase, peroxygenase and epoxide hydrolase in tobacco for the biotechnological production of flavours and polymer precursors. *Plant Biotechnol. J.* **2012**, 10 (9), 1099–1109.
- Hucke B.: Biotransformation von methylverzweigten Fettsäuren zu Aldehyden mittels α -Dioxygenase. Biotransformation of methyl-branched fatty acids to aldehydes by means of α -dioxygenase. Masterarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen. Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie **2014**.
- Huff G. S., Doncheva I. S., Brinkley D. W., Angeles-Boza A. M., Mukherjee A., Cramer C. J., Roth J. P.: Experimental and Computational Investigations of Oxygen Reactivity in a Heme and Tyrosyl Radical-Containing Fatty Acid α -(Di)oxyxygenase. *Biochemistry* **2011**, 50 (34), 7375–7389.
- Inagaki S., Fujikawa S., Wada Y., Kumazawa K.: Identification of the possible new odor-active compounds "12-methyltridecanal and its analogs" responsible for the characteristic aroma of ripe Gouda-type cheese. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2015**, 79 (12), 2050–2056.
- Inagaki S., Fujikawa S., Wada Y., Kumazawa K.: Characterization of Methyl-Branched Aldehyde Analogs as Potent Odorants in Ripe Natural Cheeses. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2016**, 63 (9), 388–393.
- Kaehne F., Buchhaupt M., Schrader J.: A recombinant α -dioxygenase from rice to produce fatty aldehydes using *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011a**, 90 (3), 989–995.
- Kaehne F., Buchhaupt M., Schrader J.: Whole-Cell Biotransformation of Fatty Acids to Obtain Fatty Aldehydes Shortened by One Carbon Atom **2011b**. Veröffentlichungsnr: WO2012/025629A1.

- Kahlos K.: The Effects of Some Amino Acids on Growth and Lipid Production in *Inonotus obliquus* Grown *in vitro*. *Acta Biotechnol.* **1994**, 14 (2), 169–179.
- Kalač P.: Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* **2009**, 113 (1), 9–16.
- Kaneda T.: Factors affecting the relative ratio of fatty acids in *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.* **1971**, 17, 269–275.
- Kaneda T.: Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomix Significance. *Microbiol. Rev.* **1991**, 55 (2), 288–302.
- Kao Y.-H., Youson J. H., Vick B., Sheridan M. A.: Differences in the fatty acid compositions of larvae and metamorphosing sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 131, 153–169.
- Kaur J., Kumar A., Kaur J.: Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 106, 803–822.
- Kavishree S., Hemavathy J., Lokesh B. R., Shashirekha M. N., Rajarathnam S.: Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chem.* **2008**, 106, 597–602.
- Kerscher R., Nürnberg K., Voigt J., Schieberle P., Grosch W.: Occurrence of 12-Methyltridecanal in Microorganisms and Physiological Samples Isolated from Beef. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (6), 2387–2390.
- Khusnutdinova A. N., Flick R., Popovic A., Brown G., Tchigvintsev A., Nocek B., Correia K., Joo J. C., Mahadevan R., Yakunin A. F.: Exploring Bacterial Carboxylate Reductases for the Reduction of Bifunctional Carboxylic Acids. *Biotechnol. J.* **2017**, 12 (11).
- Koeduka T., Matsui K., Akakabe Y., Kajiwara T.: Molecular characterization of fatty acid α -hydroperoxide-forming enzyme (α -oxygenase) in rice plants. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28 (6), 765–768.
- Koeduka T., Matsui K., Akakabe Y., Kajiwara T.: Catalytic Properties of Rice α -Oxygenase. A Comparison with Mammalian Prostaglandin H Synthases. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (25), 22648–22655.
- Konopka U. C., Grosch W.: Potent odorants causing the warmed-over flavour in boiled beef. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, 193, 123–125.

- Koszela-Rosenblum M., Krol A. C., Simmons D. M., Goulah C. C., Wroblewski L., Malkowski M. G.: His-311 and Arg-559 Are Key Residues Involved in Fatty Acid Oxygenation in Pathogen-Inducible Oxygenase. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (36), 24962–24971.
- Kourist R., Schweiger A., Büchsenschütz H.: Enzymatic Decarboxylation as a Tool for the Enzymatic Defunctionalization of Hydrophobic Bio-based Organic Acids. In: Bornscheuer U. T. (Hg.): *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes*. London (UK): Elsevier **2018**, 89–118.
- Kramer L., Hankore E. D., Liu Y., Liu K., Jimenez E., Guo J., Niu W.: Characterization of Carboxylic Acid Reductases for Biocatalytic Synthesis of Industrial Chemicals. *Chembiochem* **2018**, 19 (13), 1452–1460.
- Křen V., Řezanka T., Sajdl P., Rehacek Z.: Identification of fatty acids in submerged cultures of *Claviceps* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, 30, 359–363.
- Kunjapur A. M., Cervantes B., Prather K. L. J.: Coupling carboxylic acid reductase to inorganic pyrophosphatase enhances cell-free *in vitro* aldehyde biosynthesis. *Biochem. Eng. J.* **2016**, 109, 19–27.
- Kunjapur A. M., Tarasova Y., Prather K. L. J.: Synthesis and Accumulation of Aromatic Aldehydes in an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (33), 11644–11654.
- Laemmli U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680–685.
- Ley S. V., Norman J., Griffith W. P., Marsden S. P.: Tetrapropylammonium Perruthenate, Pr₄N⁺RuO₄⁻, TPAP: A Catalytic Oxidant for Organic Synthesis. *Synthesis* **1994**, 1994, 639–666.
- Liu W., Rogge C. E., Bambai B., Palmer G., Tsai A.-L., Kulmacz R. J.: Characterization of the Heme Environment in *Arabidopsis thaliana* Fatty Acid α -Dioxygenase-1. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (28), 29805–29815.
- Liu W., Wang L.-H., Fabian P., Hayashi Y., McGinley C. M., van der Donk W. A., Kulmacz R. J.: *Arabidopsis thaliana* fatty acid alpha-dioxygenase-1: evaluation of substrates, inhibitors and amino-terminal function. *Plant Physiol. Biochem.* **2006**, 44 (5-6), 284–293.
- Longo M. A., Sanroman M. A.: Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, 44 (3), 335–353.

- Lorber K., Buettner A.: Structure-Odor Relationships of (*E*)-3-Alkenoic Acids, (*E*)-3-Alken-1-ols, and (*E*)-3-Alkenals. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (30), 6681–6688.
- Lorber K., Zeh G., Regler J., Buettner A.: Structure-Odor Relationships of (*Z*)-3-Alken-1-ols, (*Z*)-3-Alkenals, and (*Z*)-3-Alkenoic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (10), 2334–2343.
- Lösel D. M., Sancholle M.: Fungal Lipids. In: Prasad R., Ghannoum M. A. (Hg.): Lipids of pathogenic fungi. Boca Raton/FL (US): CRC **1996**, 27–62.
- Marekov I., Momchilova S., Grung B., Nikolova-Damyanova B.: Fatty acid composition of wild mushroom species of order Agaricales - Examination by gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, 910, 54–60.
- Mareš J., Johansen J. R., Hauer T., Zima J., Ventura S., Cuzman O., Tiribilli B., Kaštovský J.: Taxonomic resolution of the genus *Cyanothece* (Chroococcales, Cyanobacteria), with a treatment on *Gloeothece* and three new genera, *Crocospaera*, *Rippkaea*, and *Zehria*. *J. Phycol.* **2019**, 55 (3), 578–610.
- Markovetz A. J., Stumpf P. K., Hammarstorm S.: Fat Metabolism in Higher Plants: LIII. Characterization of the Product of the Peanut α -oxidation system. *Lipids* **1972**, 7, 159–164.
- Martínez A. T., Barrasa J. M., Prieto A., Blanco M. N.: Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycol. Res.* **1991**, 95 (7), 782–784.
- Matsui K.: Properties and Structures of Fatty Acid Hydroperoxide Lyase. *Belg. J. Bot.* **1998**, 131 (1), 50–62.
- Maurer S., Schewe H., Schrader J., Buchhaupt M.: Investigation of fatty aldehyde and alcohol synthesis from fatty acids by α Dox- or CAR-expressing *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **2019**, 305, 11–17.
- May W. A., Peterson R. J., Chang S. S.: Chemical Reactions Involved in the Deep-Fat Frying of Foods: IX. Identification of the Volatile Decomposition Products of Triolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, 60 (5), 990–995.
- Meijboom P. W., Jongenotter G. A.: Flavor Perceptibility of Straight Chain, Unsaturated Aldehydes as a Function of Double-Bond Position and Geometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, 58 (6), 680–682.

- Moura M., Pertusi D., Lenzini S., Bhan N., Broadbelt L. J., Tyo K. E. J.: Characterizing and predicting carboxylic acid reductase activity for diversifying bioaldehyde production. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, 113 (5), 944–952.
- Naguib K.: Growth and Metabolism of *Aspergillus nidulans* Eidam in Surface Culture. *Can. J. Bot.* **1959**, 37, 353–364.
- Nair N. G.: Lipid profile of *Pleurotus sajor caju*. *Ann. appl. Biol.* **1989**, 114, 167–176.
- Napora-Wijata K., Strohmeier G. A., Winkler M.: Biocatalytic reduction of carboxylic acids. *Biotechnol. J.* **2014**, 9 (6), 822–843.
- Narziss L.: Technological Factors of Flavour Stability. *J. Inst. Brew.* **1986**, 92 (4), 346–353.
- Niemenmaa O., Galkin S., Hatakka A.: Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, 62 (2), 125–134.
- Ogawa J., Sakuradani E., Shimizu S.: Production of C₂₀ Polyunsaturated Fatty Acids by an Arachidonic Acid-Producing Fungus *Mortierella alpina* 1S-4 and Related Strains. In: Kuo T. M., Gardner H. W. (Hg.): Lipid Biotechnology. New York/NY (US): Marcel Dekker **2002**, 563–574.
- Omura K., Swern D.: Oxidation of Alcohols by "Activated" Dimethyl Sulfoxide. A Preparative Steric and Mechanistic Study. *Tetrahedron* **1978**, 34 (11), 1651–1660.
- Padmakumari K. P.: Free and Glycosidically Bound Volatiles in Coriander Herb (*Coriandrum sativum*). *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2008**, 11 (6), 615–622.
- Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G.: Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour. Technol.* **2004**, 95 (3), 287–291.
- Papaspyridi L., Sinanoglou V., Strati I., Katapodis P., Christakopoulos P.: Fatty acid profile of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma australe* grown naturally and in a batch bioreactor. *Acta Aliment.* **2013**, 42 (3), 328–337.
- Pearson L. K., Raper H. S.: The Influence of Temperature on the Nature of the Fat formed by Living Organisms. *Biochem. J.* **1927**, 21 (4), 875–879.
- Pedneault K., Angers P., Avis T. J., Gosselin A., Tweddell R. J.: Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. '*citrino-pileatus*' grown at different temperatures. *Mycol. Res.* **2007**, 111, 1228–1234.

- Pedneault K., Angers P., Gosselin A., Tweddell R. J.: Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family *Boletaceae*. *Mycol. Res.* **2006**, 110 (10), 1179–1183.
- Pedneault K., Angers P., Gosselin A., Tweddell R. J.: Fatty acid profiles of polar and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern Canada. *Mycol. Res.* **2008**, 112 (12), 1428–1434.
- Ponce de Leon I., Sanz A., Hamberg M., Castresana C.: Involvement of the *Arabidopsis* α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant J.* **2002**, 29 (1), 61–72.
- Potter T. L., Fagerson I. S.: Composition of coriander leaf volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 2054–2056.
- Qu G., Guo J., Yang D., Sun Z.: Biocatalysis of carboxylic acid reductases: phylogenesis, catalytic mechanism and potential applications. *Green Chem.* **2018**, 20 (4), 777–792.
- Rabetafika H. N., Gigot C., Fauconnier M.-L., Ongena M., Destain J., Du Jardin P., Wathelet J.-P., Thonart P.: Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnol. Lett.* **2008**, 30 (6), 1115–1119.
- Ranson C. von, Schnabel K.-O., Belitz H.-D.: Investigations in structure-activity relationships of odorous substances. 2nd communication: Detection and recognition thresholds and odour qualities of saturated and unsaturated aliphatic aldehydes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 195 (6), 527–535.
- Ratledge C.: Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel B. S., Kakuda Y. (Hg.): Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids. London (UK): Blackie Academic and Professional **1994**, 235–291.
- Reinders A., Ward J. M.: Functional characterization of the α -glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. *Mol. Microbiol.* **2001**, 39 (2), 445–454.
- Renes E., Gómez-Cortés P., La Fuente M. A. de, Fernández D., Tornadijo M. E., Fresno J. M.: Effect of forage type in the ovine diet on the nutritional profile of sheep milk cheese fat. *J. Dairy Sci.* **2020**, 103 (1), 63–71.
- Rezanka T., Mares P.: Unusual and very long-chain fatty acids produced by Basidiomycetes. *J. Chromatogr.* **1987** (409), 390–395.

- Rezanka T., Rozentsvet O. A., Dembitsky V. M.: Characterization of the hydroxy fatty acid content Basidiomycotina. *Folia Microbiol.* **1999**, 44 (6), 635–641.
- Rodriguez G. M., Atsumi S.: Isobutyraldehyde production from *Escherichia coli* by removing aldehyde reductase activity. *Microb. Cell Fact.* **2012**, 11 (1), 90.
- Rychlik M., Schieberle P., Grosch W.: Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants. Garching **1998**.
- Saffert A., Hartmann-Schreier J., Schön A., Schreier P.: A Dual Function α -Dioxygenase-Peroxidase and NAD⁺ Oxidoreductase Active Enzyme from Germinating Pea Rationalizing α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. *Plant Physiol.* **2000**, 123, 1545–1551.
- Saison D., Schutter D. P. de, Delvaux F., Delvaux F. R.: Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1190 (1-2), 342–349.
- Saito S., Takaoka H., Kimura K., Samuta Y.: Preparation of 5-methylundecanal and 6-methylundecanal and fragrant compositions containing the branched aldehydes and 10-methylundecanal. Patent. **2014**. Veröffentlichungsnr: JP 2014210751.
- Sambrook J., Green M. R.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4. Aufl. Cold Spring Harbor/NY (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press **2012**.
- Sanders R. A., Zyzak D. V., Morsch T. R., Zimmerman S. P., Searles P. M., Strothers M. A., Eberhart B. L., Woo A. K.: Identification of 8-Nonenal as an Important Contributor to "Plastic" Off-Odor in Polyethylene Packaging. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (5), 1713–1716.
- Sanz A., Moreno J. I., Castresana C.: PIOX, a New Pathogen-Induced Oxygenase with Homology to Animal Cyclooxygenase. *Plant Cell* **1998**, 10, 1523–1537.
- Schnabel K.-O., Belitz H.-D., Ranson C. von: Investigations on the structure-activityrelationships of odorous substances. Communication I. Detection thresholds and odour qualities of aliphatic and alicyclic compounds containing oxygen functions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, 187, 215–223.
- Schultz J., Lynen F.: Untersuchungen zur Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in Hefe. *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 48–54.

- Schwendenwein D., Fiume G., Weber H., Rudroff F., Winkler M.: Selective Enzymatic Transformation to Aldehydes in vivo by Fungal Carboxylate Reductase from *Neurospora crassa*. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358 (21), 3414–3421.
- Seitz L. M., Sauer D. B., Burroughs R., Mohr H. E., Hubbard J. D.: Ergosterol as a Measure of Fungal Growth. *Phytopathology* **1979**, 69, 1202–1203.
- Shaw R.: The occurrence of γ -linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, 98, 230–237.
- Shaw R.: The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. In: Paoletti R., Kritchevsky D. (Hg.): *Advances in lipid research*, Bd. 4. New York/NY (US): Academic Press **1966**, 107–174.
- Shaw R.: Fatty acids of fruiting bodies of Basidiomycetes. *Nature* **1967**, 7, 86–87.
- Sheppard M. J., Kunjapur A. M., Wenck S. J., Prather K. L. J.: Retro-biosynthetic screening of a modular pathway design achieves selective route for microbial synthesis of 4-methylpentanol. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5031.
- Shimizu S., Jareonkitmongkol S., Kawashima H., Akimoto K., Yamada H.: Production of a novel ω 1-eicosapentaenoic acid by *Mortierella alpina* 1S-4 grown on 1-hexadecene. *Arch. Microbiol.* **1991**, 156, 163–166.
- Shine W. E., Stumpf P. K.: Far Metabolism in Higher Plants. Recent Studies on Plant α -Oxidation Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 162, 147–157.
- Sinanoglou V. J., Zoumpoulakis P., Heropoulos G., Proestos C., Ćirić A., Petrovic J., Glamoclija J., Sokovic M.: Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, 52 (6), 3264–3272.
- Smit B. A., Engels W. J. M., Smit G.: Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, 81 (6), 987–999.
- Soares A. T., da Costa D. C., Silva B. F., Lopes R. G., Derner R. B., Antoniosi Filho N. R.: Comparative Analysis of the Fatty Acid Composition of Microalgae Obtained by Different Oil Extraction Methods and Direct Biomass Transesterification. *Bioenerg. Res.* **2014**, 7 (3), 1035–1044.
- Stahl P. D., Klug M. J.: Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62 (11), 4136–4146.

- Stoessl A.: Metabolites of *Cercospora arachidicola*. The first report of long-chain fatty aldehydes from a fungus. *Can. J. Microbiol.* **1985**, 31 (2), 129–133.
- Stolterfoht H., Schwendenwein D., Sensen C. W., Rudroff F., Winkler M.: Four distinct types of E.C. 1.2.1.30 enzymes can catalyze the reduction of carboxylic acids to aldehydes. *J. Biotechnol.* **2017**, 257, 222–232.
- Strohmeier G. A., Eiteljörg I. C., Schwarz A., Winkler M.: Enzymatic One-Step Reduction of Carboxylates to Aldehydes with Cell-Free Regeneration of ATP and NADPH. *Chemistry* **2019**, 25 (24), 6119–6123.
- Studier F. W.: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression Purif.* **2005**, 41 (1), 207–234.
- Stumpf P. K.: Fat Metabolism in Higher Plants. VIII. Saturated Long Chain Fatty Acid Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **1956**, 643–649.
- Sumner J. L.: The fatty acid composition of basidiomycetes. *N. Z. J. Bot.* **1973**, 11 (3), 435–442.
- Surburg H., Panten J.: Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH **2006**.
- Tahoun M., Shata O., Mashaley R., Abou-Donia S.: Influence of selected sugars and temperature on fatty acids composition in *Candida lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986**, 24 (3), 235–239.
- Tajima K., Tanaka S., Yamaguchi T., Fujita M.: Analysis of Green and Yellow Yuzu Peel Oils (*Citrus junos* Tanaka). Novel Aldehyde Components with Remarkably Low Odor Thresholds. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1544–1548.
- Tang X., Zhang H., Chen H., Chen Y. Q., Chen W., Song Y.: Effects of 20 Standard Amino Acids on the Growth, Total Fatty Acids Production, and γ -Linolenic Acid Yield in *Mucor circinelloides*. *Curr. Microbiol.* **2014**, 69 (6), 899–908.
- Tang Y., Li Y.-Y., Li H.-M., Wan D.-J., Tang Y.-J.: Comparison of Lipid Content and Fatty Acid Composition between *Tuber* Fermentation Mycelia and Natural Fruiting Bodies. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (9), 4736–4742.
- Teranishi R., Buttery R. G., Guadagni D. G.: Odor quality and chemical structure in fruit and vegetable flavors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, 237, 209–216.

- The UniProt Consortium: UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47 (D1), D506–D515.
- Thompson M. P., Derrington S. R., Heath R. S., Porter J. L., Mangas-Sanchez J., Devine P. N., Truppo M. D., Turner N. J.: A generic platform for the immobilisation of engineered biocatalysts. *Tetrahedron* **2019**, 75 (3), 327–334.
- Tirajoh A., Aung T. S. T., McKay A. B., Plant A. L.: Stress-responsive α -dioxygenase expression in tomato roots. *J. Exp. Bot.* **2005**, 56 (412), 713–723.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, 76 (9), 4350–4354.
- Tyrrell D.: The fatty acid compositions of 17 *Entomophthora* isolates. *Can. J. Microbiol.* **1967**, 13, 755–760.
- Tyrrell D.: The fatty acid composition of some *Entomophthoraceae*. III. *Can. J. Microbiol.* **1971**, 17, 1115–1118.
- Ullrich F., Grosch W.: Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, 184 (4), 277–282.
- van den Dool H., Kratz P. D.: A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1963**, 11, 463–471.
- Venkatasubramanian P., Daniels L., Rosazza J. P. N.: Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (1), 478–485.
- Vranová E., Coman D., Grussem W.: Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, 64, 665–700.
- Wahl R., Wippel K., Goos S., Kämper J., Sauer N.: A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol.* **2010**, 8 (2), e1000303.
- Wang Q., O'Reilly J., Pawliszyn J.: Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071 (1-2), 147–154.

- Wang T.-A., Cheng M.-J., Lee S.-J., Yang C.-W., Chang H.-S., Chen I.-S.: Secondary Metabolites from the Leaves of *Litsea lii* var. *nunkao-tahangensis*. *Helv. Chim. Acta* **2008**, 91, 1036–1044.
- Wassef M. K.: Fungal Lipids. In: Paoletti R., Kritchevsky D. (Hg.): *Advances in lipid research*, Bd. 15. New York/NY (US): Academic Press **1977** (*Advances in Food Research*, 15), 159–232.
- Watcharananun W., Cadwallader K. R., Huangrak K., Kim H., Lorjaroenphon Y.: Identification of predominant odorants in thai desserts flavored by smoking with "Tian Op", a traditional Thai scented candle. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (3), 996–1005.
- Weete J. D.: *Fungal Lipid Biochemistry. Distribution and Metabolism* (Monographs in Lipid Research 1). New York/NY (US): Plenum Press **1974**.
- Wells J. M., Butterfield J. E., Revear L. G.: Identification of Bacteria Associated with Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables by Cellular Fatty Acid Composition: An Expert System for Personal Computers. *Phytopathology* **1992**, 83, 445–455.
- Werkhoff P., Brüning J., Emberger R., Güntert M., Hopp R.: Flavor Chemistry of Meat Volatiles: New Results on Flavour Components from Beef, Pork, and Chicken. In: Hopp R., Mori K. (Hg.): *Recent Developments in Flavor and Fragrance Chemistry. Proceedings of the 3rd International Haarmann & Reimer Symposium*. Weinheim: Wiley-VCH **1993**, 183–213.
- Widder S., Eggers M., Pickenhagen W.: New flavour compounds from orange essence oil. In: Le Quéré J.-L. (Hg.): *Flavour research at the dawn of the twenty-first century. Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium*. London (UK): Ed. Tec & Doc **2003**, 745–748.
- Winkler M.: Carboxylic acid reductase enzymes (CARs). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 23–29.
- Winkler M., Winkler C. K.: *Trametes versicolor* carboxylate reductase uncovered. *Monatsh. Chem.* **2016**, 147, 575–578.
- Zakharkin L. I., Khorlina I. M.: Reduction of Esters of Carboxylic Acids into Aldehydes with Diisobutylaluminium Hydride. *Tetrahedron Lett.* **1962**, 14, 619–620.
- Zhang Y., Guo S., Liu Z., Chang S. K. C.: Off-flavor related volatiles in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (30), 7457–7462.

Zhang Y., Lin K.: A phylogenomic analysis of *Escherichia coli* / *Shigella* group: implications of genomic features associated with pathogenicity and ecological adaptation. *BMC Evol. Biol.* **2012**, 12 (174).

Zhu G., Koszelak-Rosenblum M., Malkowski M. G.: Crystal structures of α -dioxygenase from *Oryza sativa*: insights into substrate binding and activation by hydrogen peroxide. *Protein Sci.* **2013**, 22 (10), 1432–1438.

Zorn H., Schüler M., Berger R. G.: Pyruvate Decarboxylase Catalysed Formation of Terpenoid α -hydroxy Ketones. *Biocatal. Biotransform.* **2003**, 21 (6), 341–347.

Anhang

A. Aminosäuresequenzen

A.1 α -Dioxygenase aus *Crocospaera subtropica*

MGIFDKFDSIFTQVEQLWHRLPTPLALIKLLTFRNELREKNLHDTSQLPDKHLLPQPTPDPQGHLLTA
RTADGSFNDLEHPMGMAGTRFGRNIPLTAIQPETPQQLMTPNPRVVSRTLMTREDFKPATILNLLAA
AWIQFENHDWFVSHGDNKPEDKLEIPLANDPWPEEYRPLEVGKTLPTDSRPEGAKPPTFINTVTHWWD
GSQIYGSNPETVDQLRSHEGKLIIGENGLLPVDPETGVDITGFNDNWWIGLGLMLHTLFTREHNLICD
HLKQEYSQWSDDDLFDHARLINAALMAKIHTVDWTPAILPLPATDIALNVNWNWNGFLGEDIKQVLGTVG
EGEADIALLTGIIGSDKNHHTAPYYLTFEEFVSVYRMHPLIPDELEFRSLEGDKFLQEVNFFEMSGKRTR
ALLESISLPDLFYSGITHPGAITLHNYPRFLQQLVRDNGEVFDLAAVDILDRDRERGVPYRNRFREIM
GRGRVKCFEEISSNKQWVEEMRRVYNDNIDQVDLMVGLFAEDTPEGFGFSDTAFRVFILMASRRLKSD
RFFTTDYRAEIYTQFGLDWIANNMVSVLQRHFPQLSPVLYGVDNAFKPWRRVPS (LEHHHHH)

A.2 α -Dioxygenase aus *Oryza sativa*

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMGSLFKPRVHPDLRDVFSKMSFFDKIGFLFIHAFDKRNLWCHKVP
VPIGLLYLNTRRTLLEKYNNLAVGRSSHGALFDPKEFLYRTEDGKYNDPHNAEAGSQNTFFGRNMEPV
DQQDELMSPPDFVAVTKLLARREYKDTGKQFNILAAAWIQFMVHDWMDHMETDGOIGITAPKEVANEC
PLKSFKFHPTKELPTNSDGKIKIGHYNI RTAWWDGSAVYGNNEERAERLRTYVDGKLVIGDDGLLLHKE
NGVALSGDIRNSWAGVSILQALFVKEHNAVCDAIKEEHPNLSDEELYRYAKLVTSAVIKVHTIDWTV
ELLKTKTMRAAMRANWYGLLGKKIKDTFGHIGGPIILGGLVGLKPKPNNHGVPYSLTTEEFTSVYRMHSLI
PSTLKLDRDPTGQPDANNSPPCLEIDIDIGEMIGLKGEELSKIGFEKQALSMGYQACGALELWNYPSSF
RNLI PQNL DGTNRSDRIDLAALVYRDRERSVPRYNEFRRLFLIPIKSWEDLTSKDAIETIRAIYG
DDVEKLDLLVGLMAEKKIKGFAISETAFNIFILMASRRLEADRFFTSNFNEETYTKKGMQWVKTTTEGL
RDVINRHYPEITAKWMKSSSAFSVWDADY

A.3 Carbonsäure-Reduktase aus *Mycobacterium marinum*

MGSSHHHHHHSQDPMSPI TREERLERRIQDLYANDPQFAAAKPATAITAAIERPGLPLPQIIETVMTG
YADRPALAQRSVEFVTDAGTGHTTLRLLPHFETISYGELWDRISALADVLSTEQTVKPGDRVCLLGFN
SVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAITQLQPIVAETQPTMIAASVDALADATELALSGQTATRVLVF
DHRQVDAHRAAVESARERLAGSAVVETLAEAIARGDVPRGASAGSAPGTDVSDDSLALLIYTSGSTG
APKGAMYPRRNVATFWRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHVMGRQIILYGTLCNGGTAYFVAKSDLSTLF
EDLALVRPTELTFVPRVWDMVFDEFQSEVDRRLVDGADRVALEAQVKAERNDVLGGRYTSALTGSAP
ISDEMKAWEELLDMLHVEGYGSTEAGMILIDGAI RRAVLDYKLVDPDLGYFLTDRPHPRGELLVK
TDSLFPGYQRAEVTADVFDADGFYRTGDIMAEVGPQQFVYLD RRNNVLKLSQGEFVTVSKLEAVFGD
SPLVRQIYIYGNSARAYLLAVIVPTQEALDAVPVEELKARLGDSLQEVAKAAGLQSYEIPRDFI IETT
PWTLENGLLTGIRKLARPQLKKHYGELLEQIYTDLAHQADELRSRQSGADAPVLVTVCRAAAALLG
GSASDVQPDHFDTDLGGDSLALSFTNLLHEIFDIEVPVGVIVSPANDLQALADYVEAARKPGSSRPT
FASVHGASNGQVTEVHAGDLSLDFIDAATLAEAPRLPAANTQVRTVLLTGATGFLGRYLALWLERM
DLVDGKLI CLVRAKSDTEARARLDKTFDSGDPELLAHYRALAGDHLEVLGADKGEADLGLDRQTWQRL
ADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQLFGPNALGTAELLRLALTSKIKPYSYTSITIGVADQIPPSAFTEDAD
IRVISATRAVDDSYANGYSNSKWAGEVLLREAHDL CGLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPDMFTMI
LSLAATGIAPGSFYELAADGARQRAHYDGLPVEFIAEAI STLGAQSQDGFHTYHVMNYPYDDGIGLDEF
VDWLNESGCP IQRIADYGDWLQRFETALRALPDRQRHSSLLPLLHNYRQPERPVRGSIAPTDRFRAAV
QEAKIGPKDKDIPHVGAPIIVKYVSDLRLLGLL

B. Retentionsindices von Referenzverbindungen

Tabelle A 1: RIs der Referenz-Fettsäuremethylester nach van den Dool und Kratz (1963).

Fettsäuremethylester ^a	RI		
	DB-5ms	Select FAME	VF-WAXms
6:0	924	1233	1185
7:0	1023	1344	1284
8:0	1123	1453	1386
9:0	1223	1563	1488
10:0	1323	1673	1590
11:0	1423	1783	1693
12:0	1523	1893	1796
12:1(5Z)	1496	1925	1810
12:1(11)	1515	1966	1848
13:0	1623	2004	1898
<i>i</i> 14:0	1686	2061	1954
α 14:0	1693	2082	1968
14:0	1723	2114	2002
14:1(5Z)	1694	2143	2012
14:1(9Z)	1708	2179	2038
<i>i</i> 15:0	1786	2171	2056
α 15:0	1794	2192	2071
15:0	1823	2231	2105
15:1(10Z)	1809	2297	2141
<i>i</i> 16:0	1887	2280	2160
α 16:0	1894	2301	2174
16:0	1924	2334	2209
16:1(7Z)	1896	2378	2226
16:1(9Z)	1900	2388	2233
16:1(11Z)	1911	2403	2246
16:2(7Z,10Z)	1887	2454	2270
16:2(9Z,12Z)	1903	2479	2292
16:3(7Z,10Z,13Z)	1891	2547	2335
α 17:0	1995	2411	2278
17:0	2024	2443	2312
17:1(9Z)	1998	2495	2333
17:1(10Z)	2000	2508	2336
α 18:0	2096	2521	2382
18:0	2125	2552	2416
18:1(9Z)	2095	2601	2433
18:1(9E)	2103	2583	2436

Tabelle A 1 (Fortsetzung)

Fettsäuremethylester ^a	RI		
	DB-5ms	Select FAME	VF-WAXms
18:1(11Z)	2101	2611	2441
18:2(6Z,9Z)	2079	2661	2466
18:2(9Z,12Z)	2088	2682	2479
18:2(9E,12E)	2098	2639	2485
18:2(9Z,11E)	2141	2799	2573
18:2(10E,12Z)	2151	2815	2585
18:3(6Z,9Z,12Z)	2070	2737	2510
18:3(9Z,12Z,15Z)	2093	2777	2545
18:3(9Z,11E,13E)	2239	3052	2790
18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	2075	2835	2576
19:0	2226	2662	2520
19:1(10Z)	2196	2712	2537
20:0	2326	2770	2623
20:1(11Z)	2296	2822	2641
20:2(11Z,14Z)	2290	2906	2689
20:3(5Z,8Z,11Z)	2257	2925	2692
20:3(5Z,11Z,14Z)	2264	2946	2703
20:3(8Z,11Z,14Z)	2268	2963	2715
20:3(11Z,14Z,17Z)	2268	3004	2756
20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	2247	3004	2738
20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	2253	3107	2805
21:0	2426	2878	2726
22:0	2527	2985	2830
22:1(13Z)	2498	3042	2849
22:2(13Z,16Z)	2492	3128	2899
22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)	2448	3199	2950
22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)	2437	3380	3049
23:0	2628	3092	2933
24:0	2729	3198	3037
24:1(15Z)	2701	3257	3058
25:0	2831	3303	3138
26:0	2930	3429	3241

^a Es handelt sich um die Abkürzungen der entsprechenden Fettsäuren.

C. Ergänzende Fettsäureprofile

C.1 Ergänzende Fettsäureprofile von *Flammulina velutipes*

Tabelle A 2: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Nährmedien (Teil I: ME, MEP, MPG). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	ME		MEP		MPG	
		Anteil [%] ^x	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,05	n. d.		< 0,1	< 0,4
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,05	n. d.		< 0,1	< 0,4
3	10:0	0,2	0,1	< 0,1	< 0,07	0,4	1,4
4	10:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
5	11:0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4
6	12:0 [†]	9,6	4,9	6,7	5,4	21,3	74,7
7	12:1(5Z) ^{+,†}	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
8	12:1(9Z) [‡]	0,1	0,06	0,3	0,3	< 0,1	< 0,4
9	12:1(11)		n. d.		n. d.	4,3	15,1
10	12:2 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
11	13:0	0,5	0,2	0,3	0,3	0,3	1,0
12	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,05		n. d.	< 0,1	< 0,4
13	14:0 [†]	2,7	1,4	1,6	1,3	5,4	19,0
14	14:1(5Z) [†]	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
15	14:1 ^{‡,†}		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
16	15:0	2,4	1,3	2,5	2,0	1,5	5,4
17	15:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
18	15:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
19	16:0	23,7	12,7	18,7	15,2	18,7	65,3
20	16:1(7Z) [†]	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
21	16:1(9Z)	0,6	0,3	0,6	0,5	0,3	1,1
22	16:1(11Z)	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,6
23	16:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
24	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
25	16:2(9Z,12Z)	0,1	0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
26	17:0	0,3	0,1	0,3	0,2	0,5	1,6
27	17:1(8Z) ^{‡,†}	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
28	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
29	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
30	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,05	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
31	18:0	5,4	3,0	4,6	3,7	6,8	23,9
32	18:1(9Z) [†]	13,1	7,2	9,1	7,4	15,6	54,6
33	18:1(11Z) [†]	1,5	0,8	2,1	1,7	0,7	2,5
34	18:2(9Z,12Z) [†]	34,9	19,0	43,7	35,4	18,7	65,5
35	18:2 ^{‡,†}	0,8	0,4	2,6	2,1	0,1	0,4
36	19:0		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,4
37	18:3(9Z,12Z,15Z)	3,0	1,7	5,2	4,2	1,5	5,2
38	20:0	0,1	0,07	< 0,1	< 0,07	0,2	0,8
39	20:1(11Z)		n. d.	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4

Tabelle A 2 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	ME		MEP		MPG	
		Anteil [%] ^x	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
40	20:2(11Z,14Z)	n. d.		< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
41	20:3(11Z,14Z,17Z)	n. d.			n. d.		n. d.
42	21:0	n. d.		< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,4
43	22:0	n. d.		0,2	0,1	0,4	1,5
44	22:1(13Z) ⁺	n. d.			n. d.	< 0,1	< 0,4
45	23:0	0,1	0,06	< 0,1	< 0,07	0,3	1,0
46	24:0	0,4	0,2	0,1	0,3	0,8	2,7
47	24:1(15Z)	n. d.			n. d.	< 0,1	< 0,4
48	25:0	n. d.			n. d.	< 0,1	< 0,4
Summe Unbekannte		n. d.			n. d.	1,0	3,5

^x die Abweichung der Summe von 100% kommt durch Rundung zustande

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 3: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Nährmedien (Teil II: SNL, YMG, YPD, YPG). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	SNL		YMG		YPD		YPG	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
1	8:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
3	10:0	0,5	0,4	0,1	0,07	< 0,1	< 0,1	0,1	0,2
4	10:1 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
5	11:0	0,4	0,4	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
6	12:0 [†]	25,6	24,4	5,4	3,6	4,0	4,1	5,8	10,8
7	12:1(5Z) ^{+, †}	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
8	12:1(9Z) [‡]	0,1	0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
9	12:1(11)	< 0,1	< 0,1		n. d.		n. d.	0,1	0,2
10	12:2 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
11	13:0	0,5	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
12	13:1 [‡]		n. d.	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
13	14:0 [†]	3,5	3,3	1,9	1,2	1,7	1,8	2,3	4,3
14	14:1(5Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
15	14:1 ^{‡, †}		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.
16	15:0	1,8	1,7	1,5	1,0	1,4	1,4	1,3	2,4
17	15:1 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
18	15:1 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
19	16:0	17,1	16,3	23,9	15,8	21,5	22,2	23,2	43,4
20	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
21	16:1(9Z)	0,3	0,3	0,5	0,3	0,6	0,7	0,5	0,9
22	16:1(11Z)	0,2	0,2	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
23	16:1 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
24	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,1		n. d.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
25	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
26	17:0	0,6	0,5	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,6

Tabelle A 3 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	SNL		YMG		YPD		YPG	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
27	17:1(8Z) ^{‡, †}		n. d.	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
28	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
29	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
30	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
31	18:0	5,8	5,6	6,7	4,5	6,1	6,3	8,0	15,0
32	18:1(9Z) [†]	7,8	7,4	17,8	11,8	18,6	19,2	20,2	37,8
33	18:1(11Z) [†]	2,3	2,2	1,1	0,7	1,2	1,3	1,8	3,3
34	18:2(9Z,12Z) [†]	29,5	28,2	34,7	23,0	36,1	37,5	28,7	53,7
35	18:2 ^{‡, †}	< 0,1	< 0,1	1,0	0,7	1,5	1,5	1,8	3,4
36	19:0		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
37	18:3(9Z,12Z,15Z)	2,1	2,0	3,3	2,2	4,5	4,6	3,8	7,1
38	20:0	0,2	0,1	0,1	0,08	0,1	0,1	0,2	0,3
39	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
40	20:2(11Z,14Z)		n. d.	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
41	20:3(11Z,14Z,17Z)		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.
42	21:0	< 0,1	< 0,1		n. d.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
43	22:0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,7
44	22:1(13Z) [†]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
45	23:0	0,2	0,1	< 0,1	< 0,07	0,1	0,1	0,2	0,3
46	24:0	0,3	0,3	0,8	0,5	1,1	1,1	0,8	1,5
47	24:1(15Z)		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.
48	25:0		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
Summe Unbekannte			n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 4: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D bei unterschiedlicher Kultivierungstemperatur. Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde.

Nr.	Fettsäure	16 °C		24 °C	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
3	10:0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
4	11:0	< 0,1	< 0,3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
5	12:0	22,9 ± 0,2	69,6 ± 0,7	12,6 ± 0,1	19,8 ± 0,2
6	12:1(5Z) [†]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
7	12:1 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
8	12:1(11)	1,3 ± 0,0	4,1 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0,8 ± 0,0
9	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
10	13:0	< 0,1	< 0,3	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,0
11	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
12	14:0	6,8 ± 0,0	20,5 ± 0,0	3,6 ± 0,0	5,67 ± 0,0
13	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
14	15:0 ⁺	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
15	15:0	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1	2 ± 2	3,1 ± 0,0
16	16:0	19,4 ± 0,1	58,7 ± 0,4	19,8 ± 0,1	31,3 ± 0,2
17	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
18	16:1(9Z)	0,7 ± 0,0	2,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
19	16:1(11Z)	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
21	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
22	17:0	< 0,1	< 0,3	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0
23	17:1(8Z) ^{‡,†}	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
24	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
25	16:3(7Z,10Z,13Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
26	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
27	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
28	18:0	1,9 ± 0,0	5,8 ± 0,1	6,2 ± 0,1	9,8 ± 0,2
29	18:1(9Z) [†]	13,4 ± 0,0	40,7 ± 0,1	18,0 ± 0,0	28,4 ± 0,0
30	18:1(11Z) [†]	1,0 ± 0,0	3,1 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0
31	18:2(9Z,12Z)	24,5 ± 0,1	74,4 ± 0,2	28,7 ± 0,1	45,4 ± 0,1
32	19:0	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,2
33	19:1 ⁺	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1
34	19:1 ⁺	< 0,1	< 0,3	n. d.	n. d.
35	18:3(9Z,12Z,15Z)	4,2 ± 0,1	12,8 ± 0,3	1,7 ± 0,0	2,7 ± 0,0
36	20:0	< 0,1	< 0,3	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
37	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
38	21:0	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
39	22:0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1
40	23:0	< 0,1	< 0,3	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1
41	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	n. d.	n. d.
42	24:0	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1
43	24:1(15Z)	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	n. d.	n. d.
44	25:0	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2
45	25:1(16Z) [‡]	< 0,1	< 0,3	n. d.	n. d.

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 5: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Kulturdauer		7d		21 d		33 d	
Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
3	10:0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0
4	10:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,5
5	11:0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,0	2,7 ± 0,0
6	12:0	12,6 ± 0,1	19,8 ± 0,2	19,5 ± 0,2	78 ± 4	15,3 ± 0,0	70,1 ± 0,8
7	12:1(5Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
8	12:1 ^{‡, †}	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
9	12:1(11)	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,0	2,6 ± 0,1	10,6 ± 0,8	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0
10	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4		n. d.
11	13:0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,7 ± 0,0	3,4 ± 0,0
12	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
13	13:1 [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,5
14	14:0	3,6 ± 0,0	5,7 ± 0,0	3,5 ± 0,3	14,2 ± 1,1	2,2 ± 0,0	10,0 ± 0,1
15	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0
16	i15:0 ⁺	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4		n. d.
17	15:0	2,0 ± 0,0	3,1 ± 0,0	2,0 ± 0,1	8,2 ± 0,7	1,6 ± 0,0	7,5 ± 0,1
18	16:0	19,8 ± 0,1	31,3 ± 0,2	17,7 ± 0,5	72 ± 4	17,1 ± 0,0	78,6 ± 0,9
19	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
20	16:1(9Z)	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0
21	16:1(11Z)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0
22	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
23	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
24	17:0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	4,2 ± 0,4	0,7 ± 0,0	3,3 ± 0,0
25	17:1(8Z) ^{‡, †}	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	0,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1
26	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0

Tabelle A 5 (Fortsetzung)

Nr.	Kulturdauer Fettsäure	7d		21 d		33 d	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
27	16:3(7Z,10Z,13Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
28	17:2 [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0
29	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
30	18:0	6,2 ± 0,1	9,8 ± 0,2	8,1 ± 0,1	33 ± 2	5,2 ± 0,1	23,7 ± 0,1
31	18:1(9Z) [†]	18,0 ± 0,0	28,4 ± 0,0	19,1 ± 0,1	77 ± 4	22,8 ± 0,2	105 ± 2
32	18:1(11Z) [†]	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,0	5,9 ± 0,4	2,5 ± 0,0	11,7 ± 0,1
33	18:2(9Z,12Z)	28,7 ± 0,1	45,3 ± 0,1	20,1 ± 0,1	91 ± 4	26,2 ± 0,1	120 ± 2
34	19:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
35	19:1 [†]	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,0	1,0 ± 0,1	3,9 ± 0,4	1,3 ± 0,0	5,8 ± 0,1
36	19:1 [‡]		n. d.	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
37	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,7 ± 0,0	2,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	2,8 ± 0,3	0,6 ± 0,0	2,9 ± 0,1
38	20:0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0
39	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
40	20:2(11Z,14Z)		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,5
41	21:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
42	22:0	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0
43	23:0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1	< 0,1	< 0,5
44	24:0	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	2,0 ± 0,2	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0
45	24:1(15Z)		n. d.	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5
46	25:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,4	< 0,1	< 0,5

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 6: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Teil I: Blindwert, Cellobiose, Fructose, Glucose und Lactose). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	Blindwert		Cellobiose		Fructose		Glucose		Lactose	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]								
1	8:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
3	10:0	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,6	0,3	0,5	0,3	0,3
4	10:1(2/4) [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
5	11:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	0,1	0,2	< 0,1	< 0,2	0,1	0,1
6	12:0	9,8	6,5	12,6	18,6	17,2	35,7	16,3	35,1	15,6	17,6
7	12:1(5Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
8	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
9	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
10	12:1 [‡]	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
11	12:1(11)	0,2	0,2	1,8	2,7	0,6	1,3	0,8	1,8	1,0	1,1
12	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
13	13:0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,6	0,3	0,5	0,2	0,3
14	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
15	14:0	1,5	0,97	2,5	3,6	4,5	9,5	4,7	10,2	2,4	2,7
16	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
17	14:1 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
18	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
19	15:0	1,6	1,1	0,9	1,4	1,6	3,3	1,6	3,5	1,7	1,9
20	14:3 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
21	16:0	20,0	13,3	21,7	32,1	20,8	43,2	20,6	44,2	19,9	22,6
22	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
23	16:1(9Z)	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,6	0,3	0,7	0,2	0,3
24	16:1(11Z)	0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2
25	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1

Tabelle A 6 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	Blindwert		Cellobiose		Fructose		Glucose		Lactose	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]								
26	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
27	17:0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,7	0,4	0,8	0,3	0,3
28	17:1(8Z) ^{‡,†}	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
29	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
30	16:3(7Z,10Z,13Z) [†]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
31	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
32	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
33	18:0	2,8	1,9	4,7	7,0	5,2	10,7	5,5	11,8	4,4	5,0
34	18:1(9Z) [†]	11,0	7,3	19,8	29,3	15,8	32,8	15,9	34,2	10,6	12,1
35	18:1(11Z) [†]	0,9	0,6	0,9	1,4	1,0	2,2	1,0	2,2	1,2	1,3
36	18:2(9Z,12Z)	44,9	29,7	31,3	46,3	27,6	57,3	26,5	56,9	37,2	42,1
37	19:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
38	18:3(9Z,12Z,15Z)	2,6	1,7	1,11	1,6	1,3	2,7	1,4	3,1	1,6	1,8
39	20:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	< 0,1	< 0,1
40	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
41	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
42	21:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
43	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
44	22:0	0,1	0,08	0,1	0,2	0,3	0,6	0,4	0,9	0,1	0,1
45	22:1(13Z) [†]	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
46	23:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	0,2	0,4	0,3	0,6	< 0,1	0,1
47	24:0	0,4	0,2	0,5	0,7	0,6	1,3	0,9	2,0	0,3	0,4
48	24:1(15Z)	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
49	25:0	< 0,1	< 0,07	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
Summe Unbekannte		2,3	1,5	0,6	0,9	1,2	2,6	1,5	3,1	1,8	2,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 7: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Teil II: Maltose, Saccharose, Sorbitol und Xylose). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	Maltose		Saccharose		Sorbitol		Xylose	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
1	8:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
3	10:0	0,4	0,8	0,3	0,7	0,4	0,6	0,2	0,3
4	10:1(2/4) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
5	11:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	0,1	0,2
6	12:0	24,3	46,8	16,5	36,5	21,3	33,3	10,8	18,9
7	12:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
8	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
9	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
10	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
11	12:1(11)	5,2	9,9	1,0	2,1	1,4	2,3	0,2	0,4
12	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
13	13:0	0,2	0,3	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,6
14	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
15	14:0	4,6	8,9	4,4	9,6	4,1	6,3	3,5	6,1
16	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
17	14:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
18	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
19	15:0	1,2	2,3	1,5	3,3	1,6	2,4	2,3	4,0
20	14:3 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
21	16:0	18,6	35,9	19,9	44,0	19,6	30,6	21,3	37,1
22	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
23	16:1(9Z)	0,3	0,5	0,4	0,8	0,3	0,4	0,4	0,7
24	16:1(11Z)	0,1	0,3	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,4
25	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2

Tabelle A 7 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	Maltose		Saccharose		Sorbitol		Xylose	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
26	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
27	17:0	0,3	0,6	0,4	0,8	0,3	0,5	0,5	0,9
28	17:1(8Z) ^{‡,†}	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
29	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	0,1	0,2
30	16:3(7Z,10Z,13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
31	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
32	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
33	18:0	5,6	10,8	5,5	12,1	5,7	8,9	6,8	11,9
34	18:1(9Z) [†]	14,8	28,6	16,9	37,4	11,7	18,3	17,5	30,5
35	18:1(11Z) [†]	0,8	1,5	1,0	2,3	1,0	1,5	1,2	2,1
36	18:2(9Z,12Z)	19,3	37,1	25,7	56,7	27,1	42,4	28,8	50,3
37	19:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
38	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,1	2,0	1,5	3,3	1,4	2,2	1,4	2,4
39	20:0	0,2	0,4	0,2	0,5	0,2	0,3	0,3	0,5
40	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
41	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
42	21:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	0,2
43	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
44	22:0	0,3	0,6	0,4	0,9	0,3	0,4	0,5	0,9
45	22:1(13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
46	23:0	0,2	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3	0,4	0,6
47	24:0	0,8	1,4	0,9	1,9	0,7	1,1	1,0	1,8
48	24:1(15Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
49	25:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
Summe Unbekannte		0,7	1,2	2,3	3,8	1,6	2,5	1,4	2,4

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 8: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Stickstoffquellen (Teil I: Casein-, Erbsen-, Fleisch-, Gelatine- und Lactalbuminpepton). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	Caseinpepton		Erbsenpepton		Fleischpepton		Gelatinepepton		Lactalbuminpepton	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
3	10:0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,7	1,8	0,5	0,7	0,2	0,3
4	10:1(2/4) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
5	10:1(2/4) [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,3		n. d.		n. d.
6	11:0	0,1	0,2	0,2	0,3	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	0,1	0,2
7	12:0	8,6	15,3	10,2	17,8	42,4	112,5	35,5	54,2	13,5	25,3
8	12:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
9	12:1 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
10	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
11	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3		n. d.	< 0,1	< 0,2
12	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3		n. d.	< 0,1	< 0,2
13	12:1(11)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	2,9	7,6	1,0	1,5	< 0,1	< 0,2
14	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
15	α 13:0 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
16	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
17	13:0	0,3	0,6	0,3	0,6	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,6
18	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
19	14:0	3,5	6,2	2,7	4,8	6,3	16,7	7,3	11,1	5,1	9,5
20	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
21	14:1 [‡]	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
22	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
23	α 15:0		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
24	15:0	1,7	3,1	1,5	2,6	0,6	1,6	0,8	1,3	1,7	3,1
25	14:3 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
26	i 16:0		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
27	16:0	22,9	41,0	23,2	40,3	17,4	46,1	20,3	31,0	22,7	42,4
28	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
29	16:1(9Z)	0,4	0,7	0,2	0,4	< 0,1	< 0,3	0,1	0,2	0,3	0,6
30	16:1(11Z)	0,2	0,4	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	0,3	0,5

Tabelle A 8 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	Caseinpepton		Erbsepepton		Fleischpepton		Gelatinepepton		Lactalbuminpepton	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
31	i17:0 [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
32	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
33	α17:0		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
34	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
35	17:0	0,6	1,0	0,3	0,5	0,1	0,3	0,1	0,2	0,5	0,9
36	17:1(8Z) ^{‡,†}	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
37	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
38	16:3(7Z,10Z,13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
39	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
40	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
41	18:0	8,2	14,7	7,9	13,7	4,5	11,8	4,2	6,4	7,4	13,7
42	18:1(9Z) [†]	17,9	32,1	17,7	30,7	9,9	26,2	11,9	18,2	15,7	29,4
43	18:1(11Z) [†]	1,3	2,3	1,2	2,0	0,6	1,6	0,6	0,9	1,3	2,4
44	18:2(9Z,12Z)	28,3	50,5	30,7	53,3	12,7	33,7	15,5	23,7	25,2	47,1
45	19:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
46	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,2	2,2	1,0	1,8	0,4	1,0	0,4	0,7	1,2	2,2
47	18:2(9Z,11E)		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
48	20:0	0,3	0,5	0,1	0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	0,2	0,5
49	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
50	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
51	21:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
52	20:3(11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,2		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
53	22:0	0,6	1,0	0,3	0,5	< 0,1	< 0,3	0,1	0,2	0,5	0,9
54	22:1(13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
55	23:0	0,4	0,7	0,1	0,3	< 0,1	< 0,3	< 0,1	< 0,2	0,3	0,6
56	24:0	1,2	2,1	0,5	0,9	0,2	0,5	0,3	0,4	1,1	2,0
57	24:1(15Z)	< 0,1	< 0,2		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2
58	25:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2
Summe Unbekannte		0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,5

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

[†] Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 9: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von FVE-D unter Verwendung verschiedener Stickstoffquellen (Teil II: Milchpepton, Milchprotein, Saubohnen-, Sojapepton und Sojaprotein). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	Milchpepton		Milchprotein		Saubohnenpepton		Sojapepton		Sojaprotein	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
2	3Me-,6Me-8:0 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
3	10:0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,5	0,3	0,3
4	10:1(2/4) [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
5	10:1(2/4) [‡]	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1
6	11:0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	< 0,2	0,1	0,2
7	12:0	9,2	15,1	5,1	6,4	7,1	10,4	16,4	36,3	18,8	22,7
8	12:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
9	12:1 [‡]	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	0,1	0,1
11	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	n. d.	n. d.
12	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	n. d.	n. d.
13	12:1(11)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	0,4	0,9	1,9	2,3
14	12:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	n. d.	n. d.
15	α 13:0 [‡]	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
16	12:2(3Z,6Z) [‡]	< 0,1	< 0,2	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
17	13:0	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,6	0,2	0,3
18	13:1 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
19	14:0	2,7	4,5	1,7	2,1	2,1	3,1	5,1	11,2	3,2	3,8
20	14:1(5Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
21	14:1 [‡]	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1	0,0	< 0,2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
22	14:1(9Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
23	α 15:0	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
24	15:0	1,5	2,5	1,5	1,9	2,0	3,0	1,8	4,0	1,4	1,6
25	14:3 [‡]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
26	<i>i</i> 16:0	n. d.	n. d.	< 0,1	< 0,1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
27	16:0	23,1	38,0	19,8	25,0	21,6	31,5	21,0	46,4	22,0	26,6
28	16:1(7Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
29	16:1(9Z)	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,8	0,2	0,2
30	16:1(11Z)	0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1

Tabelle A 9 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	Milchpepton		Milchprotein		Saubohnenpepton		Sojapepton		Sojaprotein	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
31	i17:0 [†]		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.		n. d.		n. d.
32	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
33	a17:0		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.		n. d.		n. d.
34	16:2(9Z,12Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
35	17:0	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,9	0,2	0,2
36	17:1(8Z) ^{*,†}	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
37	17:1(9Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
38	16:3(7Z,10Z,13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
39	17:2 [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
40	17:2 [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
41	18:0	7,6	12,5	7,5	9,4	6,5	9,5	5,8	12,9	5,0	6,0
42	18:1(9Z) [†]	16,6	27,4	27,0	34,1	22,2	32,4	16,5	36,6	15,7	18,9
43	18:1(11Z) [†]	1,2	2,0	1,0	1,2	1,2	1,8	1,2	2,6	1,2	1,4
44	18:2(9Z,12Z)	32,6	53,7	32,3	40,8	31,4	45,9	24,8	54,9	26,6	32,1
45	19:0	< 0,1	< 0,2		n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
46	18:3(9Z,12Z,15Z)	1,2	1,9	0,7	0,9	1,3	1,9	1,3	3,0	0,9	1,1
47	18:2(9Z,11E)		n. d.	< 0,1	< 0,1		n. d.		n. d.		n. d.
48	20:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	< 0,1	< 0,1
49	20:1(11Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
50	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2		n. d.
51	21:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
52	20:3(11Z,14Z,17Z)		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	n. d.	n. d.
53	22:0	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,8	0,1	0,2
54	22:1(13Z) [†]	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
55	23:0	0,1	0,2	< 0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,6	< 0,1	< 0,1
56	24:0	0,6	1,0	0,7	0,8	0,5	0,7	0,9	2,1	0,4	0,4
57	24:1(15Z)		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,2		n. d.
58	25:0	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,2	< 0,1	< 0,1
Summe Unbekannte		0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,6

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

C.2 Ergänzende Fettsäureprofile von *Mortierella hyalina*

Tabelle A 10: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP unter Verwendung verschiedener Nährmedien (Teil I: ME, MEP, MPG). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Dreifachbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	ME		MEP		MPG	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
1	8:0		n. d.	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
2	9:0		n. d.		n. d.	< 0,1	< 1,4
3	10:0	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
4	11:0	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
5	12:0	0,2	2,7	< 0,1	< 0,7	0,1	1,7
6	12:1(<5) [‡]	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.
7	13:0	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
8	14:0	3,7	58,2	2,8	18,7	1,8	25,5
9	14:1(5Z)	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.
10	14:1(>5) [‡]		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
11	14:1(9Z) ⁺		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
12	15:0	0,2	2,4	1,1	7,2	0,2	2,2
13	16:0	25,1	395,2	21,6	143,4	19,0	269,9
14	16:1(7Z) ⁺	0,1	1,7	0,2	1,1	< 0,1	< 1,4
15	16:1(9Z)	0,5	7,9	0,3	2,1	0,3	4,5
16	16:1(10Z) [‡]		n. d.		n. d.		n. d.
17	16:2 [‡]	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
18	16:2(7Z,10Z)	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.
19	17:0	0,2	2,9	1,6	10,3	0,2	3,1
20	17:1(9Z)	0,1	1,9	0,9	5,9	0,2	2,3
21	17:2 [‡]	< 0,1	< 1,6	0,1	0,7	< 0,1	< 1,4
22	17:2 [‡]	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.
23	18:0	4,9	77,8	6,3	41,8	6,0	85,2
24	18:1(9Z)	47,9	755,9	37,4	249,1	61,6	877,8
25	18:1(11Z)	0,6	9,4	0,5	3,6	0,7	10,3
26	18:2(6Z,9Z)	< 0,1	< 1,6	0,1	0,8	0,2	2,5
27	18:2(9Z,12Z)	4,7	74,0	7,5	50,0	1,2	17,1
28	18:3(6Z,9Z,12Z)	2,6	41,4	3,6	24,1	1,4	19,4
29	19:0		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
30	19:1 ⁺		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
31	19:1 ⁺	0,1	1,5	0,8	5,2	0,2	2,3
32	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.
33	20:0	0,2	2,3	0,2	1,4	0,1	2,0
34	20:1(11 Z)	1,1	16,6	0,8	5,2	1,6	23,3
35	20:2 [‡]		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
36	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
37	20:3(8Z,11Z,14Z)	1,0	16,5	1,0	6,8	0,7	10,5
38	21:0		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
39	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	4,9	77,0	9,4	62,7	2,3	32,7
40	20:4(5Z,11Z,14Z,17Z) [‡]	< 0,1	< 1,6		n. d.	< 0,1	< 1,4
41	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7		n. d.

Tabelle A 10 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	ME		MEP		MPG	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]
42	22:0	0,3	3,9	0,5	3,1	0,2	2,7
43	22:1(13Z)	0,1	1,7	0,1	0,8	0,2	2,5
44	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,3	4,0	0,2	1,0	0,4	4,9
45	23:0		n. d.	< 0,1	< 0,7		n. d.
46	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
47	24:0	0,6	8,9	1,7	11,0	0,5	7,3
48	24:1(15Z)	0,5	7,5	0,5	3,5	0,5	7,7
49	25:0	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	0,2	3,1
50	26:0	< 0,1	< 1,6	< 0,1	< 0,7	< 0,1	< 1,4
Summe Unbekannte		< 0,1	< 1,6	0,2	1,5		n. d.

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 11: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP unter Verwendung verschiedener Nährmedien (Teil II: SNL, YMG, YPD, YD). Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Dreifachbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Nr.	Fettsäure	SNL		YMG		YPD		YD	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
1	8:0	< 0,1	< 1,2	n. d.		n. d.		< 0,1	< 0,9
2	9:0		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,9
3	10:0	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
4	11:0		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
5	12:0	0,2	2,8	0,1	1,0	0,4	3,3	< 0,1	< 0,9
6	12:1(<5) [‡]	< 0,1	< 1,2		n. d.			< 0,1	< 0,9
7	13:0	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	0,1	1,0	< 0,1	< 0,9
8	14:0	3,7	42,8	3,6	28,0	3,0	27,2	1,5	14,2
9	14:1(5Z)		n. d.	< 0,1	< 0,8		n. d.		n. d.
10	14:1(>5) [‡]		n. d.		n. d.		n. d.		n. d.
11	14:1(9Z) [‡]		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,9		n. d.
12	15:0	0,1	1,2	0,8	5,9	1,5	14,1	4,3	40,7
13	16:0	22,2	257,2	25,1	193,9	12,5	115,0	19,5	183,3
14	16:1(7Z) [‡]	< 0,1	< 1,2	0,1	0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
15	16:1(9Z)	0,2	2,2	0,4	3,2	0,3	2,4	0,5	4,4
16	16:1(10Z) [‡]		n. d.		n. d.		n. d.	< 0,1	< 0,9
17	16:2 [‡]	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
18	16:2(7Z,10Z)		n. d.	< 0,1	< 0,8		n. d.		n. d.
19	17:0	0,3	3,4	0,8	6,0	4,6	42,3	8,9	83,4
20	17:1(9Z)	0,2	1,8	0,5	3,6	2,8	25,9	4,6	43,6
21	17:2 [‡]	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	0,6	5,4	0,1	1,0
22	17:2 [‡]	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	0,1	1,2
23	18:0	14,8	171,8	6,4	49,7	12,1	111,0	5,4	50,8
24	18:1(9Z) [‡]	49,3	571,1	37,9	293,5	45,0	414,0	36,1	339,0
25	18:1(11Z) [‡]	0,4	4,7	0,6	4,4	0,7	6,2	0,5	5,1
26	18:2(6Z,9Z)	0,3	3,7	< 0,1	< 0,8	0,3	2,6	< 0,1	< 0,9

Tabelle A 11 (Fortsetzung)

Nr.	Fettsäure	SNL		YMG		YPD		YD	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]						
27	18:2(9Z,12Z)	0,9	10,7	6,4	49,9	1,8	16,1	3,7	34,5
28	18:3(6Z,9Z,12Z) [†]	0,8	9,6	2,9	22,8	2,8	25,4	1,8	17,1
29	19:0 [†]		n. d.	< 0,1	< 0,8	0,2	1,6	0,3	2,5
30	19:1 ^{+,†}		n. d.	< 0,1	< 0,8	0,2	1,6	0,2	2,0
31	19:1 ^{+,†}	0,2	2,2	0,4	2,9	2,8	25,3	3,5	32,3
32	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
33	20:0	0,4	4,8	0,2	1,5	0,3	2,5	0,2	2,1
34	20:1(11Z) [†]	0,6	7,0	0,6	4,8	0,5	4,9	0,6	6,0
35	20:2 [‡]	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8		n. d.		n. d.
36	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
37	20:3(8Z,11Z,14Z)	1,4	16,7	1,6	12,5	1,0	8,8	1,2	11,3
38	21:0	< 0,1	< 1,2		n. d.	< 0,1	< 0,9	0,1	1,1
39	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) [†]	1,1	12,5	7,3	56,6	3,2	29,0	3,9	36,9
40	20:4(5Z,11Z,14Z,17Z) [‡]	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
41	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 1,2	0,2	1,5	< 0,1	< 0,9	0,1	1,0
42	22:0	0,7	7,6	0,4	3,2	0,3	3,2	0,2	2,2
43	22:1(13Z)	0,1	1,2	0,1	0,8	0,2	1,6	0,1	0,9
44	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,2	2,1	0,2	1,7	0,3	2,7	0,2	1,9
45	23:0	< 0,1	< 1,2		n. d.	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
46	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 1,2	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
47	24:0	1,3	14,9	1,7	13,1	0,9	8,6	0,7	6,4
48	24:1(15Z) [†]	0,3	3,6	0,6	5,0	0,9	8,2	0,5	4,2
49	25:0		n. d.	0,3	2,4	0,4	3,5	0,2	1,8
50	26:0		n. d.	< 0,1	< 0,8	< 0,1	< 0,9	< 0,1	< 0,9
Summe Unbekannte		< 0,1	< 1,2	0,2	1,3	0,3	2,8	0,3	2,8

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 12: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP bei unterschiedlicher Kultivierungstemperatur. Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde.

Nr.	Temperatur		16 °C		24 °C		
	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]	
1	8:0 ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
2	9:0 ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
3	10:0	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
4	11:0 ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
5	12:0	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
6	12:1(>5) [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
7	13:0	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
8	14:0	2,8 ± 0,0	66	± 2	1,7 ± 0,1	36	± 2
9	15:0	1,1 ± 0,0	25,8	± 0,7	0,7 ± 0,1	16	± 1
10	16:0	32,0 ± 0,0	760	± 26	28,5 ± 0,5	608	± 10
11	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
12	16:1(9Z)	0,5 ± 0,0	12,9	± 0,2	0,3 ± 0,0	5,4	± 0,6
13	16:1 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
14	16:2 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
15	17:0	1,2 ± 0,0	27,9	± 0,6	1,6 ± 0,2	34	± 5
16	17:1(9Z)	0,9 ± 0,0	21,7	± 0,4	1,0 ± 0,1	20	± 2
17	17:2 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
18	17:2 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
19	18:0	1,9 ± 0,1	45,2	± 0,7	5,2 ± 0,6	112	± 13
20	18:1(9Z) ⁺	49,0 ± 0,1	1164	± 42	49 ± 2	1042	± 42
21	18:1(11Z) ⁺	1,0 ± 0,1	24,1	± 2,2	0,8 ± 0,1	17	± 3
22	18:2(6Z,9Z)	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
23	18:2(9Z,12Z)	2,4 ± 0,1	57,2	± 0,5	3,5 ± 0,4	74	± 8
24	18:3(6Z,9Z,12Z) ⁺	0,9 ± 0,0	20,6	± 0,3	1,0 ± 0,2	21	± 3
25	19:0 ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
26	19:1 ^{‡,†}	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
27	19:1 ^{‡,†}	0,5 ± 0,0	11,5	± 0,4	0,6 ± 0,1	13	± 2
28	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
29	20:0	< 0,1	< 2,4		0,1 ± 0,0	2,1	± 0,0
30	20:1(11Z) ⁺	0,2 ± 0,0	5,0	± 0,0	0,3 ± 0,0	6,2	± 0,4
31	20:1 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
32	20:2 [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
33	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
34	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,6 ± 0,0	13,3	± 0,0	0,4 ± 0,0	9	± 1
35	21:0	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
36	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) ^{+,†}	3,2 ± 0,0	76	± 2	3,4 ± 0,5	72	± 11
37	20:4(5Z,11Z,14Z,17Z) [‡]	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
38	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	0,4 ± 0,0	9,1	± 0,3	< 0,1	< 2,1	
39	22:0	< 0,1	< 2,4		0,2 ± 0,0	3,5	± 0,4
40	22:1(13Z)	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
41	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,1 ± 0,0	3,4	± 0,3	< 0,1	< 2,1	
42	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
43	24:0	0,2 ± 0,0	5,1	± 0,6	0,8 ± 0,1	16	± 2
44	24:1(15Z) ⁺	0,2 ± 0,0	4,9	± 0,7	0,5 ± 0,3	11	± 6
45	25:0	0,1 ± 0,0	3,1	± 0,8	< 0,1	< 2,1	
46	26:0	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	
	Summe Unbekannte	< 0,1	< 2,4		< 0,1	< 2,1	

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 13: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Den angegebenen Anteilen und Ausbeuten liegen Doppelbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

Kultivierungsdauer		2 d		4 d		6 d		10 d		14 d	
Nr.	Fettsäure	Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]								
1	8:0 ⁺	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
2	9:0 ⁺	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
3	10:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
4	11:0 ⁺	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
5	12:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
6	12:1(>5) [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
7	13:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
8	14:0	1,3	7,1	1,4	20,4	1,7	36,3	1,7	38,6	1,7	33,6
9	15:0	2,4	12,9	1,3	18,8	0,7	15,6	0,5	11,6	0,6	11,2
10	16:0	20,4	109,0	27,1	385,2	28,5	608,4	28,4	659,5	27,0	544,5
11	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	0,1	2,4
12	16:1(9Z)	0,2	0,9	0,3	3,7	0,3	5,4	0,3	6,5	0,3	5,8
13	16:1 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
14	16:2 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
15	16:2(7Z,10Z) ⁺	n. d.		n. d.		n. d.		< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
16	17:0	6,3	33,5	2,9	41,4	1,6	33,9	0,8	19,6	0,9	18,3
17	17:1(9Z)	2,6	14,1	1,6	22,4	1,0	20,4	0,6	12,9	0,6	12,7
18	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
19	17:2 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
20	18:0	6,0	31,9	4,4	62,0	5,2	111,7	2,9	66,6	2,7	54,3
21	18:1(9Z) ⁺	49,2	263,5	51,3	729,5	48,8	1041,6	50,3	1167,0	49,3	993,4
22	18:1(11Z) ⁺	0,9	4,6	1,0	14,0	0,8	16,9	1,0	23,6	1,0	20,8
23	18:2(6Z,9Z)	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
24	18:2(9Z,12Z)	2,8	14,8	2,5	35,1	3,5	73,8	3,9	90,0	4,4	88,7
25	18:3(6Z,9Z,12Z) ⁺	1,3	7,0	0,8	11,8	1,0	20,9	1,0	22,7	1,1	21,7
26	19:0 ⁺	0,1	0,6	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0

Tabelle A 13 (Fortsetzung)

Nr.	Kultivierungsdauer Fettsäure	2 d		4 d		6 d		10 d		14 d	
		Anteil [%]	Ausbeute [mg/L] [#]								
27	19:1 ^{‡,†}	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
28	19:1 ^{‡,†}	1,7	9,0	0,9	12,6	0,6	12,8	0,3	7,7	0,4	8,3
29	18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
30	20:0	0,1	0,6	< 0,1	< 1,4	0,1	2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
31	20:1(11Z) [†]	0,2	1,3	0,3	3,6	0,3	6,1	0,3	7,1	0,3	6,1
32	20:1 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
33	20:2 [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
34	20:2(11Z,14Z)	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
35	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,7	3,9	0,4	6,3	0,4	8,9	0,4	10,0	0,5	9,2
36	21:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
37	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z) ^{+†}	2,3	12,1	2,4	33,6	3,4	71,9	5,0	116,3	6,8	136,7
38	20:4(5Z,11Z,14Z,17Z) [‡]	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
39	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
40	22:0	0,1	0,7	0,1	1,6	0,2	3,5	0,1	3,2	0,2	3,1
41	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
42	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,1	0,6	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
43	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	< 0,1	< 2,3	< 0,1	< 2,0
44	24:0	0,3	1,5	0,3	4,6	0,8	16,1	0,8	18,1	0,7	14,2
45	24:1(15Z) [†]	0,2	0,8	0,2	3,1	0,5	11,0	0,6	13,0	0,6	11,4
46	25:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	0,1	2,4	0,1	2,0
47	26:0	< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	0,2	3,5	< 0,1	< 2,0
Summe Unbekannte		< 0,1	< 0,5	< 0,1	< 1,4	< 0,1	< 2,1	0,2	3,5	< 0,1	< 2,0

[#] die Einheit versteht sich als mg pro L Hauptkulturmedium (inklusive Inokulum) und wurde durch den relativen Anteil der jeweiligen Fettsäure am Fettsäureprofil berechnet

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

Tabelle A 14: Mittels GC-MS (Trennsäule VF-WAXms) analysiertes Fettsäureprofil von MHY-FP in Abhängigkeit des Zusatzes verschiedener Aminosäuren. Den angegebenen Anteilen liegen Dreifachbestimmungen zu Grunde. Die Abkürzung „n. d.“ steht für „nicht detektiert“.

	Medium	YD	YD + Ile	YD + Met	YD + Thr	YD + Val
Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				
1	12:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
2	13:0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
3	14:0	1,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,6 ± 0,0
4	15:0	1,8 ± 0,0	5,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,1	4,1 ± 0,0
5	16:0	23,9 ± 0,1	13,7 ± 0,2	23,7 ± 0,1	24,6 ± 0,1	17,9 ± 0,1
6	16:1(7Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
7	16:1(9Z)	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
8	17:0	3,6 ± 0,1	13,6 ± 0,3	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2	9,1 ± 0,2
9	17:1(9Z)	1,7 ± 0,0	7,1 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1
10	17:2 [‡]	< 0,1	0,2 ± 0,0	< 0,1	< 0,1	0,1 ± 0,0
11	17:2 [‡]	< 0,1	0,2 ± 0,0	n. d.	n. d.	< 0,1
12	18:0	6,4 ± 0,0	3,9 ± 0,1	7,9 ± 0,3	6,4 ± 0,0	5,3 ± 0,1
13	18:1(9Z) ⁺	48,5 ± 0,3	35,7 ± 0,1	54,5 ± 0,6	49,1 ± 0,4	43,3 ± 0,5
14	18:1(11Z) ⁺	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1
15	18:2(6Z,9Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
16	18:2(9Z,12Z)	2,4 ± 0,0	3,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	2,4 ± 0,0	2,6 ± 0,0
17	18:3(6Z,9Z,12Z) ⁺	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0
18	19:0 ⁺	< 0,1	0,3 ± 0,0	< 0,1	< 0,1	0,2 ± 0,0
19	19:1 ^{‡,†}	< 0,1	0,2 ± 0,0	< 0,1	< 0,1	0,1 ± 0,0
20	19:1 ^{‡,†}	1,0 ± 0,0	5,7 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0	2,8 ± 0,1
21	18:2(9Z,11E)	n. d.	0,1 ± 0,0	n. d.	n. d.	< 0,1
22	20:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
23	20:1(11Z)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
24	20:3(8Z,11Z,14Z)	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0

Tabelle A 14 (Fortsetzung)

	Medium	YD	YD + Ile	YD + Met	YD + Thr	YD + Val
Nr.	Fettsäure	Anteil [%]				
25	21:0	< 0,1	0,1 ± 0,0	< 0,1	< 0,1	< 0,1
26	20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,0
27	20:3(11Z,14Z,17Z)	n. d.	0,2 ± 0,0	n. d.	n. d.	n. d.
28	20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)	< 0,1	< 0,1	0,1 ± 0,0	< 0,1	< 0,1
29	22:0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
30	22:1(13Z)	< 0,1	< 0,1	0,1 ± 0,0	< 0,1	< 0,1
31	22:2(13Z,16Z) ⁺	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
32	23:0	n. d.	0,1 ± 0,0	n. d.	n. d.	< 0,1
33	22:4(7Z,10Z,13Z,16Z) ⁺	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
34	24:0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0
35	24:1(15Z) ⁺	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
36	25:0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	< 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Summe Unbekannte		n. d.	< 0,1	n. d.	n. d.	< 0,1

⁺ Substanzidentität aufgrund qualitativ nicht ausreichender massenspektrometrischer Fragmentierungsmuster nicht hinreichend geklärt

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

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

D. Anteilige Berechnung des ¹³C-Fettsäuregehalts

Die ¹³C-Markierung am C₁-Atom führte im Massenspektrum von Laurin- bzw. Dodec-11-ensäuremethylester zu einer deutlichen Verschiebung des Signals von $m/z = 74$ zu $m/z = 75$. Zwar war auch in den Massenspektren der nicht stabil isotopenmarkierten Methylester ein schwaches Signal bei $m/z = 75$ enthalten, jedoch ließ sich durch die Stärke der Verschiebung von $m/z = 74$ zu $m/z = 75$ auf den Anteil an ¹³C-markierter Fettsäure (bzw. deren Methylester) schließen.

Das Verhältnis der Signalintensitäten von $m/z = 74$ zu $m/z = 75$ der jeweiligen biologischen Blindwerte wurde als „Fragmentionen-Quotient“ reinen Laurinsäure-1-¹²C-methylesters definiert. Der entsprechende Quotient des Laurinsäure-1-¹³C-methylesters wurde anhand der Referenzverbindung bestimmt. Über ein lineares Gleichungssystem (Formel (7)) konnte anhand dessen der Anteil an ¹³C-markierter Laurinsäure in den Proben berechnet werden.

$$\begin{aligned} \frac{m}{z}(74)_{13C} \cdot x_{13C} + \frac{m}{z}(74)_{12C} \cdot y_{12C} &= \frac{m}{z}(74)_{\text{Probe}} \\ \frac{m}{z}(75)_{13C} \cdot x_{13C} + \frac{m}{z}(75)_{12C} \cdot y_{12C} &= \frac{m}{z}(75)_{\text{Probe}} \end{aligned} \quad (7)$$

$\frac{m}{z}(74)_{13C}$ Anteil $m/z = 74$ in 12:0-1-¹³C-methylester [%] = 1,1

$\frac{m}{z}(74)_{12C}$ Anteil $m/z = 74$ in 12:0-1-¹²C-methylester (BW) [%]

$\frac{m}{z}(74)_{\text{Probe}}$ Anteil $m/z = 74$ in der Probe [%]

$\frac{m}{z}(75)_{13C}$ Anteil $m/z = 75$ in C12:0-1-¹³C-methylester [%] = 98,9

$\frac{m}{z}(75)_{12C}$ Anteil $m/z = 75$ in C12:0-1-¹²C-methylester (BW) [%]

$\frac{m}{z}(75)_{\text{Probe}}$ Anteil $m/z = 75$ in der Probe [%]

x_{13C} Anteil 12:0-1-¹³C-methylester in der Probe [%]

y_{12C} Anteil 12:0-1-¹²C-methylester in der Probe [%]

Da Dodec-11-ensäure-¹³C nicht kommerziell erhältlich war, konnte die Stärke der Verschiebung des „Fragmentionen-Quotienten“ von Dodec-11-ensäure-1-¹³C-methylester zu seinem ¹²C-Analogon nicht bestimmt werden. Als Näherung wurde angenommen, dass die prozentuale Änderung jenes Quotienten für jedes ¹²C-/¹³C-Fettsäuremethylester-Paar identisch ist. Dadurch ließ sich von der Verschiebung des Laurinsäuremethylesters auf die des Dodec-11-ensäuremethylesters schließen (Formel (8), Beispiel an $m/z = 74$). Der Anteil von ¹³C-markierter Fettsäure konnte anschließend näherungsweise über Formel (7) bestimmt werden.

$$\frac{m}{z}(74)_{13C12:1} = \frac{m}{z}(74)_{13C12:0} \cdot \frac{\frac{m}{z}(74)_{12C12:1}}{\frac{m}{z}(74)_{12C12:0}} \quad (8)$$

E. Enzymkinetische Parameter der Carbonsäure-Reduktase aus *Mycobacterium marinum* bezüglich Dodec-11-ensäure

Analog des in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen photometrischen Assays wurden die enzymkinetischen Parameter der MmCAR bezüglich Dodec-11-ensäure bestimmt. Dabei wurde ein Konzentrationsbereich (Arbeitskonzentration) von 0,01 bis 1,5 mM an Substrat getestet. Die Kalkulation der Parameter (Tabelle A 15) erfolgte gemäß 2.9.4.

Tabelle A 15: Mittels OriginPro (2020) kalkulierte mittlere Michaelis-Konstanten (K_m) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{max}) der MmCAR bezüglich 12:1(11) unter Angabe der Standardfehler sowie daraus berechnete katalytische Konstante (k_{cat}) und Effizienz (k_{cat}/K_m). Die Werte repräsentieren Dreifachbestimmungen.

Michaelis-Konstante K_m [μM]	48 \pm 18
maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} [U/mg]	1,4 \pm 0,1
katalytische Konstante k_{cat} [1/min]	181
katalytische Effizienz k_{cat}/K_m [1/ μM pro min]	3,8

F. Geruchsattribute der ω 1-ungesättigten Aldehyde

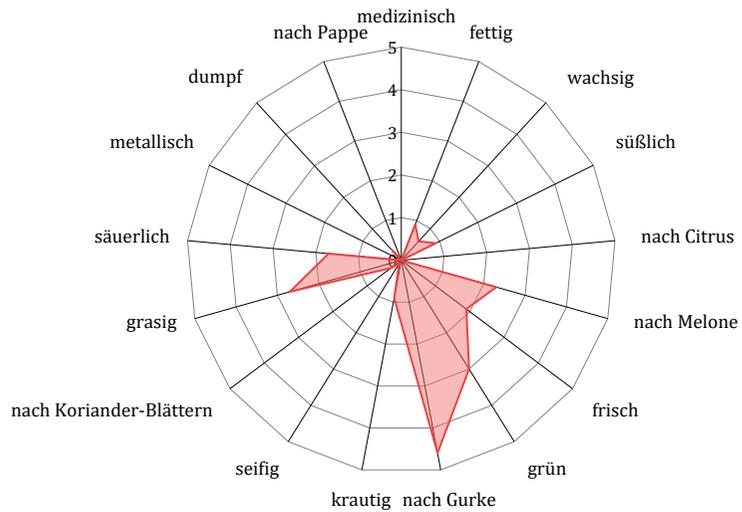


Abbildung A 1: Geruchsattribute und -intensitäten von Hept-6-enal.

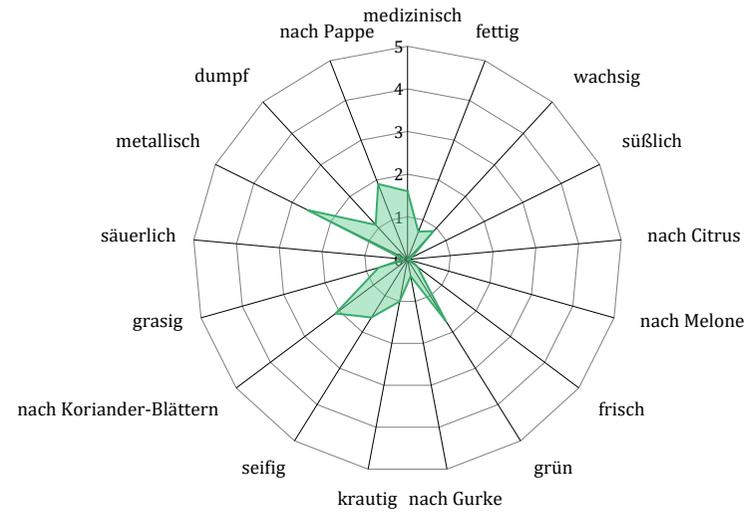


Abbildung A 3: Geruchsattribute und -intensitäten von Non-8-enal.

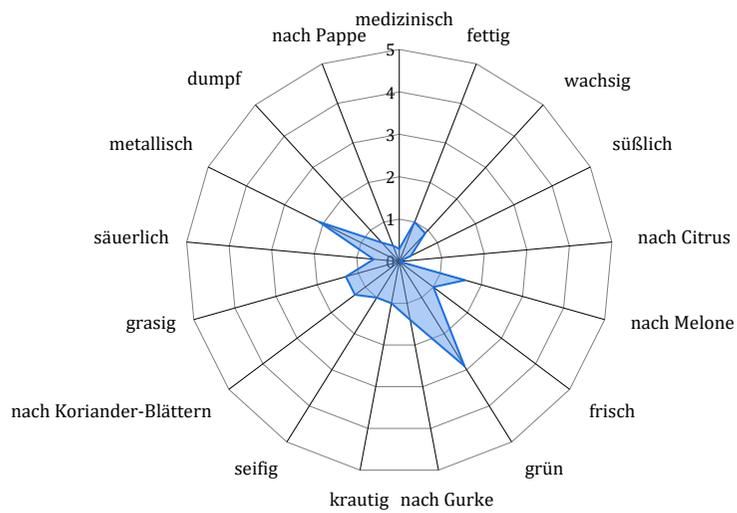


Abbildung A 2: Geruchsattribute und -intensitäten von Oct-7-enal.

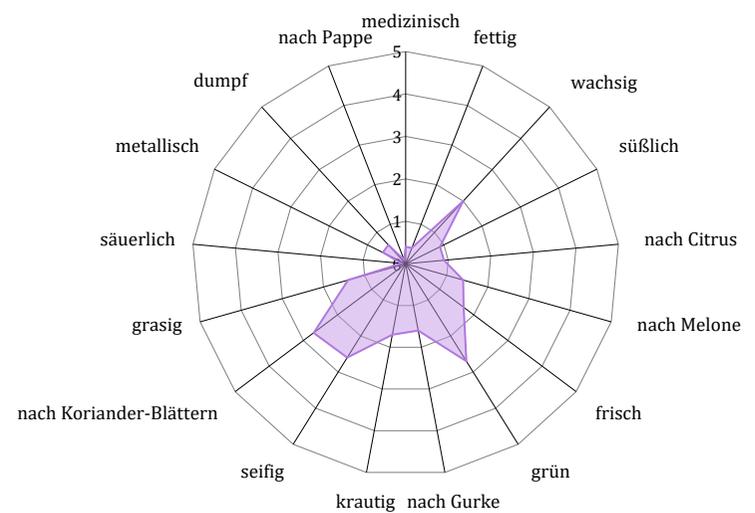


Abbildung A 4: Geruchsattribute und -intensitäten von Dec-9-enal.

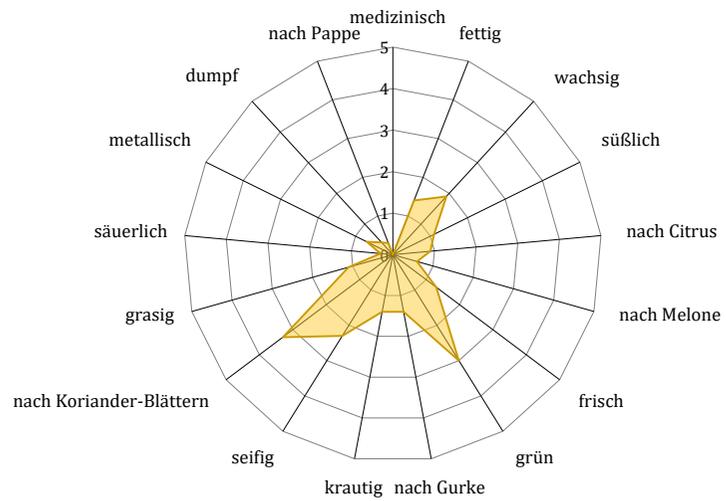


Abbildung A 5: Geruchsattribute und -intensitäten von Undec-10-enal.

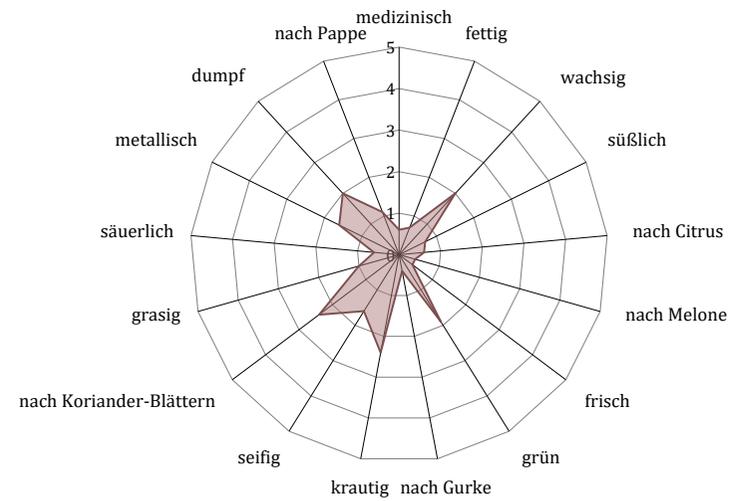


Abbildung A 7: Geruchsattribute und -intensitäten von Tridec-12-enal.

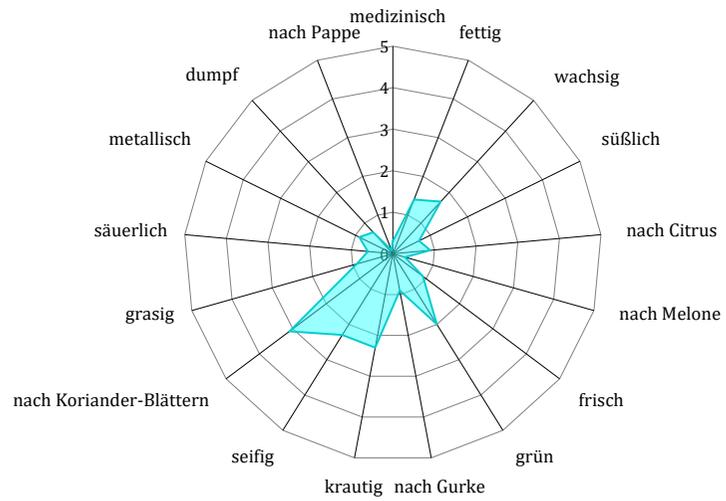


Abbildung A 6: Geruchsattribute und -intensitäten von Dodec-11-enal.